



102 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 21

1983

ZESZYT 4

---

WROCŁAW · WARSZAWA · KRAKÓW · GDAŃSK · ŁÓDŹ  
ZAKŁAD NARODOWY IM. OSSOLIŃSKICH  
WYDAWNICTWO POLSKIEJ AKADEMII NAUK

<http://rcin.org.pl>



# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 21

1983

ZESZYT 4

## KOMITET REDAKCYJNY

Janusz Alwasiak, Maria Dąmbska, Jerzy Dymecki, Janusz Groniowski, Józef Kałuża, Miroslaw B. Kozik, Jerzy Kulczycki, Adam Kunicki, Miroslaw J. Mossakowski, Mieczyslaw Wender, Irmina Zelman

## PRZY WSPÓLPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Istvan Környey (Pecs), Jochen Quandt (Bernburg-Saale), Franz Seitelberger (Wiedeń), Istvan Tariska (Budapeszt)

## REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczyslaw Wender, Irmina Zelman

## REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Miroslaw J. Mossakowski  
Sekretarz Redakcji: Halina Weinrauder

## ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,  
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-82-79, 49-70-18

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1983.  
Nakład: 550 egz. Objętość: ark. wyd. 7,20, ark. druk. 6,75 + luźna wkładka, ark. A<sub>1</sub>-9. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania 16 VI 1983. Podpisano do druku 29 XI 1983. Druk ukończono w grudniu 1983. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 2243/83.

U-6. Cena zł 100.—



MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, LUBOMIRA DYDYK, MIECZYSLAW SMIALEK

## SELECTIVE WHITE MATTER DAMAGE DUE TO MANGANESE INTOXICATION

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

The similarity of the clinical picture and abnormalities in brain catecholamine metabolism in Parkinson's disease and manganese intoxication in man (Cotzias et al. 1971; Hornykiewicz 1972; Cook et al. 1974; Banta, Markesbery 1977; Šarič et al. 1977) as well as the positive reaction of both conditions to levodopa treatment inspired a great number of experimental studies aiming either at explanation of the pathomechanism of manganese encephalopathy or at creation of a convenient model of the extrapyramidal disease. These studies were carried out on various experimental animals (from rats to subhuman primates) with different manganese compounds in varying doses and ways of application (Makarczenko 1956; Chandra, Shukla 1961; Pentschew et al. 1963; Neff et al. 1969; Chandra 1972; Bonilla 1978; Hietanen et al. 1981). Pathomorphological observations concerning experimental manganese encephalopathy vary to a great extent within the range from no abnormalities whatsoever to severe tissue impairment either generalized in the whole central nervous system or limited to particular brain structures (Makarczenko 1956; Pentschew et al. 1963; Neff et al. 1969; Chandra, Srivastova 1970; Jonderko 1970; Mustafa, Chandra 1971; Chandra 1972; Singh et al. 1974). Most common in all the descriptions is the damage of the grey matter structures consisting of neuronal degeneration and/or loss with secondary astrocytic reaction and good preservation of the white matter. In some descriptions glial abnormalities could be considered as primary ones (Pentschew et al. 1963).

In the present paper we describe a reverse situation — predominance, if not selectiveness, of white matter damage due to manganese intoxication.



## MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on 6-week-old, male, albino rats ( $\pm 150$  g body weight at the beginning of experiment) given in the course of 4 weeks 7 subsequent intravenous injections of manganese chloride, dissolved in physiological saline solution. The intravenous way of manganese administration was chosen to avoid poor intestinal metal absorption and its dependence on alimentary factors (Aston 1980). Two initial injections, each containing a dosis of 20 mg/kg weight of  $Mn^{++}$  were given every third day, the following three injections, with a dosis of 40 mg/kg body weight of  $Mn^{++}$  each, were administered in the course of one week with two-days intervals. The last two injections containing the same doses of metal were applied at one week intervals. Following the last injection the animals were left to survive for 4 weeks, for complete excretion of the metal deposits from the body organs (Hietanen et al. 1981). Control animals were given intravenously physiological saline solution according to the same scheme. During the whole period of experiments the animals did not show any neurological symptoms.

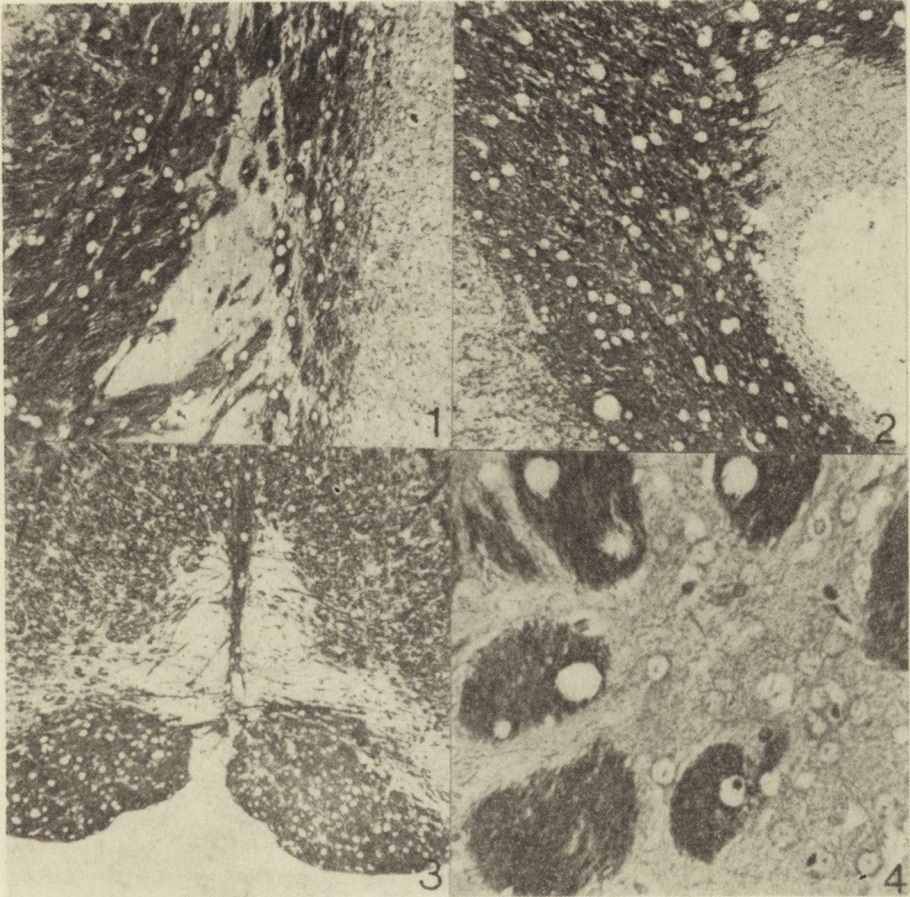
Intracardiac perfusion with 10 percent neutral formalin was applied in animals used for light-microscopic studies, while in those for electron-microscope perfusion was performed with 2 percent solution of glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.2. The material for both light and electron microscopy was processed in an appropriate routine way. For light microscopy the paraffin sections were stained with hematoxylin-eosin, Klüver-Barrera and Kanzler-Arendt methods. Ultrathin sections for electron microscopy were counterstained with uranyl acetate and lead citrate.

## RESULTS

Histological abnormalities in the white matter structures consisted in the appearance of numerous, minute lacunae, occurring in varying density, accumulation of these led to tissue spongiosis. They were present in the white matter of the whole central nervous system, being most numerous in the subcortical white matter (Fig. 1), strio-pallidal bundles, in the medullar substance of the cerebellum (Fig. 2) and in the white matter structures of the brain stem and spinal cord (Fig. 3). They were much less abundant in some grey matter structures rich in myelinated nerve fibers. They were present in deep layers of the cerebral cortex, thalami, inferior olives and anterior horns of the spinal cord. They did not appear in the striatum and cerebellar cortex. Good preservation of myelin within the spongiotic tissue was a very striking feature. Most of the lacunae were empty, only some of them contained small round structures, which could be interpreted as either nuclei or



transversely cut axon cylinders (Fig. 4). On the longitudinal sections of myelinated nerve fibers the lacunae either separated individual fibers or disrupted their continuity (Fig. 5). In some structures tissue lacunation was accompanied by cellular or fibrous gliosis (Fig. 6). Im-



*Fig. 1.* Microcavitation of subcortical white matter and striopallidal bundles, Klüver—Barrera.  $\times 100$

*Ryc. 1.* Drobnajamkowe zmiany w podkorowej istocie białej i w pęczkach striopallidarnych. Klüver—Barrera. Pow.  $100 \times$

*Fig. 2.* Microcavitation of cerebellar white matter. Unchanged microscopic appearance of the cortex and dentate nucleus. Klüver—Barrera.  $\times 100$

*Ryc. 2.* Drobnajamkowe zmiany w istocie białej mózdzku. Niezmieniona kora i jądro zębate. Klüver—Barrera. Pow.  $100 \times$

*Fig. 3.* Microcavitation of pyramidal fibers and other white matter structures of medulla. Klüver—Barrera.  $\times 60$

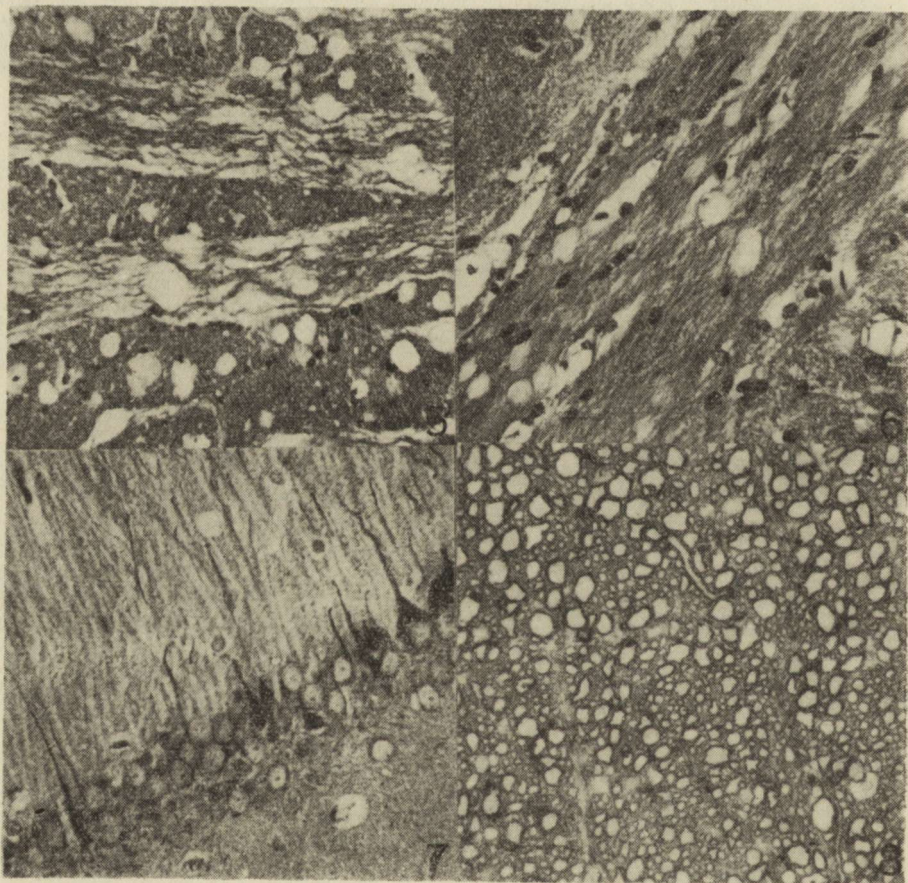
*Ryc. 3.* Drobnajamkowe zmiany w szlakach piramidowych i innych białych strukturach opuszki. Klüver—Barrera. Pow.  $60 \times$

*Fig. 4.* Empty microcavities in the striopallidal bundles. In one of them a small round structure is visible. Klüver—Barrera.  $\times 400$

*Ryc. 4.* Puste jamki w utkaniu pęczków striopallidarnych. W jednej z nich widoczny ciemny, okrągły twór. Klüver—Barrera. Pow.  $400 \times$



pairment of grey structures was minimal. It was manifested by shrinkage of individual or grouped neurons within the neocortex, Ammon's horn and rhinencephalic cortex (Fig. 7). Unchanged were striatal, thalamic, cerebellar neurons and most of the brain stem nerve cells. Nigral neurons showing severe degeneration, disintegration and loss were exceptional.



*Fig. 5.* Microcavities interrupting integrity of longitudinal nerve fibers. H—E.  $\times 400$

*Ryc. 5.* Puste jamki przerywające ciągłość podłużnie przebiegających włókien nerwowych. H—E. Pow.  $400 \times$

*Fig. 6.* Fibrogliosis in subcortical white matter. Kanzler—Arendt.  $\times 400$

*Ryc. 6.* Rozplem włókien glejowych w podkorowej istocie białej. Kanzler—Arendt. Pow.  $400 \times$

*Fig. 7.* Dark, shrunken neurons in the pyramidal cell layer of Ammon's horn. Klüver—Barrera.  $\times 400$

*Ryc. 7.* Ciemne, obkurczone neurony w warstwie komórek piramidowych rogu Amona. Klüver—Barrera. Pow.  $400 \times$

*Fig. 8.* Numerous swollen axon cylinders in medullar white matter. Semithin section. Toluidine blue.  $\times 400$

*Ryc. 8.* Liczne obrzmiałe aksony w istocie białej opuszki. Półcienki skrawek, błękit toluidyny. Pow.  $400 \times$





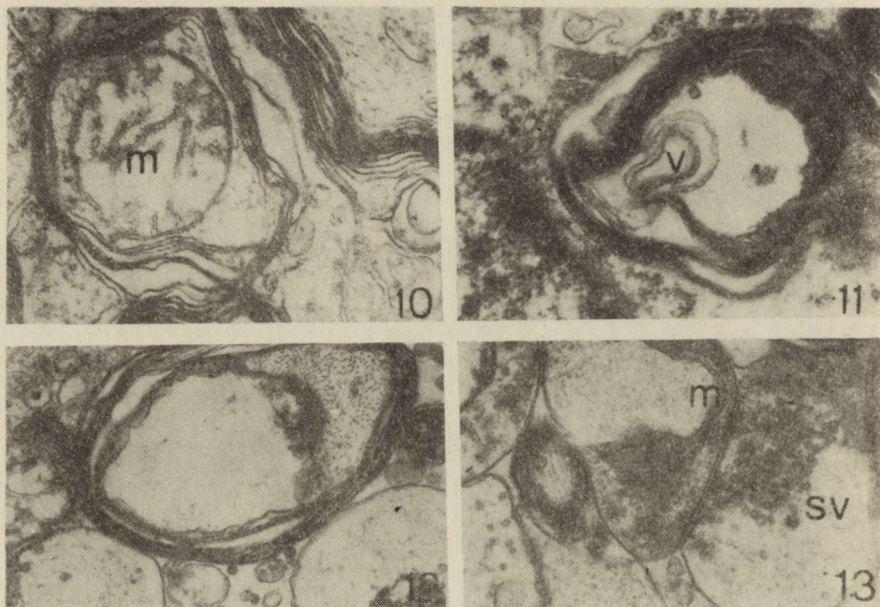
Fig. 9. Tissue fragment of cerebellar white matter. Axon cylinders with axoplasm of varying density: axons with condensed axoplasm, containing abundant filaments (ax<sub>1</sub>), axon with moderate density of axoplasm (ax<sub>2</sub>). m<sub>1</sub> — swollen mitochondria, m<sub>2</sub> — greatly distended mitochondria filling a great part of axoplasm. Ser — dilated cisternae of smooth endoplasmic reticulum. my — local splitting of myelin lamellae. × 13 650.

Ryc. 9. Fragment istoty białej mózdzku. Większość włókien nerwowych z nieprawidłowym obrazem aksonów. ax<sub>1</sub> — aksony z zagęszczoną aksoplazmą zawierającą znaczne ilości neurofilamentów, ax<sub>2</sub> — aksony z umiarkowaną gęstością elektronową aksoplazmy. m<sub>1</sub> — obrzmiałe mitochondria, m<sub>2</sub> — mitochondrium balonowato rozdęte zajmujące znaczną część aksoplazmy, ser — poszerzone zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej, my — miejscowe rozwarstwienie osłonek mielinowej. Pow. 13 650 ×



The electron-microscopic abnormalities involved all structural elements of the white matter, those concerning axon cylinders (Fig. 8) and astroglia being most prominent. Myelin was less involved. So were oligodendrocytes and blood vessels.

Axonal changes consisted in the occurrence of abnormal swollen and degenerating mitochondria, increased amount of distended canals of smooth endoplasmic reticulum and abnormal density of axoplasm. Abnormal mitochondria were present in axons with light, unchanged and condensed axoplasm (Fig. 9). Mitochondrial changes took the form of enlargement, swelling with break-down of cristae, their peripheral



*Fig. 10.* Nerve fiber from substantia nigra. Swollen mitochondrion with light matrix and fragmented tubulo-vesicular cristae.  $\times 13\ 650$

*Ryc. 10.* Włókno nerwowe z istoty czarnej. Mitochondrium (m) o niskiej gęstości elektronowej macierzy z fragmentacją i cewkowo-pęcherzykową strukturą grzebieni. Pow.  $13\ 650 \times$

*Fig. 11.* Nerve fiber from cerebellar white matter. Swollen mitochondrion with partially condensed configuration and a vacuole (v) within matrix.  $\times 13\ 350$

*Ryc. 11.* Włókno nerwowe z istoty białej mózdzku. Obrzmiałe mitochondrium o częściowo skondensowanej konfiguracji z drobną wakuolą w macierzy. Pow.  $13\ 350 \times$

*Fig. 12.* Tissue fragment from putamen. Swollen mitochondrion filling almost completely the cross section of an axon.  $\times 13\ 350$

*Ryc. 12.* Fragment tkankowy ze skorupy. Obrzmiałe mitochondrium wypełnia niemal całkowicie przekrój aksonu. Pow.  $13\ 350 \times$

*Fig. 13.* Tissue fragment from substantia nigra. Axon-terminal with aggregation of synaptic vesicles (sv). Dendritic profile containing abnormal mitochondrion (m).  $\times 13\ 350$

*Ryc. 13.* Fragment tkankowy z istoty czarnej. Zakończenie aksonalne z agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv), obok dendryt z przewężonym mitochondrium (m). Pow.  $13\ 350 \times$





*Fig. 14.* Nerve fiber from medulla. Axoplasm (ax) with an excess of filaments. Local splitting of myelin lamellae.  $\times 13\ 350$

*Ryc. 14.* Włókno nerwowe z opuszki. Aksoplazma ze zwiększoną zawartością neurofilamentów. Miejscowe rozwarstwienie blaszek osłonki mielinowej. Pow.  $13\ 350 \times$

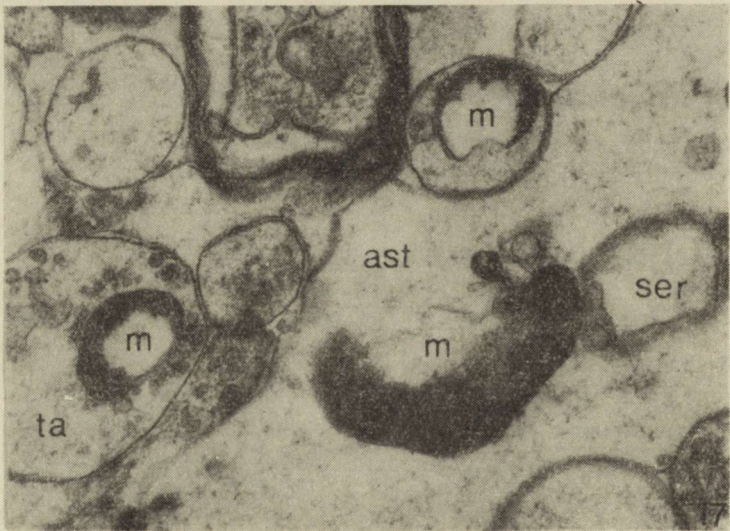
*Fig. 15.* Nerve fiber from medulla. Myelin-like laminary structure within distended periaxonal space.  $\times 14\ 700$

*Ryc. 15.* Włókno nerwowe z opuszki. Blaszkowata, mielinopodobna struktura w poszerzonej przestrzeni okołoaaksonalnej. Pow.  $14\ 700 \times$

displacement and appearance of tubular and vacuolar formations (Fig. 10). A condensed configuration of mitochondria was a common feature (Fig. 11). In extreme situations giant balloon-like, double membrane-bound structures occupied almost totally the axon cross sections (Fig. 12). Identical abnormalities concerned the dendrites, axon terminals and presynaptic bags. Here they accompanied cytoplasmic swelling and disturbances in the distribution of vesicles, which were either dispersed or irregularly aggregated (Fig. 13). Myelin abnormalities were less conspicuous. They consisted in partial or total lamellar splitting (Fig. 14). Enlargement of periaxonal spaces and appearance of laminar structures within them were another feature (Fig. 15). There was some enlargement of intercellular spaces (Fig. 16).

Most astrocytes exhibited cytoplasmic swelling involving both perikarya and processes. There was an increase of smooth endoplasmic reticulum with severely distended canals and cisternae of the Golgi system (Fig. 17). Astrocytic mitochondria show all types of the abnormalities described in axon cylinders (Fig. 18). A condensed configuration





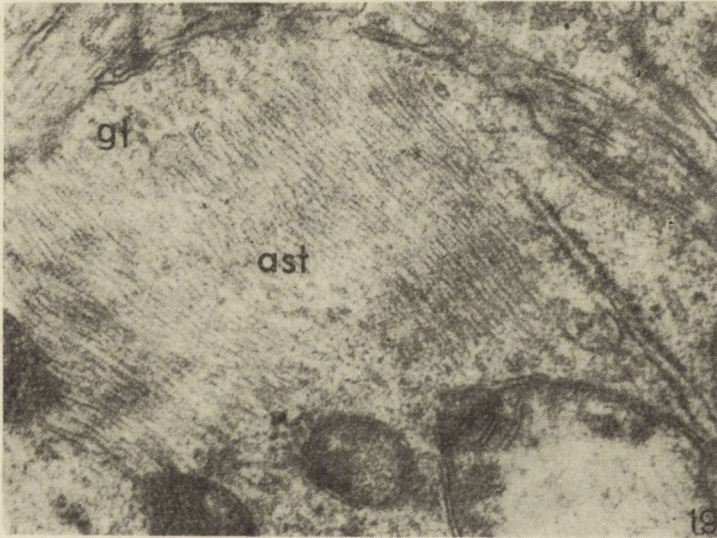
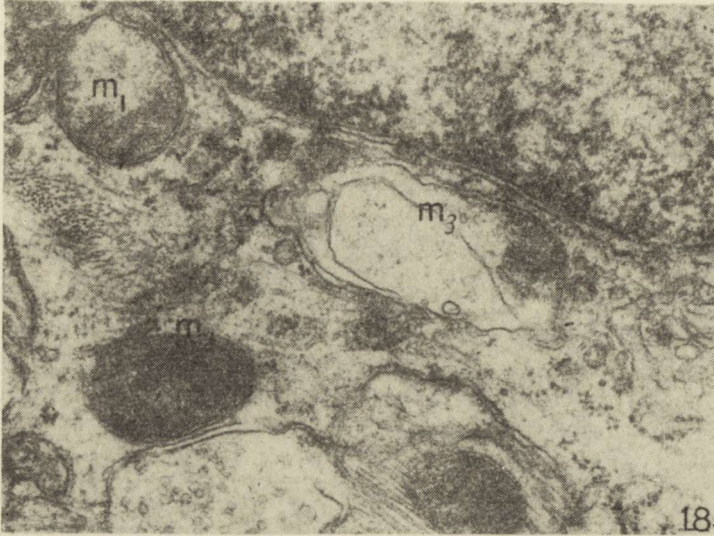
*Fig. 16.* Tissue fragment from medulla. Widened intercellular spaces (ics) and splitting of myelin lamellae ( $my_1$ ,  $my_2$ ). Membrane-free aggregation of electron dense granular material.  $\times 13\ 350$

*Ryc. 16.* Fragment tkankowy z opuszki. Poszerzone przestrzenie międzykomórkowe (ics) i odcinkowe rozwarstwienie blaszek osłonki mielinowej ( $my_1$ ,  $my_2$ ). Nieobłonione skupienie ziarniste, elektronowo-gęstego materiału. Pow. 13 350  $\times$

*Fig. 17.* Tissue fragment from substantia nigra. Swollen astrocytic process with distended channel of smooth endoplasmic reticulum (ser) and condensed configuration of mitochondrion (m). Identical mitochondrial abnormalities visible in axonal terminals (ta).  $\times 13\ 650$

*Ryc. 17.* Fragment istoty czarnej. Obrzmiała wypustka astrocytarna (ast) z rozdętym kanałem gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser) i mitochondrium o skondensowanej konfiguracji (m). Identyczne nieprawidłowości mitochondrialne widoczne w zakończeniach nerwowych (ta). Pow. 13 650  $\times$





*Fig. 18.* Fragment of glial cell from cerebellar white matter with various forms of mitochondrial abnormalities.  $m_1$  — swollen mitochondrion,  $m_2$  — mitochondrion with condensed configuration,  $m_3$  — mitochondrion with a large vacuole within the matrix.  $\times 13\ 350$

*Ryc. 18.* Fragment komórki glejowej z istoty białej mózdzku z nieprawidłowymi postaciami mitochondrium.  $m_1$  — obrzmiałe mitochondrium,  $m_2$  — mitochondrium ze skondensowaną konfiguracją,  $m_3$  — mitochondrium z dużą wakuolą w macierzy. Pow. 13 350  $\times$

*Fig. 19.* Fragment of astrocytic process from cerebral white matter with cytoplasm densely filled with gliofilaments. Swollen mitochondrion in lower right corner.  $\times 14\ 700$

*Ryc. 19.* Fragment wypustki astrocytarnej z podkorowej istoty białej z cytoplazmą gęsto wypełnioną przez gliofilamenty. W dolnym prawym rogu znacznie obrzmiałe mitochondrium. Pow. 14 700  $\times$



of mitochondria was a common feature. There was an excess accumulation of gliofilaments both in the astrocytic perikarya and processes (Fig. 19). Oligodendrocytic impairment consisted in mitochondrial swelling and distention of endoplasmic reticulum. Capillary walls were practically unchanged.

#### DISCUSSION

Basing on our observations we fell unable to state that subchronic intoxication with manganese chloride, administered intravenously can result in toxic encephalopathy with a predominant, if not selective, involvement of the white matter, taking the form of its generalized spongiosis. This contrasted with the observations of most investigators, who described selective abnormalities of the grey matter, taking the form of neuronal degeneration and/or loss, either generalized or limited to the particular brain structures such as cerebral and cerebellar cortex, striatum, substantia nigra (Makarzenko 1956; Chandra, Srivastova 1970; Mustafa, Chandra 1970; Jonderko 1970; Chandra 1972), subthalamic nuclei, globus pallidus or substantia innominata (Pentschew et al. 1963). The only damage to the grey structures found in our material, consistent with other descriptions was that of the substantia nigra.

It seems that the ultrastructural background of the white matter lacunization in our material consists in mitochondrial abnormalities taking the form of tremendous swelling and degeneration leading to the formation of baloon-like structures damaging the axon cylinders. Predominance of the mitochondrial lesions due to manganese intoxication can be related with the greatest accumulation of the metal in these cytoplasmic organelles (Cotzias 1958) and is consistent with the biochemical and histochemical data indicating severe impairment of mitochondrial enzymes activity in experimental manganese intoxication (Chandra 1972; Seth, Husain 1974; Singh et al. 1974; Sitaramayya et al. 1974; Hietanen et al. 1981).

The question of the molecular mechanism of mitochondrial damage remains open. Perhaps, it is connected with the membrane-stabilizing function of manganese (Aston 1980). Unanswered is also the problem of the selectively severe damage of the mitochondria in the nerve cell processes and astrocytes, with remarkably less involvement of oligodendroglia and neuronal perikarya. It has to be stressed, however, that mitochondrial abnormalities in axon terminals and dendrites were found predominantly in the substantia nigra and putamina. This might be connected with nigral lesions. The persistence of mitochondrial abnormalities is also worth mentioning. The above presented changes were found 4 weeks after the intoxication was ended. It indicates that les-



ions continued to occur at the time of decreasing concentration of the metal in the nerve tissue (Hietanen et al. 1981).

The brain abnormalities found in our material, although different from most of the descriptions of experimental manganese encephalopathy, are similar at the light-microscopic level to those described by Zelman (1977) in the intoxication with organophosphorus pesticides. However, in that case electron-microscopic examination revealed severe distension of periaxonal spaces and splitting of the myelin lamellae (Zelman, Majdecki 1979). Changes in manganese encephalopathy are to some extent similar to tissue damage occurring in cyanide intoxication, however, they lack the demyelinating component (Hirano et al. 1967; Wender et al. 1972).

On the basis of light and electron-microscopic examination the described changes might be considered as morphological exponents of cytotoxic brain edema. This is supported by the normal electron-microscopic picture of the cerebral capillaries. However, the vasogenic component of the edematous process cannot be ruled out. Enlargement of intercellular spaces is suggestive of its presence, at least in early periods of intoxication. Its exponents were much more evident in animals sacrificed immediately and one week after manganese intoxication (Mosakowski et al. 1983).

## WYBIÓRCZE USZKODZENIE ISTOTY BIAŁEJ W ZATRUCIU MANGANEM

### Streszczenie

W większości opracowań neuropatologicznych, dotyczących doświadczalnej encefalopatii manganowej, zwraca się uwagę na zróżnicowane w nasileniu i umiejscowieniu uszkodzenia struktur szarych ośrodkowego układu nerwowego. Brak jest natomiast danych na temat zmian w istocie białej. Autorzy przedstawiają analizę nieprawidłowości morfologicznych istoty białej, dominujących w obrazie neuropatologicznym podostrego doświadczalnego zatrucia chlorkiem manganawym u szczurów. Chlorek manganawy, w łącznej dawce 240 mg  $Mn^{++}$ /kg ciężaru ciała podawano w 7 iniekcjach dożylnych w okresie 1 miesiąca. Zwierzęta zabijano po upływie 4 tygodni od ostatniej iniekcji. W obrazie mikroskopowym ośrodkowego układu nerwowego dominowało uszkodzenie struktur białych, wyrażające się ich mikrowakuolizacją oraz towarzyszącą glejową włóknistą. W strukturach szarych zmiany patologiczne były nieznaczne i polegały na nieswoistym zwyrodnieniu mielicznych neuronów kory nowej oraz kory amonalnej. Jedyną strukturą z masywnym zwyrodnieniem i ubytkami komórek nerwowych była istota czarna.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym istoty białej stwierdzono rozległe uszkodzenia wypustek osiowych, wyrażające się zmianami w gęstości elektronowo-optycznej aksoplazmy, zwiększoną zawartością struktur filamentarnych oraz dominującymi nieprawidłowościami mitochondriów. Najczęstszą zmianą było masywne obrzmienie mitochondriów, które prowadziło w skrajnych przypadkach do wypełnienia przekroju aksonu przez balonowate struktury otoczone podwójną błoną. Analogiczne nieprawidłowości mitochondrialne dotyczyły zakończeń nerwowych i części dendrytów. Osłonki mielinowe zachowane były prawidłowo,



tylko niektóre z nich wykazywały miejscowe rozwarstwienie blaszek mieliny i poszerzenie przestrzeni okołoaaksonalnej. Większość komórek gwiaździstych wykazywała obrzmienie, masywny rozplęm gliofilamentów oraz nieprawidłowości mitochondrialne analogiczne jak w aksonach. Oligodendrocyty i naczynia włosowate były niezmiennione. Stwierdzano nieznaczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych.

Opisane zmiany autorzy traktują jako wykładniki obrzęku cytotoksycznego mózgu, a przewagę uszkodzeń mitochondrialnych wiążą z wybiórczą kumulacją metalu w mitochondriach.

## СЕЛЕКТИВНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА В ОТРАВЛЕНИИ МАРГАНЦОМ

### Резюме

В большинстве невропатологических разработок относящихся к экспериментальной марганцевой энцефалопатии исследователи обращают внимание на дифференцированные в интенсивности и локализации повреждения серых структур центральной нервной системы. Зато нет данных в области изменений в белом веществе. Авторы представляют анализ морфологических аномалий белого вещества, доминирующих в невропатологической картине подострого экспериментального отравления хлористым марганцем у крыс. Хлористый марганец в общей дозе 240 мг  $Mn^{++}$ /кг веса тела вводили в 7 внутривенных инъекциях в течение 1 месяца. Животных убивали спустя 4 недели от последней инъекции. В микроскопной картине центральной нервной системы доминировало повреждение белых структур, выражающееся в их микровакуолизации и в сопутствующем фибринозном глиозе. В серых структурах патологические изменения были незначительны и заключались в неспецифической дегенерации немногих нейронов новой коры и аномальной коры. Единственной структурой с массивной дегенерацией и убытками нервных клеток было черное вещество.

В электронно-микроскопической картине белого вещества констатировано протяженные повреждения аксонов, выражающиеся в изменениях в электронно-оптической густоте аксоплазмы, в увеличенном содержании филаментозных структур и в доминирующих аномалиях митохондрий. Самым частым изменением была массивная набухлость митохондрий, которая приводила в крайних случаях к наполнению целого просвета аксона раздутыми структурами окруженными двойной оболочкой. Аналогичные митохондриальные аномалии относились к нервным окончаниям и к частям дендритов. Миелиновые оболочки сохранились правильно, только некоторые из них проявляли местное расслоение пластинок миеллина и расширение околоаксонального пространства. Большинство астроцитов проявляли набухлость, массивную пролиферацию глиофиламентов и митохондриальных аномалий аналогично как в аксонах. Олигодендроциты и капилляры были неизменены. Констатировано незначительное расширение межклеточных пространств.

Описанные изменения авторы считают показателем цитотоксического отека головного мозга, а преобладание митохондриальных повреждений связывают с селективной кумуляцией металла в митохондриях.

### REFERENCES

1. Aston B.: Manganese and man. J. Orthonal. Psychiat., 1980, 9, 237—249.
2. Bonilla E.: Increased GABA content in caudate nucleus of rats after chronic manganese chloride administration. J. Neurochem., 1978, 31, 551—552.



3. Banta R. G., Markesbery W. R.: Elevated manganese level associated with dementia and extrapyramidal signs. *Neurology*, 1977, 27, 213—216.
4. Chandra S. V.: Histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 29—38.
5. Chandra S. V., Shukla S. G.: Effect of manganese on synthesis of brain catecholamines in growing rat. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1981, 48, 449—454.
6. Chandra S. V., Srivastova S. P.: Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese chloride. *Acta Pharmacol.*, (Kbh) 1970, 28, 177—183.
7. Cook D. G., Fahn S., Brait K. A.: Chronic manganese intoxication. *Arch. Neurol.*, 1974, 30, 59—64.
8. Cotzias G. C.: Manganese in health and disease. *Physiol. Rev.*, 1958, 38, 503—506.
9. Cotzias G. C., Papavasiliou P. S., Ginos J., Steck A., Duby S.: Metabolic modification of Parkinson's disease and of chronic manganese poisoning. *Ann. Rev. Med.*, 1971, 22, 305—326.
10. Hietanen E., Kilpio J., Savolainen H.: Neurochemical and biotransformational enzyme responses to manganese exposure in rats. *Acta Environm. Contam. Toxicol.*, 1981, 10, 339—345.
11. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 28, 200—213.
12. Hornykiewicz O.: Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction. *Res Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, 1972, 50, 390—412.
13. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. Śląska Akademia Medyczna. Katowice 1970.
14. Makarczenko A. F.: Izmenienija nierwnoj sistemy pri intoksikacji margancem. AN USRR, Kijów, 1956, 211—272.
15. Mossakowski M. J., Dydyk L., Smiałek M.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983.
16. Mustafa S. J., Chandra S. V.: Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 931—933.
17. Neff N. H., Barrett R. E., Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese administration in squirrel monkeys. *Experientia*, 1969, 25, 1140—1141.
18. Pentschew A., Ebner F. F., Kovatch R. M.: Experimental manganese encephalopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1963, 22, 488—496.
19. Šarič M., Markičević A., Hrutič O.: Occupational exposure to manganese. *Brit. J. Industr. Med.*, 1977, 34, 114—117.
20. Seth P. K., Husain R.: *In vitro* inhibition of succinate dehydrogenase by manganese and its reversal by chelating agents. *Environ. Physiol. Biochem.*, 1974, 4, 176—180.
21. Singh J., Husain R., Tandon S. K., Seth P. K., Chandra S. V.: Biochemical and histopathological alteration in early manganese toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, 1974, 4, 16—23.
22. Sitaramayya A., Nagar N., Chandra S. V.: Effect of manganese on enzymes in rat brain. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1974, 35, 185—190.
23. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Histochemistry of experimental cyanide encephalopathy. *Acta Histochem.*, 1972, 43, 361—371.
24. Zelman I. B.: Patomorfologia mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu fo-



- sforoorganicznym pestycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 516—552.
25. Zelman I. B., Majdecki T.: Zmiany ultrastrukturalne w mózgu szczurów po zatruciu fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 443—453.

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



MIECZYŚLAW WENDER, MARIA SNIATAŁA-KAMASA,  
ALEKSANDER PIECHOWSKI

## MYELIN ASSOCIATED GLYCOPROTEIN OF THE OPTIC NERVE IN TRIETHYL TIN INTOXICATION \*

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

In demyelinating processes, including multiple sclerosis the sequence of structural and biochemical changes that leads to myelin breakdown is not well understood. Although myelin associated glycoprotein (MAG) is quantitatively a minor constituent of the whole myelin fraction, it probably accounts for a considerably higher proportion of the protein molecules exposed on the surface of the myelin membrane. Hence it is possible to speculate about their significance in molecular events leading to demyelination.

Itoyama et al. (1980) who studied immunocytochemically the distribution of MAG in multiple sclerosis (MS) lesions have found in acute early MS plaques a decrease of the MAG immunostaining extended far beyond the margins of acute demyelination, where the basic protein staining of the degenerating sheath was often increased. The striking finding in MS plaques was the extension of the decreased MAG immunostaining into white matter that appeared normal when treated with basic protein antiserum or luxol fast blue. These observations suggest that in MS immunoreactivity of the periaxonal MAG is altered before the onset of myelin breakdown. Contrary to that immunocytochemical studies on leukodystrophies conducted by Ulrich and Heitz (1982) on sections of brains from patients with metachromatic leukodystrophy, sudanophilic leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, Pelizaeus-Merzbacher's disease and of dogs with globoid cell leukodystrophy showed that the distribution of MAG in these specimens was remarkably little altered. In Wallerian degeneration of the optic nerve we have found only negligible changes in the content of MAG (Wender et al. 1983a). However, the major glycoprotein of peripheral myelin disappears mo-

---

\* The studies were supported by the Research Grant J-05-092-N



re rapidly than other proteins during Wallerian degeneration of rat sciatic nerve (Wood, Dawson 1974). The involvement of glycoproteins in demyelinating processes might also be inferred, from the evident decrease of MAG from the central nervous system as shown in a fraction of degenerating myelin isolated from hexachlorophene intoxicated rats (Mathieu et al. 1974). Contrary to this observations Winchell et al. (1982) have observed a normal distribution of the MAG immunostaining in hexachlorophene intoxicated rats.

#### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white Wistar rats weighing 200—300 g each. Five mg/kg of body weight of triethyl tin sulfate (TET) was injected intraperitoneally to the experimental animals. The investigations were performed in 4 experimental groups, comprising animals sacrificed 5 hrs, 24 hrs, 7 and 28 days after TET administration.

*Biochemical methods.* Myelin of the optic nerve was isolated essentially as described by Norton and Poduslo (1973) with following modifications: 0.32 and 0.90 M sucrose density gradients were used, and centrifugation forces of 100 000 g for 60 min. instead of 75 000 g as in the original method. The glycoprotein was separated using slab gel polyacrylamide microelectrophoresis according to Laemli (1970). The myelin glycoprotein was stained with periodic acid — Schiff's reagent and quantitatively scanned by the procedure of Matthieu and Quarles (1973). Glucose oxidase ( $\beta$ -D-glucose oxygen-1-oxidoreductase, E.C. 1.1.3.4., mol. weight 100 000 daltons) was used as a standard.

#### RESULTS

The results pertaining to the protein and MAG content in the myelin of the rat optic nerve in the course of acute TET poisoning are shown in table 1. They indicate already a considerable drop of the total myelin proteins during the TET induced myelinopathy, commencing already 5 hrs after TET application, with a peak falling on the 7th day after administration of the poison. A similar course of changes was seen with respect to MAG content but only when expressed in arbitrary units per mg of dry myelin. When expressed in working units of MAG per mg of total protein a statistically significant reduction was observed not before 24 hours following TET administration. However, in the last experimental group, i.e. 28 days after TET poisoning, the contribution of MAG to the total myelin proteins increased significantly, exceeding that seen in the control myelin fraction.



Table 1. Total protein and MAG content in the myelin of the optic nerve in rats intoxicated with triethyl tin sulfate (TET)

Tabela 1. Całkowita zawartość białka i glikoproteiny związanej z mieliną (MAG) nerwu wzrokowego szczurów zatrutych siarczanem trójetylku cyny (TET)

	Total myelin proteins in mg per g of dry myelin	MAG in arbitrary units* per mg of total myelin proteins	MAG in arbitrary units* per mg of dry myelin
	Całkowita zawartość białek mieliny w mg na g suchej mieliny	MAG w jednostkach roboczych na mg całkowitych białek mieliny	MAG w jednostkach roboczych na mg suchej mieliny
Control animals	204±8.90	20.7±1.14	4.22±0.41
Zwierzęta kontrolne			
5 hrs after intoxication	<b>128±2.14</b>	<b>18.4±0.54</b>	<b>2.35±0.19</b>
5 godz. po zatruciu			
24 hrs after intoxication	<b>137±5.50</b>	<b>17.1±1.04</b>	<b>2.34±0.24</b>
24 godz. po zatruciu			
7 days after intoxication	<b>84±2.81</b>	<b>16.6±0.92</b>	<b>1.39±0.17</b>
7 dni po zatruciu			
28 days after intoxication	<b>135±3.93</b>	<b>24.8±0.88</b>	<b>3.35±0.23</b>
28 dni po zatruciu			

Number of animals in each group:6    Mean ± S.E.    Significant differences underlined  
 Liczba zwierząt w każdej grupie:6    Średnia ± S.E.    Istotne różnice podkreślono

\* One unit of MAG is equivalent to one µg of glucose oxidase (E. C. — 1.1.3.4.)

\* Jedna jednostka MAG jest równoważnikiem jednego µg oksydazy glukozy (E.C. — 1.1.3.4.)

#### DISCUSSION

It is apparent that any comprehensive understanding of the molecular reorganisation of myelin during its breakdown has to involve a consideration of the minor components in addition to major ones such as proteins and lipids. Myelin associated glycoprotein (MAG), a quantitatively minor constituent of the whole myelin fraction is an integral membrane component. According to Poduslo et al. (1978) it is not positional less accessible location for this major glycoprotein of myelin, or oligodendroglial plasma membrane. Some experiments suggest additional less accesible location for this major glycoprotein of myelin, and specifically do suppose its distribution throughout the myelin sheath at the intraperiod line, a location which is contiguous with the outer membrane surface.

In the edematous demyelination caused by hexachlorophene intoxication, myelin splits at the intraperiod line with the formation of large fluid containing vacuoles. In these experimental conditions a severe drop of the myelin associated glycoprotein in the degenerating myelin



obtained from intoxicated animals was reported (Matthieu et al. 1974). A possible explanation for this is that MAG is rapidly destroyed via proteolytic or glycosidic degradation in this pathological situation.

There exist a far going similarity in structural events of myelin degradation between hexachlorophene and triethyl tin intoxication. The cerebral edema in TET intoxication is produced by a widespread formation of intramyelin vacuoles in the white matter of the central nervous system, and by a separation of the lamellae of the myelin sheath at the intraperiodic line (Graham et al. 1976; Wender et al. 1982).

In our present study a sharp decrease of the MAG content was demonstrable, but this drop was very much in proportion to the total protein decrease. When calculated per mg of total protein, a slight reduction of MAG could be observed during the first 7 days after TET injection, but then it tended to rise again reaching values higher than in control specimens. Hence the observed changes in MAG content during acute TET poisoning cannot support the assumption that the myelin associated glycoprotein is specifically sensitive to this particular noxious agent.

The somewhat greater decline of MAG compared to the total myelin proteins on the top of the pathological process (24 hrs and 7 days after intoxication) is fairly well explainable by the postulated specific location of MAG in the intraperiodic line, where the splitting of myelin lamellae occurs during TET poisoning. Furthermore our previous results (Wender et al. 1983b) have shown that neither of the individual myelin proteins were specifically affected by TET intake.

In view of the results pertaining to the behavior of MAG in various demyelinating processes it should be stated that although MAG shows considerable sensitivity towards definite pathological factors it does not constitute a specifically weak chain in the molecular structure of the myelin sheaths that is affected independently of what agent brings about demyelination.

#### CONCLUSIONS

1. In the course of acute TET poisoning the myelin fraction of the optic nerve suffers a substantial loss of myelin proteins.
2. The decrease of MAG content in TET poisoning is proportional to the drop of total myelin proteins and thus is not indicative of a specific sensitivity of that glycoprotein to TET poisoning.
3. The proportion of MAG in the total myelin protein content shows only a slight and transient decrease during acute TET poisoning.
4. The slight decrease of the MAG component of total myelin proteins occurring on the top of the pathological process seems to result from the localization of MAG within the intraperiodic line, where the splitting of myelin lamellae takes place during TET poisoning.



GLIKOPROTEINA ZWIĄZANA Z MIELINĄ (MAG) NERWU WZROKOWEGO  
W ZATRUCIU TRÓJETYLKIEM CYNY (TET)

Streszczenie

W ostrym zatruciu szczurów rasy Wistar trójetylkiem cyny (TET) w dawce 5 mg/kg masy ciała badano zawartość w nerwie wzrokowym glikoproteiny związanej z mieliną (MAG), metodą mikroelektroforezy, a następnie stosując do jej wybarwienia odczynnik Schiffa.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. W przebiegu ostrego zatrucia TET frakcja mielinowa nerwu wzrokowego wykazuje duży spadek zawartości białek mieliny.
2. Spadek zawartości MAG w zatruciu TET jest proporcjonalny do spadku całkowitych białek mieliny, co nie wskazuje na swoistą wrażliwość tej glikoproteiny na zatrucie TET.
3. Względna zawartość MAG w stosunku do całkowitej zawartości białek mieliny wykazuje jedynie lekki i przemijający spadek podczas ostrego zatrucia TET.
4. Nieznacznie większy spadek MAG niż ogólnej zawartości białek mieliny na szczycie procesu patologicznego zdaje się być wynikiem obecności MAG w obrębie linii międzyperiodycznej, w której następuje rozszczepienie blaszek mieliny.

ГЛЮКОПРОТЕИД ОБЪЕДИНЕННЫЙ  
С МИЕЛИНОМ (ГОМ-MAG) ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА  
В ОТРАВЛЕНИИ ТРИЭТИЛОЛОВОМ (ТЭО-ТЕТ)

Резюме

В остром отравлении крыс расы Вистар триэтилоловом (ТЭО) в дозе 5 мг/кг веса тела исследовали содержание в зрительном нерве глюкопротеида объединенного с миелином (ГОМ) при помощи метода микроэлектрофореза по Laemli (1970) и затем применяли для его окраски реактив Шиффа.

Результаты исследований привели к следующим выводам:

1. В течение острого отравления ТЭО'ом миелиновая фракция зрительного нерва проявляет большое снижение содержания белков миелина.
2. Снижение содержания ГОМ'а в отравлении ТЭО'ом пропорционально снижению полных белков миелина, что не указывает на специфическую чувствительность этого глюкопротеида к отравлению ТЭО'ом.
3. Относительное содержание ГОМ'а в отношении полного содержания белков миелина проявляет только легкое и преходящее снижение во время острого отравления ТЭО'ом.
4. Незначительно большее снижение ГОМ'а чем общего содержания белков миелина может быть результатом наличия ГОМ'а в пределах интрапериодической линии, в пределах которой наступает расщепление пластинок миелина в отравлении ТЭО'ом.

REFERENCES

1. Graham, D., de Jesus, P., Pleasure, D., Gonatas, N.: Triethyltin sulfate-induced neuropathy in rats. Arch. Neurol., 1976, 33, 40—48.
2. Itoyama, Y., Sternberger, N., de F. Webster, K., Quarles, R., Cohen, S., Richardson, E.: Immunocytochemical observations on the distribution of mye-



- lin-associated glycoprotein and myelin basis protein in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.*, 1980, 7, 167—177.
3. Laemli, U.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Y. Nature*, 1970, 227, 680—685.
  4. Matthieu, J., Quarles, R.: Quantitative scanning of glycoproteins on polyacrylamide gels stained with periodic acid-Schiff reagent (PAS). *Anal. Biochem.*, 1973, 55, 313—316.
  5. Matthieu, J., Zimmerman, A., de Webster, H., Ulsomer, A., Brady, R., Quarles, R.: Hexachlorophene intoxication: characterisation of myelin and myelin related fractions in rats during early postnatal development. *Exp. Neurol.*, 1974, 45, 558—574.
  6. Norton, N., Poduslo, S.: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—757.
  7. Poduslo, J., Quarles, R., Brady, R.: External labeling of galactose in surface membrane glycoproteins of the intact myelin sheath. *J. Biol. Chem.*, 1976, 251, 153—158.
  8. Ulrich, J., Heitz, Ph.: Immunocytochemistry of leukodystrophies. Abstracts of IXth Intern. Congr. of Neuropath., Vienna, 1982, 102.
  9. Wender, M., Sniatała-Kamasa, M., Piechowski, A.: Myelin of the optic nerve in rats chronically intoxicated with triethyl tin sulfate (TET). *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 223—238.
  10. Wender, M., Wajgt, A., Michałowska, G., Tokarz, E.: Myelin associated glycoprotein (MAG) in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Exper. Path.*, 1983a (in press).
  11. Wender, M., Zgorzalewicz, B., Piechowski, A., Spieszalski, W., Bucholc, M.: The pattern of myelin proteins in triethyl tin (TET) intoxication. *Exper. Path.*, 1983b, 23, 215—217.
  12. Winchell, K., Sternberger, N., de Webster, H.: Myelin-associated glycoprotein localised immunocytochemically in periaxonal regions of oligodendroglia during hexachlorophene intoxication. *Brain Res.*, 1982, 239, 679—684.
  13. Wood, J., Dawson, R.: Lipid and protein changes in sciatic nerve during Wallerian degeneration. *J. Neurochem.*, 1974, 22, 631—635.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, 49, Przybylszewskiego Str., 60—355 Poznań



LESŁAW J. MAZIARZ

MIELINIZACJA SPOIDŁA WIELKIEGO U SZCZURA  
W NASTĘPSTWIE STOSOWANIA WINKRYSTYNY  
W ROZWOJU POZAPŁODOWYM

Zakład Neuropatologii Akademii Medycznej, Poznań

Wytwarzanie osłonek rdzennych w spoidle wielkim u szczurów zachodzi we wczesnych okresach pozapłodowego rozwoju osobniczego. Procesowi temu towarzyszy intensywny rozrost oligodendrogleju (Wender, Kozik 1968; 1971) połączony z dużą aktywnością enzymatyczną wielu fosfataz i esteraz (Wender, Kozik 1969; 1972). Podobne zjawiska morfologiczne i histochemiczne w obrębie spoidła wielkiego obserwowano również u innych gatunków zwierząt (Miętkiewski, Kozik 1966; Wender i wsp. 1969; 1970).

Podawanie środków antymitotycznych w tym okresie rozwoju osobniczego może powodować czasowe lub trwałe zaburzenia mielinogenezy. Dlatego wydawało się celowe podjęcie badań nad wpływem terapeutycznych dawek winkrystyny na rozwój pozapłodowy spoidła wielkiego, uwzględniając zarówno aspekt poznawczy, jak i praktyczny tego zagadnienia.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 60 szczurach rasy Wistar, obu płci, którym jednorazowo w 1, 3, 7, 14, 21 lub 28 dniu życia pozapłodowego podawano dootrzewnowo winkrystynę w dawce 0,01 mg/kg masy ciała. W 29 dniu życia szczury uśmiercano przez przecięcie serca w narkozie eterowej i wykrwawienie.

Materiał do badań stanowiły mózgowia, które utrwalano w płynie Bakera w temperaturze 4°C przez 16 godz. Część wycinków zatapiano w parafinie do badań morfologicznych, barwiąc skrawki fioletem krezylu i metodą Klüver—Barrery. Pozostałe wycinki cięto na mikrotomie mroźniowym, a otrzymane skrawki przeznaczono do barwienia metodą Spielmeyera oraz do oznaczenia aktywności następujących enzymów:



swoistej esterazy (NsE)\* — E.L. 3.1.1.1., według metody Nachlasa i Seligmanna (1949). Inkubacja w temperaturze 37°C przez 15 min; acetylocholinoesterazy (AChE) — E.L. 3.1.1.7., według metody Gerebtzoffa (1953). Inkubacja w temperaturze 37°C przez 120 min; butyrylotiocholinoesterazy (BuTJ) — E.L. 3.1.1.8., według metody Gerebtzoffa (1953). Inkubacja w temperaturze 37°C przez 180 min; fosfatazy zasadowej (FZ) — E.L. 3.1.3.1., według metody Gomoriego (1953). Inkubacja w temperaturze 37°C przez 30 min; fosfatazy kwaśnej (FK) — E.L. 3.1.3.2., według metody Gomoriego (1953). Inkubacja w temperaturze 37°C przez 50 min; adenzynotrójfosfatazy (ATPazy) — E.L. 3.6.1.3., według metody Wachsteina i Meisela (1957). Inkubacja w temperaturze 37°C przez 45 min; pyrofosfatazy tiaminowej (TPPazy) — E.L. 3.6.1.6., według metody Novikoffa i Goldfischera (1961). Czas inkubacji 30 min w temperaturze pokojowej.

Grupę kontrolną stanowiło 18 szczurów pochodzących z tych samych miotów co szczury doświadczalne, które zamiast winkrystyny otrzymały dootrzewnowo 0,5 ml 0,9% NaCl. Dalsze postępowanie z materiałem kontrolnym było takie samo, jak z mózganiami pochodzącymi od zwierząt doświadczalnych.

## WYNIKI

### *Zmiany morfologiczne*

U szczurów otrzymujących winkrystynę w 1 lub 3 dniu życia występują w spoidle wielkim liczne młode postaci komórek oligodendrogleju z jaśniejszymi jądrami i wyraźnie zaznaczonym rąbkim cytoplazmy. Komórki te z reguły tworzą typowe szeregi pomiędzy włóknami nerwowymi. Podobnie jak u zwierząt kontrolnych na pograniczu kolana i promienistości w części środkowej spoidła w tzw. centrum rozrodczym obserwuje się skupiska nieodróżnionych komórek glejowych.

W grupie szczurów, którym winkrystynę podano w 7 dniu życia, wyraźnie zwiększa się liczba dojrzałych oligodendrocytów. W tej grupie doświadczalnej w 29 dniu życia włókna spoidła wielkiego tylko częściowo pokryte są osłonką mielinową (ryc. 1).

Wymaga podkreślenia fakt, że obserwowany obraz morfologiczny w grupie szczurów otrzymujących winkrystynę w 1, 3 lub 7 dniu życia najwyraźniej różni się od obrazu grupy kontrolnej, w której stwierdza się intensywne zabarwienie wszystkich włókien spoidła wielkiego w metodzie Spielmeyera i Klüver—Barrery, a w barwieniu fioletem krezyłu widać wzdłuż tych włókien szeregi dojrzałych oligodendrocytów z okrągłymi lub owalnymi, ciemno wybarwionymi jądrami przesłaniającymi całkowicie cytoplazmę.

\* E. L. — numer listy enzymów (Florkin, Stotz 1973).





Ryc. 1. Winkrystyna podana w 7 dniu życia. Widoczna mielinizacja części włókien spoidłowych i brak osłonek rdzennych w pozostałych włóknach. Klüver—Barrera. Pow. 80 ×

Fig. 1. Vincristin in 7-day of postnatal life. Myelination in part of fibers in corpus callosum. Lack of myelin sheaths in the remaining fibers. Klüver—Barrera. × 80

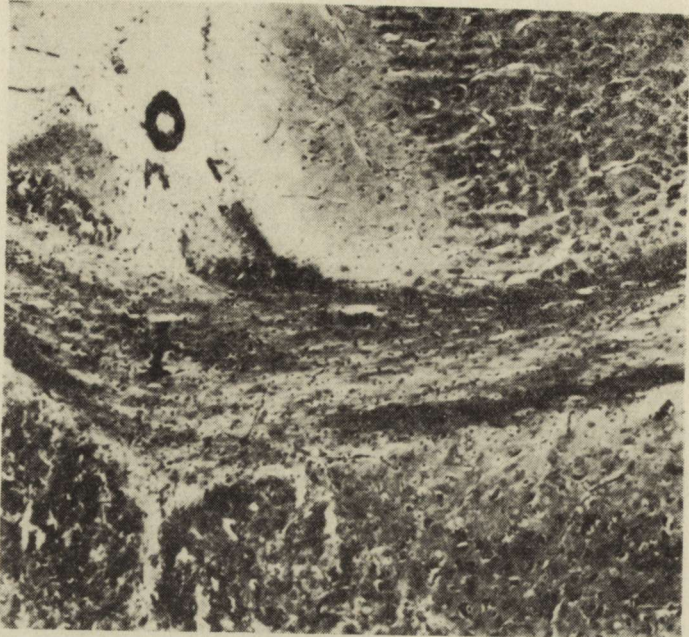
Podawanie winkrystyny w 14 dniu życia pozapłodowego nie wpływa na zmianę obrazu cytologicznego spoidła wielkiego, na obszarze którego pomiędzy astrocytami i komórkami mikrogleju dominują oligodendrocyty. Intensywność wybarwienia się osłonek mielinowych metodą Klüver—Barrery oraz Spielmeyera jest u tych zwierząt wyraźnie większa niż w grupie poprzedniej (ryc. 2). Jednak część włókien leżących w partiach centralnych wybarwia się zdecydowanie słabiej (ryc. 2).

W grupach szczurów otrzymujących winkrystynę w 21 lub 28 dniu życia osobniczego wzdłuż silnie zmielinizowanych włókien nerwowych (ryc. 3) obserwuje się szeregi dojrzałych oligodendrocytów. Obraz ten nie różni się od obrazu histologicznego spoidła wielkiego szczurów grupy kontrolnej (ryc. 4).

#### Zmiany histoenzymatyczne

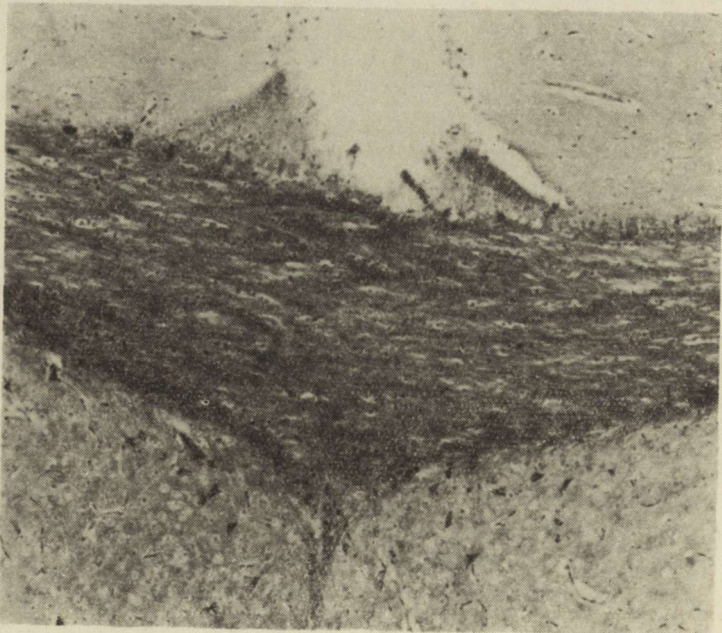
*Swoista esteraza (NsE).* Zarówno grupy doświadczalne, jak i grupa kontrolna wykazują podobną aktywność enzymatyczną w perycytach i w niektórych oligodendrocytach.





*Ryc. 2.* Winkrystyna podana w 14 dniu życia. Włókna zewnętrzne wykazują intensywne zabarwienie osłonek mielinowych, natomiast włókna wewnętrzne spoidła są znacznie jaśniejsze. Spielmeyer. Pow. 80 ×

*Fig. 2.* Vincristin in 14-day of postnatal life. Exterior fibers demonstrate intensive staining of myelin sheaths, internal fibers are far clearer. Spielmeyer. × 80



*Ryc. 3.* Winkrystyna podana w 21 dniu życia. Wszystkie włókna pokryte osłonką rdzenną. Klüver—Barrera. Pow. 80 ×

*Fig. 3.* Vincristin in 21-day of postnatal life. All fibers are covering by myelin sheaths. Klüver—Barrera. × 80

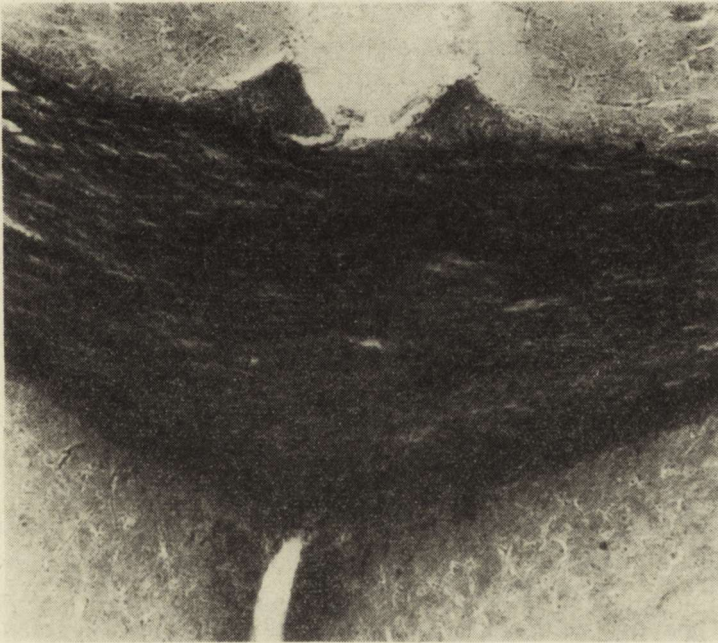


*Acetylocholinoesteraza (AChE)*. Reakcja w komórkach oligodendrogleju spoidła wielkiego u szczurów otrzymujących winkrystynę w 1 tygodniu życia jest delikatniejsza niż u szczurów otrzymujących ten alkaloid w następnych trzech tygodniach i w grupie kontrolnej. Należy podkreślić, że reakcja enzymatyczna w ścianach naczyń krwionośnych nie wykazuje różnic.

*Butyrylotiocholinoesteraza (BuTJ)*. W następstwie podawania winkrystyny w 1, 3 i 7 dniu życia pozapłodowego obserwuje się nieco słabszą aktywność BuTJ w ścianach naczyń krwionośnych spoidła oraz w oligodendroblastach w porównaniu z grupą kontrolną. Podawanie winkrystyny w 14, 21 lub 28 dniu życia osobniczego nie wpływa na zmianę aktywności BuTJ w porównaniu do zwierząt kontrolnych.

*Fosfataza zasadowa (FZ)*. Aktywność fosfatazy zasadowej w drogach spoidła wielkiego występuje w postaci dyfuzyjnej i nie wykazuje różnic między grupami doświadczalnymi oraz grupą kontrolną.

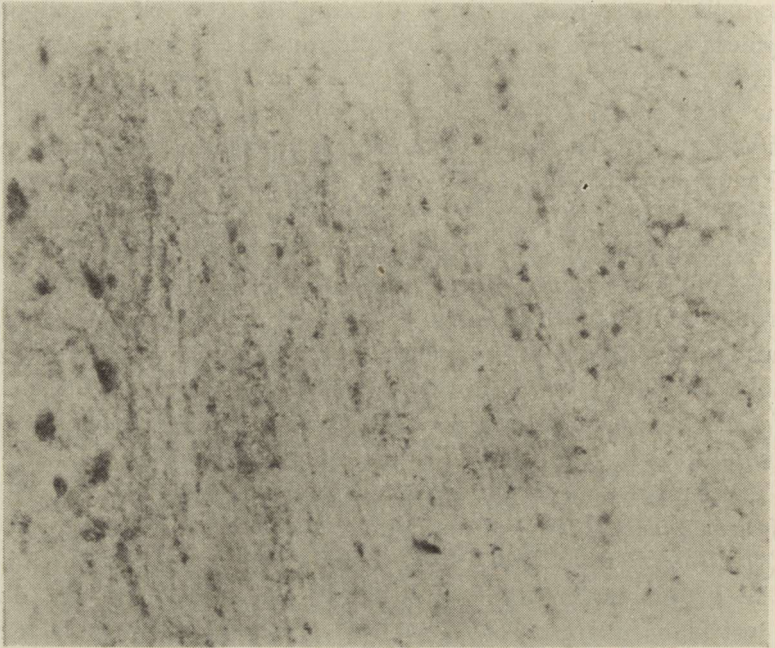
*Fosfataza kwaśna (FK)*. Po podaniu w 1, 3 lub 7 dniu aktywność FK w 19 dniu po urodzeniu nie różni się w porównaniu z grupą kontrolną. W grupie zwierząt otrzymujących winkrystynę w 14 dniu widoczna jest słaba aktywność FK w niektórych oligodendroblastach (ryc. 5). Natomiast silny odczyn enzymatyczny obserwuje się w warstwie



Ryc. 4. Grupa kontrolna. Intensywne zabarwienie wszystkich włókien spoidła wielkiego. Spielmeyer. Pow. 80 ×

Fig. 4. Control group. Intensive staining of all callosal fibers. Spielmeyer. × 80





Ryc. 5. Winkrystyna podana w 14 dniu życia. Słaba aktywność fosfatazy kwaśnej w niektórych oligodendroblastach. Pow. 80 ×

Fig. 5. Vincristin in 14-day of postnatal life. Weak acid phosphatase activity in some oligodendroblasts. × 80

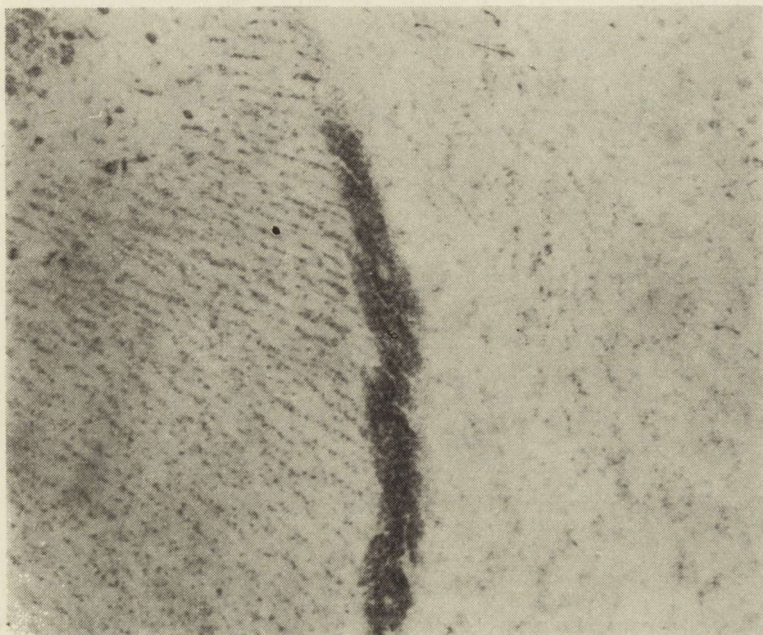
niezróżnicowanego gleju podwyściółkowego u szczurów, którym podawano winkrystynę w 21 dniu życia (ryc. 6).

U szczurów, którym podano winkrystynę w 28 dniu życia odczyn w komórkach glejowych i w ścianach naczyń spoidła wielkiego nie wykazuje różnic (ryc. 7) w porównaniu z grupą kontrolną.

*Adenozynotrójfosfataza (ATPaza)*. Dość wyraźna aktywność widoczna jest w niezróżnicowanych komórkach glejowych i w oligodendrogleju tylko w grupie szczurów otrzymujących winkrystynę w 1 tygodniu życia. W grupach otrzymujących ten cytostatyk w drugim tygodniu życia widać słabą dyfuzyjną reakcję w oligodendrogleju i nieco silniejszą reakcję gleju podwyściółkowego. Odczyn w naczyniach krwionośnych w grupach doświadczalnych i w grupie kontrolnej jest wyraźny i nie wykazuje różnic.

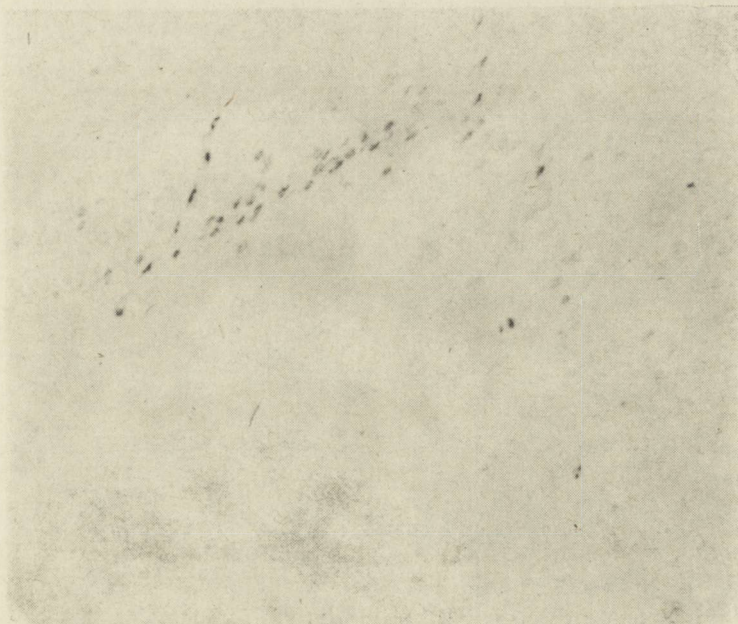
*Pyrofosfataza tiaminowa (TPPaza)*. W grupach szczurów otrzymujących winkrystynę w 1, 3 lub 7 dniu życia największe nasilenie reakcji enzymatycznej na TPPazę występuje w niezróżnicowanych komórkach glejowych w części brzusznej spoidła oraz w ścianach naczyń krwionośnych. Po podaniu winkrystyny w 14 dniu życia widać wyraźną aktywność TPPazy w tzw. centrum rozrodczym spoidła wielkiego (ryc. 8). Aktywność enzymatyczna u zwierząt, które otrzymywały winkrystynę w 21 lub 28 dniu życia, nie różni się od aktywności obserwowanej w grupie kontrolnej (ryc. 9).





*Ryc. 6.* Winkrystyna podana w 21 dniu życia. Silna aktywność fosfatazy kwaśnej w nieodróżnicowanym gleju podwyściółkowym oraz wyraźny odczyn enzymatyczny w oligodendroblastach. Pow. 80 ×

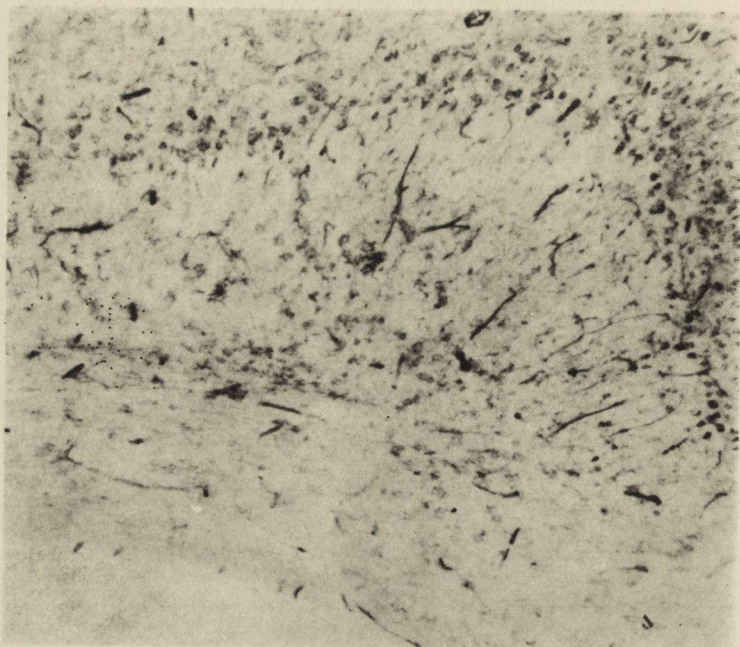
*Fig. 6.* Vincristin in 21-day of postnatal life. Strong acid phosphatase activity in undifferentiated subependymal glia and marked enzymatic activity in oligodendroblasts. × 80



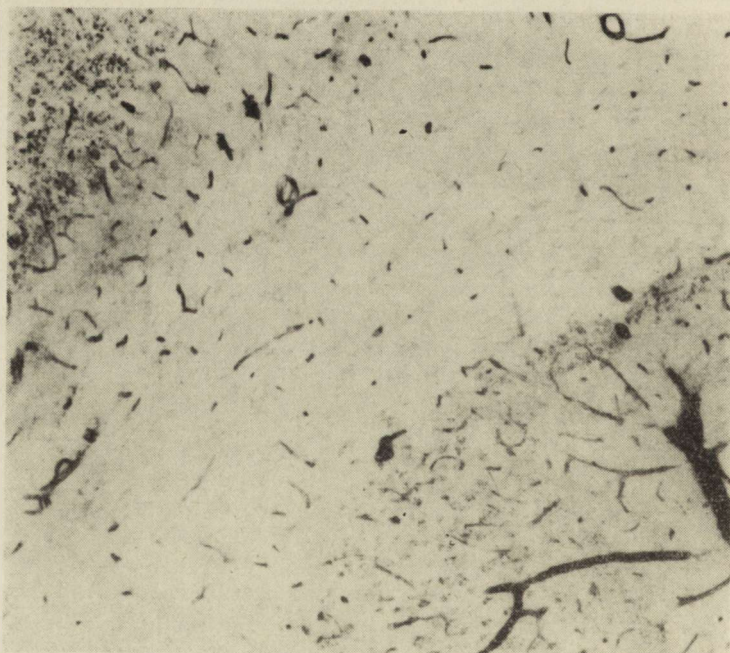
*Ryc. 7.* Grupa kontrolna. Aktywność fosfatazy kwaśnej w neurocytach kory i brak odczynu enzymatycznego w neurogleju spoidła wielkiego. Pow. 80 ×

*Fig. 7.* Control group. Acid phosphatase activity in cortical neurocytes and lack of enzymatic activity in neuroglia of corpus callosum. × 80





*Ryc. 8.* Winkrystyna podana w 14 dniu życia. Aktywność pyrofosfatazy tiaminowej w centrum rozrodczym i w ścianach naczyń krwionośnych. Pow. 80 ×  
*Fig. 8.* Vincristin in 14-day of postnatal life. Thiamine pyrophosphate phosphohydrolase activity in generative centre and in blood vessel walls. × 80



*Ryc. 9.* Grupa kontrolna. Aktywność pyrofosfatazy tiaminowej tylko w ścianach naczyń krwionośnych spoidła wielkiego i w neurocytach kory. Pow. 80 ×  
*Fig. 9.* Control group. Thiamine pyrophosphate phosphohydrolase activity only in blood vessel walls in corpus callosum and in cortical neurocytes. × 80



## OMÓWIENIE

Jednorazowe podanie winkrystyny w pierwszym tygodniu życia wyraźnie opóźnia proces mielinizacji spoidła wielkiego. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji i doniesień innych autorów (Burdman 1966; Rosenthal, Kaufman 1974) można przyjąć, że opóźnienie to jest wynikiem nieodwracalnego zablokowania czynności podziałowych części komórek w centrach rozrodczych spoidła wielkiego i w komórkach nie-różnicowanego gleju podwyściółkowego.

W przedstawionych warunkach doświadczalnych winkrystyna działała uszkadzająco przede wszystkim na komórki wchodzące w stadium metafazy, dlatego komórki będące w innych stadiach podziałowych zostały oszczędzone i mogły uczestniczyć nadal w procesie tworzenia osłonek mielinowych spoidła wielkiego. Stąd też wydaje się, że zmniejszenie liczby komórek zdolnych do rozplemu i wywędrowywania leży u podstaw opóźnienia mielinizacji dróg nerwowych spoidła wielkiego.

Słabsze wybarwienie się osłonek mielinowych u szczurów otrzymujących winkrystynę w 14 dniu życia można wiązać zarówno z wpływem winkrystyny na procesy mitotyczne, jak i z hamującym wpływem na syntezę białek mieliny. Z tego samego powodu, po 14 dniu życia, kiedy to tworzenie mieliny przez nieulegające podziałom oligodendrocyty jest bardzo zaawansowane, wpływ winkrystyny na struktury spoidła wielkiego jest niezauważalny w mikroskopie świetlnym. Należy przypuszczać, że do pełniejszego wyjaśnienia tego zagadnienia mogą przyczynić się badania neurofilamentów w mikroskopie elektronowym (Owellen i wsp. 1976).

Obserwowane odczyny enzymatyczne, charakteryzujące się nieco wyższą aktywnością FK, TPPazy i ATPazy u szczurów otrzymujących winkrystynę w 1 tygodniu życia świadczą również o przedłużonym różnicowaniu się gleju mielinizacyjnego, co morfologicznie wyraża się opóźnieniem mielinizacji włókien nerwowych.

## WNIOSKI

- 1) Podawanie winkrystyny szczurom w 1, 3 i 7 dniu życia pozapłodowego opóźnia mielinizację dróg nerwowych w spoidle wielkim.
- 2) Podawanie winkrystyny w 14 dniu życia pozapłodowego powoduje słabsze barwienie się osłonek mielinowych włókien wewnętrznych spoidła wielkiego w metodzie Klüver—Barrery i Spielmeyera.
- 3) Stosowanie winkrystyny w 21 i 28 dniu życia osobniczego nie wpływa na mielinizację dróg nerwowych.
- 4) Z zaburzeniami mielinizacji są skorelowane niektóre odczyny enzymatyczne w postaci wyższej aktywności enzymatycznej neurogleju. Odczyny te są szczególnie wyraźnie widoczne w nie-różnicowanym gleju podwyściółkowym, w spongioblastach i oligodendroblastach.



## МИЕЛИНИЗАЦИЯ БОЛЬШОЙ СПАЙКИ У КРЫСЫ ВСЛЕДСТВИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ВИНКРИСТИНА ВО ВНЕЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ

### Резюме

Целью работы была оценка влияния винкристина вводимого в терапевтических дозах на процесс постэмбрионального миелиногенеза.

Исследования были проведены с крысами расы Вистар, которым вводили винкристин внутривентриально в дозе 0,01 мг/кг массы тела в 1, 3, 7, 14, 21 или в 28 дню жизни. В 29 дню жизни крыс убивали пересечением сердца и брали мозги для морфологических и гистоэнзиматических исследований. Сопоставляя экспериментальный материал с контрольной группой констатируется, что введение винкристина в 1, 3 и 7 дню внеплодовой жизни замедляет миелинизацию нервных путей в большой спайке. С расстройствами миелинизации находится в связи энзиматическая активность невроглии в форме слегка высшей активности кислой фосфатазы, тиаминпирофосфатазы и аденозинтрифосфатазы.

### INFLUENCE OF VINCRISTIN TREATMENT ON CORPUS CALLOSUM MYELINATION IN YOUNG RATS

#### Summary

The aim of this work was evaluation of the influence of Vincristin in the therapeutic dose on myelination process in postnatal development. The investigations were performed on Wistar rats treated intraperitoneally with one dose (0.01 mg/kg of body weight) of Vincristin at different stages of postnatal development (1, 3, 7, 14, 21 and 28 days).

In the 29th day of life the animals were killed by cutting the heart under ether anesthesia, the brains were removed and used for morphological studies. Experimental and control groups from the same litters were compared. Differences of the myelination of the corpus callosum dependent on stage of postnatal development were found.

#### PIŚMIENICTWO

1. Burdman J. A.: A note on the selective toxicity of vincristine on chick-embryo sensory ganglia in tissue culture. *J. Natl Cancer Inst.*, 1966, 37, 331—332.
2. Miętkiewski K., Kozik M.: Histotopochemische Untersuchungen über die Aktivität der Arylsulphatase im Nervensystem des Kaninchens. *Acta Histochem.*, 1966, 25, 205—218.
3. Owellen R. J., Hartke C. A.: Inhibition of tubulin- microtubule polymerization by drugs of the Vinca alkaloid class. *Cancer Res.*, 1976, 36, 1499—1502.
4. Rosenthal S., Kaufman S.: Vincristine Neurotoxicity. *Ann. Intern. Med.*, 1974, 80, 733—737.
5. Wender M., Kozik M.: Histochemistry of cerebral white matter in relation to myelination of mouse brain. *J. Hirnforsch.*, 1968, 10, 83—92.
6. Wender M., Kozik M.: Histochemistry of enzymes in developing neuroglia. *Folia Morphol.*, 1969, 28, 8—16.
7. Wender M., Kozik M., Owsianowski M.: Histochemie de la névrologie dans les cerveaux en développement chez le lapin. *Ann. Histochem.*, 1969, 14, 275—286.



8. Wender M., Kozik M., Wojciechowski T.: Enzymhистоchemische Untersuchungen zur Entwicklung der Neuroglia des menschlichen Gehirns. *Acta Histochem.*, 1970, 36, 32—43.
9. Wender M., Kozik M., Mularek O.: Histoenzymology of cerebral white matter in the developing rat brain. *J. Hirnforsch.*, 1971, 13, 223—230.
10. Wender M., Kozik M.: The activity of neuroglial enzymes during myelination and demyelination. *Pol. Med. J.*, 1972, 11, 714—721.

Adres autora: Zakład Neuropatologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60—355  
Poznań



WOJCIECH HILGIER, JAN ALBRECHT, ZUZANNA KRAŚNICKA

THIOACETAMIDE-INDUCED HEPATIC  
ENCEPHALOPATHY IN THE RAT

I. PRELIMINARY MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL  
OBSERVATIONS

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

Previous studies on the hepatogenic encephalopathy performed in this laboratory were based on the experimental hepatotoxic model in which liver damage has been induced by repeated injections of carbon tetrachloride to the rats (Mossakowski et al. 1970; Albrecht 1981; Hilgier 1981a, b). Although the cerebral changes evoked by this treatment were compatible with what one could anticipate to follow liver dysfunction, a serious disadvantage of this model was that, the great number of administrations of the compound needed to produce the required effects, extended the duration of the experiments to several months and has led to severe deterioration of the general body condition of the experimental animals. This rendered the model impure and practically inconvenient. In this study, therefore, thioacetamide has been applied as a hepatotoxic compound which is known to produce instant degenerative changes in the liver (Vorbrodt et al. 1966; Holm et al. 1977). This paper, first in a series, describes general observations on the morphology of the brain and liver and characterizes changes in the ammonia and phenol content of the blood and in the activity of the enzymes of glutamine metabolism involved in ammonia detoxication in the brain — the biochemical parameters known to be typically affected in hepatic encephalopathy (Fischer 1974).

MATERIAL AND METHODS

Female Wistar rats, weighing 180—220 g, received intraperitoneal injections of thioacetamide in physiological salt solution in a 250 mg per kg body weight dose. The animals in the particular experimental groups were treated as follows:



Group I — one injection and decapitation after 24 h.

Group II — two injections at 24 h intervals and decapitation 24 h after the last injection.

Group III — two injections at 24 h intervals and decapitation 7 days after the last injection.

The control animals were given physiological salt solution according to the same scheme. Directly following decapitation, the brain, liver and the blood samples were collected for further investigations. Morphological observations of the formalin-fixed brain and liver samples were performed under the light microscope. Paraffine sections of both liver and brain were stained with hematoxylin-eosine. Additionally, frozen brain sections were impregnated according to Cajal's method. Blood ammonia was assayed with the use of a standard blood ammonia test (Hyland). The determination of the concentration of phenolic compounds in the blood was based on the alkaline phosphatase assay after King and Armstrong (1934), except that distilled water replaced the enzyme substrate. The cerebral glutamine synthetase activity was determined after Rowe et al. (1970). The glutamate dehydrogenase activity was assayed according to Schmidt (1965) and the glutaminase activity was measured with method described by Mardaszew et al. (1967). The protein content of the fractions was assayed with the phenol reagent after Lowry et al. (1951).

## RESULTS

The morphological observations revealed slight degenerative changes in the liver in the form of diffuse hepatocyte lipid degeneration after two administrations of thioacetamide (group II). The changes, consisting in focal hepatocyte disintegration accompanied by local fibrosis and proliferation of the connective tissue cells, became markedly more pronounced one week after the last treatment (group III). No cerebral changes were observed in groups I and II. In the brains of group III moderate astrocytic proliferation and hypertrophy with slight degenerative changes in the form of klastodendrosis and swollen enlarged nuclei were noticed.

As shown in Table 1, the blood ammonia level increased approximately two-fold after the first administration and remained elevated to the same extent after the second administration of thioacetamide. One week after the cessation of the treatment it still exceeded the control level but was significantly lower than in the course of the hepatotoxic agent administration. The content of phenolic compounds in the blood increased by about 30% after the second administration and showed no tendency to return to the control level one week after the treatment.



Table 1. Blood ammonia and phenols content in rat following thioacetamide (TAA) administration  
 Tabela 1. Zawartość amoniaku i fenoli w surowicy krwi szczurów po zatruciu tioacetamidem (TAA)

Group Grupa	Compound Substancja	Ammonia Amoniak (mg%)	Phenols Fenole (mg%)
I	physiological salt solution fizjologiczny roztwór soli	109±31 (9)	4.1±0.1 (6)
	TAA	232±25 (5)*	4.3±0.2 (5)
II	physiological salt solution fizjologiczny roztwór soli	109±31 (9)	4.1±0.2 (5)
	TAA	252±24 (6)*	5.5±0.1 (5)*
III	physiological salt solution fizjologiczny roztwór soli	113±9 (7)	3.6±0.5 (7)
	TAA	160±8 (9)*	5.8±1.3 (8)*

Each value is average ± SD with number of experiments in parentheses.

Każdą wartość przedstawiono jako średnią ± odchylenie standardowe, z liczbą doświadczeń podaną w nawiasach

\* Difference statistically significant, as evaluated with the Student's t-test.

Różnica statystycznie znamienna wg testu t Studenta

Table 2 illustrates the changes in the activities of the three key enzymes of ammonia detoxication in the brain. The glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase activities increased respectively by about 30% and 15% after the first treatment, showed a further slight enhancement after the second treatment and remained elevated one week after the last treatment. The glutaminase activity was not affected by thioacetamide administration.

## DISCUSSION

This study revealed a number of practical advantages of using thioacetamide to experimentally induce hepatic encephalopathy. Morphological observations confirmed the earlier reports by others as to the rapid onset of hepatic changes produced by the agent (Vorbrodtt et al. 1966; Holm et al. 1977). These changes coincided with the rise of blood ammonia, which is almost as a rule symptomatic to all experimental and clinical forms of hepatic encephalopathy and a confirmed cause of cerebral changes (for references see Fischer 1974; Zieve 1979; Mossakowski 1981). The increased level of phenolic compounds in the blood has been previously observed by Holm et al. (1977) to follow a similar exposure of cats to thioacetamide, although the involvement of these



Table 2. Glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase and glutaminase activities in the rat brain following thioacetamide (TAA) administration

Tabela 2. Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej, syntetazy glutaminowej i glutaminazy w mózgu szczura po zatruciu tioacetamidem (TAA)

Group Grupa	Compound given Podana substancja	Glutamate dehydrogenase activity ( $\mu$ moles NADH oxidased/g wet tissue/h) Aktywność dehydrogenazy glutaminianowej ( $\mu$ mole NADH utlen./g świeżej tkanki/godz.)	Glutamine synthetase activity ( $\mu$ moles $\gamma$ -glutamylhydroxamate/g wet tissue/h) Aktywność syntetazy glutaminowej ( $\mu$ mole $\gamma$ -glutamylhydroksaminianu/g świeżej tkanki/godz.)	Glutaminase activity ( $\mu$ moles $\text{NH}_3$ /mg protein/h) Aktywność glutaminazy ( $\mu$ mole $\text{NH}_3$ /mg białek/godz.)
I	physiological salt solution fizjologiczny roztwór soli	422 $\pm$ 76 (5)	61.6 $\pm$ 6.8 (5)	3.23 $\pm$ 0.26 (10)
	TAA	561 $\pm$ 69 (6)*	70.3 $\pm$ 3.4 (6)*	3.21 $\pm$ 0.24 (13)
II	physiological salt solution fizjologiczny roztwór soli	420 $\pm$ 84 (5)	64.5 $\pm$ 5.0 (5)	3.12 $\pm$ 0.23 (9)
	TAA	603 $\pm$ 82 (6)*	80.3 $\pm$ 4.7 (6)*	3.17 $\pm$ 0.21 (13)
III	physiological salt solution fizjologiczny roztwór soli	422 $\pm$ 37 (5)	57.3 $\pm$ 2.5 (5)	nm
	TAA	550 $\pm$ 80 (6)*	64.9 $\pm$ 2.2 (6)*	nm

nm — not measured  
nie oznaczano

For further description see legend to Table 1  
Dalsze objaśnienia jak w tabeli 1



compounds in the pathogenesis of hepatic encephalopathy remains a matter of speculation.

The increased activities of enzymes involved in glutamine synthesis are consistent with the observations made earlier in the experiments with the carbon tetrachloride model (Hilgier 1981a, b), as well as with the other models in which the hepatic encephalopathy was induced or simulated in some elements by the experimental performance of the portocaval shunt (Colombo, Bachmann 1978) or by the intravenous administration of ammonia salts (Neumann et al. 1978). This result may be interpreted as a direct consequence of increased ammonia influx into the brain. Since the brain lacks the urea cycle, the excess of ammonia is bound by  $\alpha$ -ketoglutarate to form glutamate in the reaction catalyzed by glutamate dehydrogenase, and/or by glutamate with the formation of glutamine in a reaction mediated by glutamine synthetase (Mc Ilwain, Bachelard 1971). Noteworthy, the enzyme changes precede the manifestation of morphological alterations in the brain, which do not become apparent before the cessation of the exposure to thioacetamide. Furthermore, these enzyme activities remain elevated after the appearance of morphological changes. Considering, in addition, that cerebral ammonia content does not increase throughout the whole period of the experiment (not illustrated), the above observations appear to indicate that glial changes characteristic of hepatic encephalopathy may be causally related to the pathogenic activity of some other products of the increased ammonia metabolism via the glutamine route. Interesting in this context is the lack of increase of the glutaminase activity, which characterizes other forms of hepatic encephalopathy, including that induced by carbon tetrachloride (Hilgier 1981b). This observation allows to speculate that a significant proportion of glutamine, in addition to undergoing the glutaminase-mediated hydrolysis to glutamate and ammonia, will be transaminated to  $\alpha$ -ketoglutaramate — a compound of confirmed neurotoxicity and detectable in the cerebrospinal fluid of patients suffering of hepatic coma (Duffy et al. 1974; Vergara et al. 1974). This hypothesis needs experimental confirmation in direct measurement of both glutamine and  $\alpha$ -ketoglutaramate contents.

In conclusion, the rapidity of the onset of changes induced by thioacetamide on one hand, and the fact that the changes appear to be characteristic for hepatic encephalopathy on the other hand, allow to consider the present model as practically more convenient for detailed investigations of cerebral changes related to hepatic failure than the carbon tetrachloride model. Furthermore, the risk of interference by other pathological processes in the present model is lower. In this connection it is worth mentioning that, in the second paper of this series, we present evidence that the effect of blood serum from the thioacetamide-



-treated rats on the astrocytes grown in *in vitro* culture is typical for hepatic encephalopathy and entirely different from that exerted directly by thioacetamide (Kraśnicka et al. 1983).

## ENCEFALOPATIA WĄTROBOWA U SZCZURA WYWOŁANA PODAWANIEM TIOACETAMIDU

I. Wstępne badania morfologiczne i biochemiczne

### Streszczenie

Szczurom rasy Wistar podawano dootrzewnowo roztwór tioacetamidu w soli fizjologicznej w dawce 250 mg/kg wagi ciała, jednokrotnie lub dwukrotnie w odstępach 24 godzin. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację odpowiednio w 24 godziny po pierwszym (grupa I) lub drugim (grupa II) podaniu związku oraz w 7 dni po drugim podaniu (grupa III). Bezpośrednio po dekapitacji pobierano próbki krwi oraz wątrobę i półkule mózgowe. Dokonano wstępnej oceny zmian morfologicznych w wątrobie i w mózgu oraz przeprowadzono oznaczenia parametrów biochemicznych, przyjętych jako wskaźniki pojawiania się zmian charakterystycznych dla encefalopatii wątrobowej: zawartość amoniaku i związków fenolowych we krwi oraz aktywność enzymów związanych z metabolizmem glutaminy w mózgu. Stwierdzono pojawienie się zmian zwyrodnieniowych w wątrobie w grupie II, ulegających nasileniu w grupie III. Zmiany morfologiczne w mózgu, dotyczące wybiórczo astrocytów, zaobserwowano jedynie w grupie III. We wszystkich grupach doświadczalnych stwierdzono prawie dwukrotny wzrost zawartości amoniaku oraz niewielkie podwyższenie poziomu związków fenolowych we krwi. Również zmiany aktywności enzymatycznej w mózgu, polegające na znacznym wzroście aktywności dehydrogenazy kwasu glutaminowego oraz syntetazy glutaminy, świadczące o wzmożonej detoksykacji amoniaku, pojawiły się już w grupie I i były obecne w pozostałych grupach. Nie stwierdzono natomiast zmian w aktywności glutaminazy, co sugeruje możliwość uaktywnienia się transaminacji jako alternatywnej drogi rozkładu glutaminy. Zarówno szybkość pojawiania się zmian i ich typowy charakter, jak również następcość zmian morfologicznych w mózgu w stosunku do zmian biochemicznych oraz uszkodzenia wątroby, świadczą o przydatności modelu tioacetamidowego do badań doświadczalnych nad encefalopatią wątrobową.

## ПЕЧЕНОЧНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ У КРЫСЫ ВЫЗВАННАЯ ВВЕДЕНИЕМ ТИОАЦЕТАМИДА

I. Предварительные морфологические и биологические исследования

### Резюме

Крысам расы Вистар вводили внутривентриально раствор тиацетамида в физиологической соли в дозе 250 мг/кг веса тела однократно или двукратно в промежутке 24 часов. Животных убивали при помощи декапитации соответственно в 24 часа после первого (I группа) или второго (II группа) введения соединения и по истечении 7 дней после второго введения (III группа). Непосредственно после декапитации взяли пробы крови, печень и полушария головного мозга. Произведено предварительную оценку морфологических изменений в печени и в головном мозгу, а также проведено обозначения биохимических параметров



установленных показателями изменений характерных для печеночной энцефалопатии: содержание аммиака и фенольных соединений в крови и активность энзимов связанных с метаболизмом глутамината в головном мозгу. Констатируется появление дегенеративных изменений в печени во II группе подвергающихся усилению в III группе. Морфологические изменения в головном мозгу, относящиеся селективно к астроцитам, наблюдались только в III группе. Во всех экспериментальных группах, включая самую раннюю, констатируется около двукратный рост содержания аммиака и небольшое повышение уровня фенольных соединений в крови. Также изменения энзиматической активности в мозгу, заключающиеся в значительном росте активности дегидрогеназы глутаминовой кислоты и синтетазы глутамината, свидетельствуют об усиленной детоксикации аммиака, появились уже в I группе и присутствовали в остальных группах. Зато не констатируется изменений в активности глутаминазы, что приводит на мысль возможность активирования трансаминации, как альтернативного пути расщепления глутамината. Как скорость появления изменений и их типичный характер, так и последовательность морфологических изменений в мозгу по отношению к биохимическим изменениям и к повреждению печени, свидетельствуют о пригодности тиацетамидной модели для экспериментальных исследований печеночной энцефалопатии.

## REFERENCES

1. Albrecht J.: Cerebral RNA synthesis in experimental hepatic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.*, 1981, 6, 553—559.
2. Colombo J. P., Bachmann C.: Enzyme der Ammoniak-Entgiftung in der Ratte mit portocavalem Shunt (PCS). [In:] *Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Enzephalopathie*. Eds: F. Wewalka, B. Dragosic, G. Fischer. Stuttgart, New York 1978, pp. 129—134.
3. Duffy T. E., Vergara F., Plum F.: Alfaketoglutaramate in hepatic encephalopathy. [In:] *Brain dysfunction in metabolic disorders*. Ed.: Plum F., Res. Publ. Assoc. nerv. Ment. Dis., Raven Press, New York 1974, vol. 53, pp. 39—52.
4. Fischer J. E.: Hepatic coma in cirrhosis, portal hypertension and following portocaval shunt. *Arch. Surg.*, 1974, 108, 325—336.
5. Hilgier W.: Zawartość glutaminy oraz aktywność aminotransferazy glutaminowej w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1981a, 19, 67—73.
6. Hilgier W.: Zawartość amoniaku oraz aktywność syntetazy glutaminowej i glutaminazy w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1981b, 19, 351—358.
7. Holm E., Striebel J. P., Münzenmaier R., Kattermann R.: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. *Leber. Magen. Darm.*, 1977, 7, 241—254.
8. King E. J., Armstrong A. R.: *Microanalysis in medical biochemistry*. Canad. M. A. J., 1934, 31, 376—381.
9. Lowry C. H., Rosenbrough S. M., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—270.
10. Mardaszew S. R., Nikołajew A., Ewisieju A. P.: Indukcja asparginaznoy i glutaminaznoy aktywnostiej u *Pseudomonas sp. asparginowoj* i glutaminowoj kislótami. *Biochimija*, 1967, 32, 1093—1098.
11. Mc Ilwain H., Bachelard H. S.: *Biochemistry and the nervous system*. Williams and Wilkins, Baltimore 1971.
12. Mossakowski M. J.: Experimental modelling of hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 261—276.



13. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 365—374.
14. Neumann U., Heier B., Haschen R. J.: Tierexperimentelle untersuchungen über Mechanismen der Ammoniakfixation ausserhalb des Harnstoffzyklus. [In:] *Aminosäuren, Ammoniak und hepatische Enzephalopathie*. Eds: F. We-walka, B. Dragoscis, G. Fischer, Stuttgart, New York 1978, pp. 78—85.
15. Rowe W. B., Ronzio R. A., Weller V. P., Meister A.: Glutamine synthetase (sheep brain). [In:] *Methods in enzymology*. vol. 17. Ed.: H. Tabor. Acad. Press 1970, pp. 900—910.
16. Schmidt E.: Glutamate dehydrogenase. [In:] *Methods in enzymatic analysis*. Ed.: H. V. Bergmeyer. Acad. Press, New York 1965.
17. Vergara F., Plum F., Duffy T. E.:  $\alpha$ -ketoglutaramate: increased concentrations in cerebrospinal fluid of patients in hepatic coma. *Science*, 1974, 183, 81—83.
18. Vorbrodt A., Stęplewski Z., Krzyżowska-Gruca S.: The effect of thioacetamide on the rat liver parenchymal cells. *Folia Hist. Cytochem.*, 1966, 8, 11—22.
19. Zieve L.: Hepatic encephalopathy: summary of present knowledge with elaboration of recent development. [In:] *Progress in liver disease*. Vol. 6. Eds: H. Popper, F. Schaffner; Grune and Stratton, New York 1979, pp. 327—341.

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



ZUZANNA KRAŚNICKA, JAN ALBRECHT, BARBARA GAJKOWSKA,  
MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI

THIOACETAMIDE-INDUCED HEPATIC  
ENCEPHALOPATHY IN THE RAT

II. CYTOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL STUDIES  
ON ASTROCYTES CULTURED *IN VITRO*

Department of Neuropathology and Laboratory of the Nervous System  
Ultrastructure, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences

The use of hepatotoxic agents to produce liver damage has become a routine procedure in studies on experimental hepatic encephalopathy (for a review see Diemer 1978). In the preceding paper we have emphasized some advantages of using thioacetamide (TAA \*) as a hepatotoxic compound which rapidly and reproducibly induced changes in blood parameters and brain metabolism resembling those observed both in other experimental models and in human subjects suffering from hepatic failure (Hilgier et al. 1983). In general, however, the results obtained with the use of hepatotoxic models cannot be interpreted unambiguously. The major problem is the difficulty to distinguish between the events related to liver damage and the direct neurotoxic effects caused by the agent or its metabolites. The present work was an attempt to evaluate separately the hepatogenic and direct neurotoxic aspects of the thioacetamide model, with the emphasis on the morphology and ultrastructure of the astrocytes as the primary target cell in hepatic encephalopathy. To this end, we have compared the effect of TAA itself and of the serum obtained from rats treated with TAA according to the previously established protocol (Hilgier et al. 1983), on astrocytes grown in tissue culture *in vitro*.

---

\* Abbreviations used: TAA — thioacetamide, GDH — glutamic acid dehydrogenase, SDH — succinic acid dehydrogenase, G6PDH — glucose-6-phosphate dehydrogenase.



## MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on 3-week organotypic cultures of the newborn rat cerebellum, carried out in a routine way (Kraśnicka, Mossakowski 1965). Cultures designed as experimental group I were grown for 3 days in the media containing the sera derived from rats given two intraperitoneal injections of TAA in the dose of 250 mg per kg body weight at 24 h intervals (Hilgier et al. 1983). The animals were exsanguinated 48 h after the second TAA injection. The sera of TAA-treated animals composed 50 percent of the total volume of culture medium. In the experimental group II the toxic agent was given directly to the culture medium in final concentration of either 25 or 50 mg<sup>0</sup>/. The exposure to TAA in cultures with its lesser concentration lasted 2, 4 and 6 days, while in those with higher concentration of the toxic agent only 2 days. Control cultures were grown in the routine medium for the time periods corresponding to those in experimental groups I and II.

For light microscopic observations the cultures were stained according to the Nissl and PAS methods. Histochemical reactions disclosing the GDH, SDH and G6PDH activities were performed as described previously (Mossakowski et al. 1970).

The material for electron microscopic studies was routinely fixed and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined under the JEM 7A electron microscope.

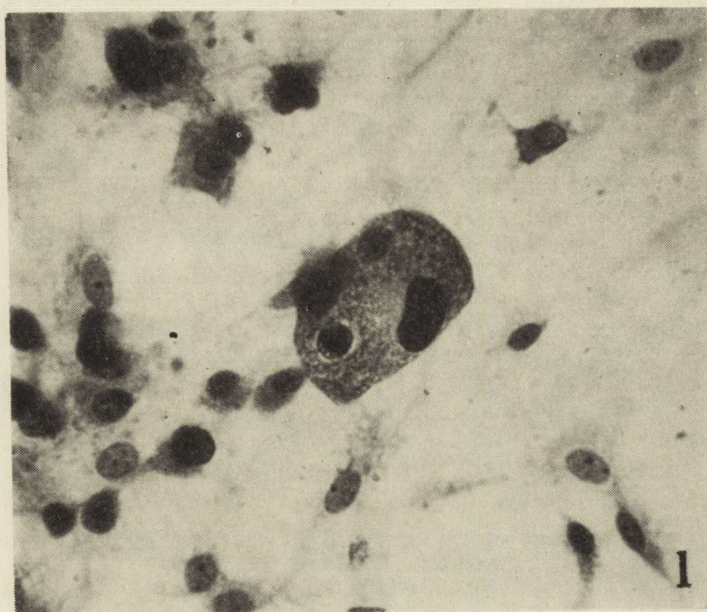
## RESULTS

*Group I*

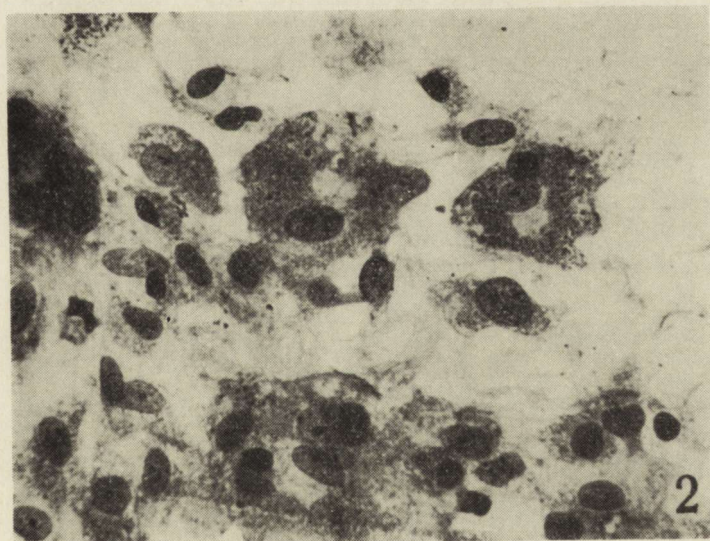
Light microscopic observations of cultures grown in the sera derived from TAA-treated rats revealed the presence in all of them of single or grouped hypertrophied glial cells (Fig. 1). These astrocytes acquired oval shape, were mostly depleted of processes and contained one or more of hyperchromatic nuclei on the cell periphery. Their cytoplasm was filled with coarse, PAS-positive granules (Fig. 2). The GDH and SDH activities were decreased as compared with the control cultures in all the glial cells, including the pathological forms described above, while the G6PDH reaction was enhanced in the hypertrophied cells lacking processes or with rudimentary processes, but unchanged in normal astroglia.

Electron microscopic examination of this group disclosed likewise typical astrocytic changes. The majority of astroglial cells contained abundant cytoplasm and light nuclei with uniformly distributed chromatin, except for some condensations adjacent to the nuclear envelope.



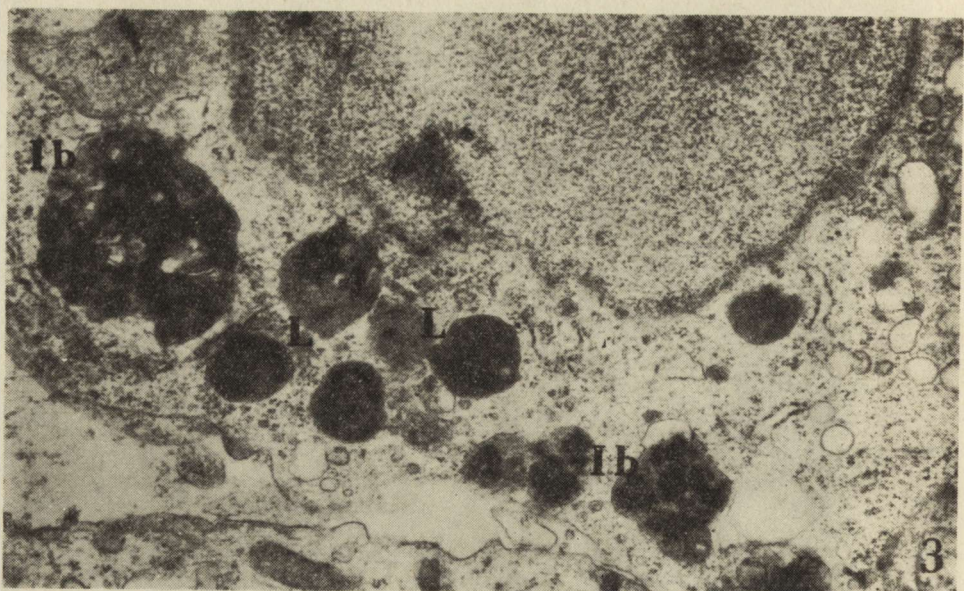


*Fig. 1.* Group I. Polynuclear Opalski cell free of processes. Nissl.  $\times 400$   
*Ryc. 1.* Grupa I. Wielojądrzasta, bezwypustkowa komórka Opalskiego. Nissl. Pow.  $400 \times$



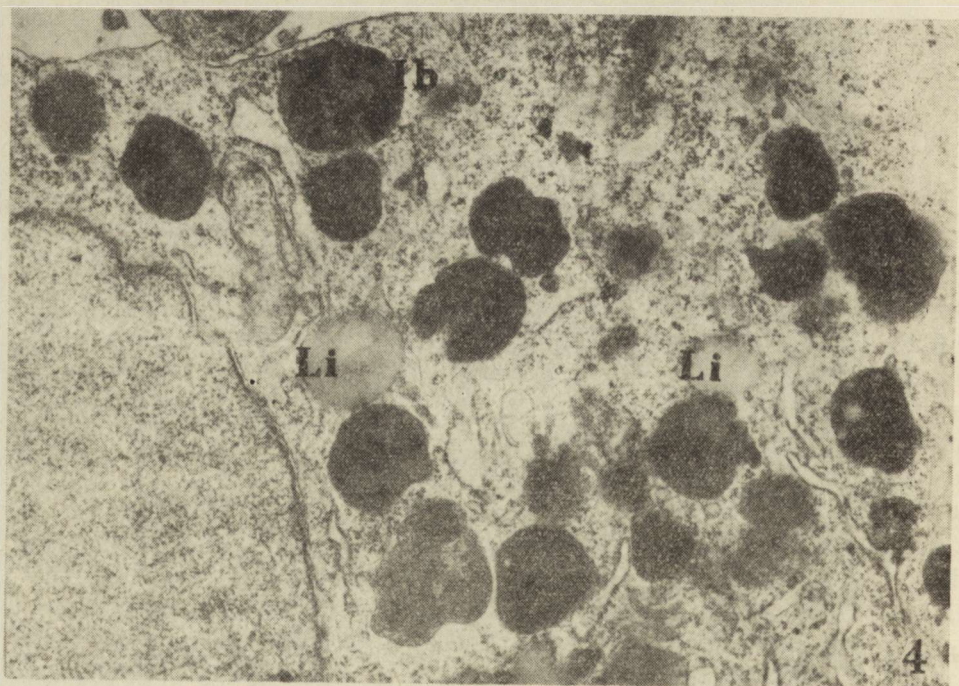
*Fig. 2.* Group I. Numerous hypertrophied astrocytes (Opalski-like cells) with coarse PAS-positive granules in the cytoplasm. PAS.  $\times 400$   
*Ryc. 2.* Grupa I. Liczne hipertroficzne astrocyty, podobne do komórek Opalskiego z gruboziarnistym PAS-dodatnim odczynem w cytoplazmie. PAS. Pow.  $400 \times$





*Fig. 3.* Group I. Fragment of Opalski cell. In the cytoplasm numerous lysosome-like bodies (L), large membrane-bounded inclusion bodies (Ib), containing granular and amorphous material and small mitochondria.  $\times 21\ 700$

*Ryc. 3.* Grupa I. Fragment komórki Opalskiego. W cytoplazmie liczne ciała lizosomo-podobne (L), duże obłonione ciała wtrętowe (Ib), zawierające ziarnisty i bezpostaciowy materiał oraz drobne mitochondria. Pow. 21 700  $\times$



*Fig. 4.* Group I. Astrocyte fragment. In the cytoplasm inclusion body (Ib), numerous lysosome-like structures and lipid droplets (Li).  $\times 21\ 700$

*Ryc. 4.* Grupa I. Fragment astrocyta. W cytoplazmie ciało wtrętowe (Ib) oraz liczne struktury lizosomo-podobne i krople lipidów (Li). Pow. 21 700  $\times$



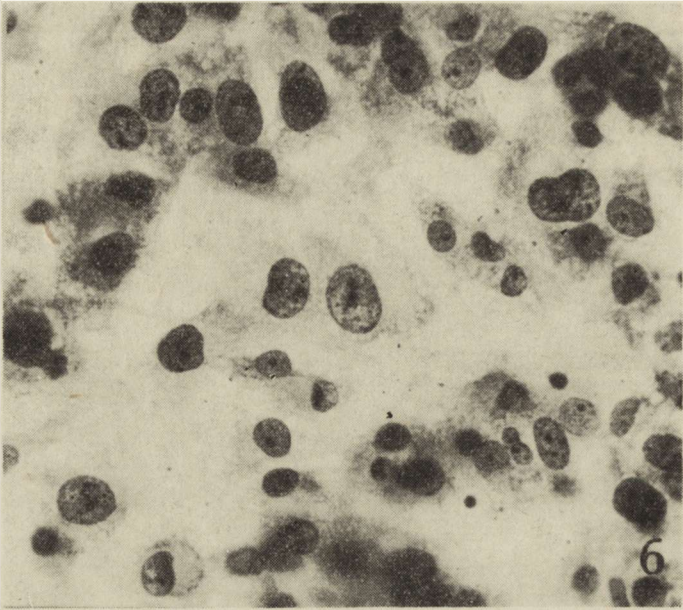
The mitochondria were small or elongated and less numerous than in the control astrocytes. The endoplasmic reticulum appeared in the form of short, slightly dilated channels covered with randomly distributed ribosomes. The Golgi apparatus was poorly developed and formed



*Fig. 5.* Group I. Fragment of neuron and oligodendrocyte. Apparently normal ultrastructure of nerve cell (N) and numerous lipid droplets (Li) in the oligodendrocyte cytoplasm.  $\times 28\ 200$

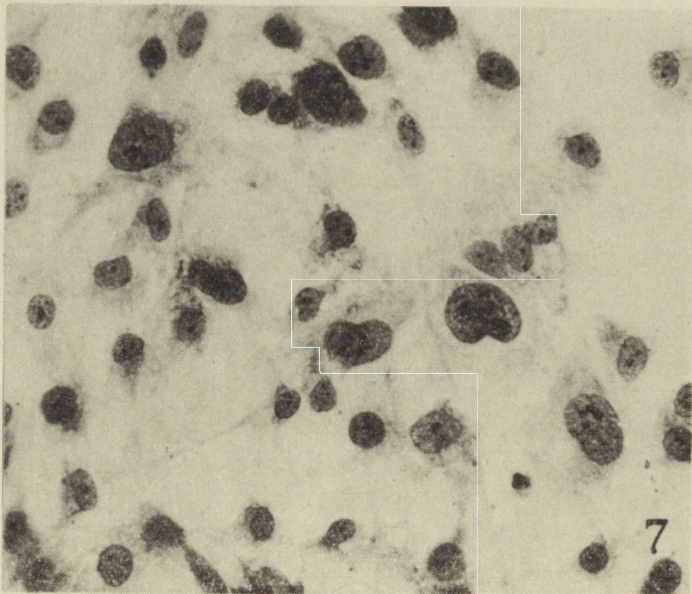
*Ryc. 5.* Grupa I. Fragment komórki nerwowej i oligodendrocyta. Prawidłowa struktura komórki nerwowej (N) i liczne krople lipidowe (Li) w cytoplazmie oligodendrocyta. Pow.  $28\ 200 \times$





*Fig. 6.* Group II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 4 days). Swelling and vacuolization of astrocytic cytoplasm. Polymorphous astrocytic nuclei. Nissl.  $\times 400$

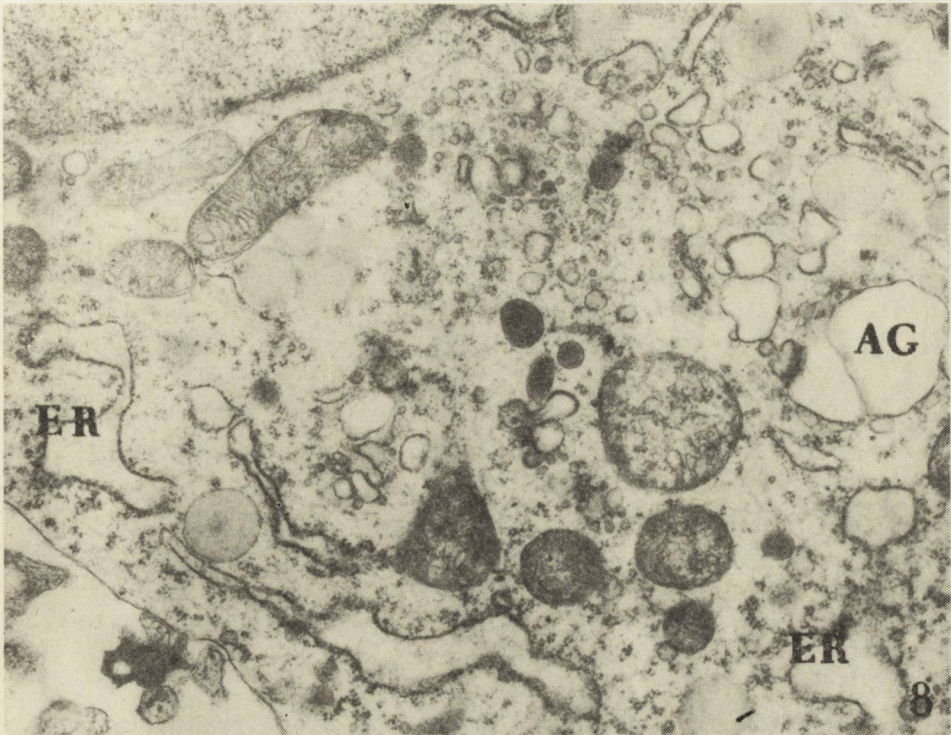
*Ryc. 6.* Grupa II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 4 dni). Obrzmienie i wakuolizacja cytoplazmy astrocytów oraz znaczny polimorfizm ich jąder. Nissl. Pow. 400  $\times$



*Fig. 7.* Group II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 6 days). Significant destruction of the astrocytic cytoplasm. Glial cell nuclei of different size and shape. Nissl.  $\times 400$

*Ryc. 7.* Grupa II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 6 dni). Znaczne uszkodzenie cytoplazmy astrocytów oraz zróżnicowanie kształtów i wielkości ich jąder. Nissl. Pow. 400  $\times$





*Fig. 8.* Group II (TAA 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 2 days). Astrocyte fragment. Dilated endoplasmic reticulum channels (ER), containing electron-lucid material. Some channels of Golgi apparatus are also distended (AG).  $\times 28\ 200$

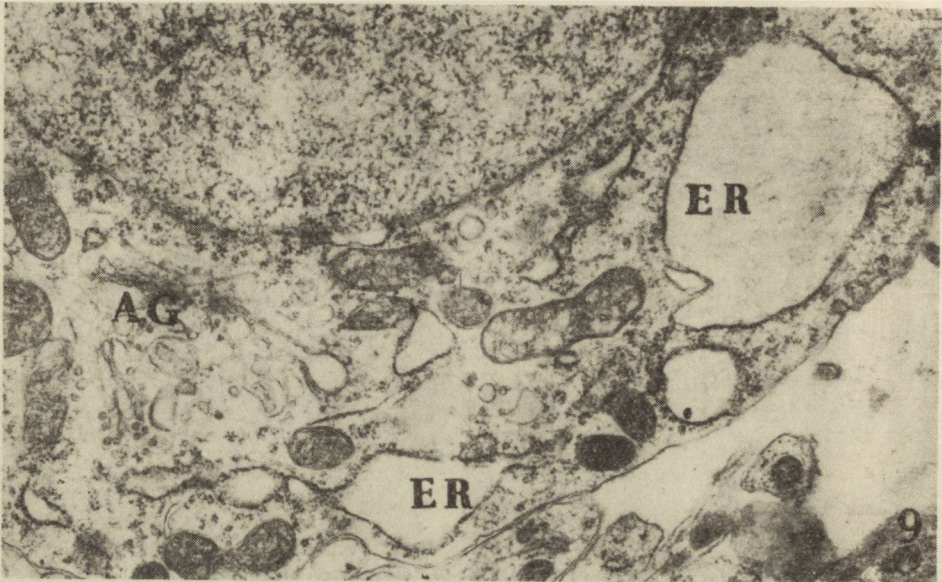
*Ryc. 8.* Grupa II (TAA 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 2 dni). Fragment astrocyta z poszerzonymi kanałami siateczki śródplazmatycznej (ER), zawierającymi elektronowo-jasny materiał. Niektóre kanały aparatu Golgiego (AG) znacznie poszerzone. Pow. 28 200  $\times$

typical grouping of channels and vesicles. Some of the astroglial cells with abundant cytoplasm contained membrane-bounded inclusion bodies of irregular shape and different sizes composed in part of aggregated electron-dense material (Fig. 3). Beside, the cells were characterized by the presence of numerous lysosome-like structures (Figs 3, 4). No significant structural changes of nerve cells or myelin were observed in this group. The oligodendrocytes contained numerous lysosomes and lipid droplets (Fig. 5).

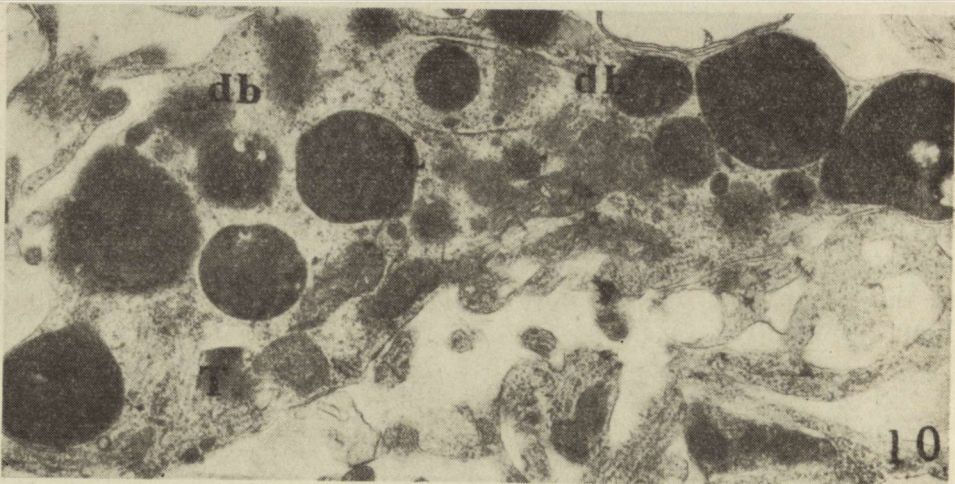
#### *Group II*

The cultures grown with 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> TAA for 2 days showed no light microscopic changes. Prolonged TAA treatment (for 4 or 6 days) induced distinct morphological alterations in the whole cell population in the growth region. The glial cells were characterized by swollen cytoplasm with numerous vacuoles (Fig. 6) and contained enlarged, in a few instances kidney-shaped nuclei (Fig. 7). Pronounced degenerative changes hampered the distinction of the particular cell types. Glial cell



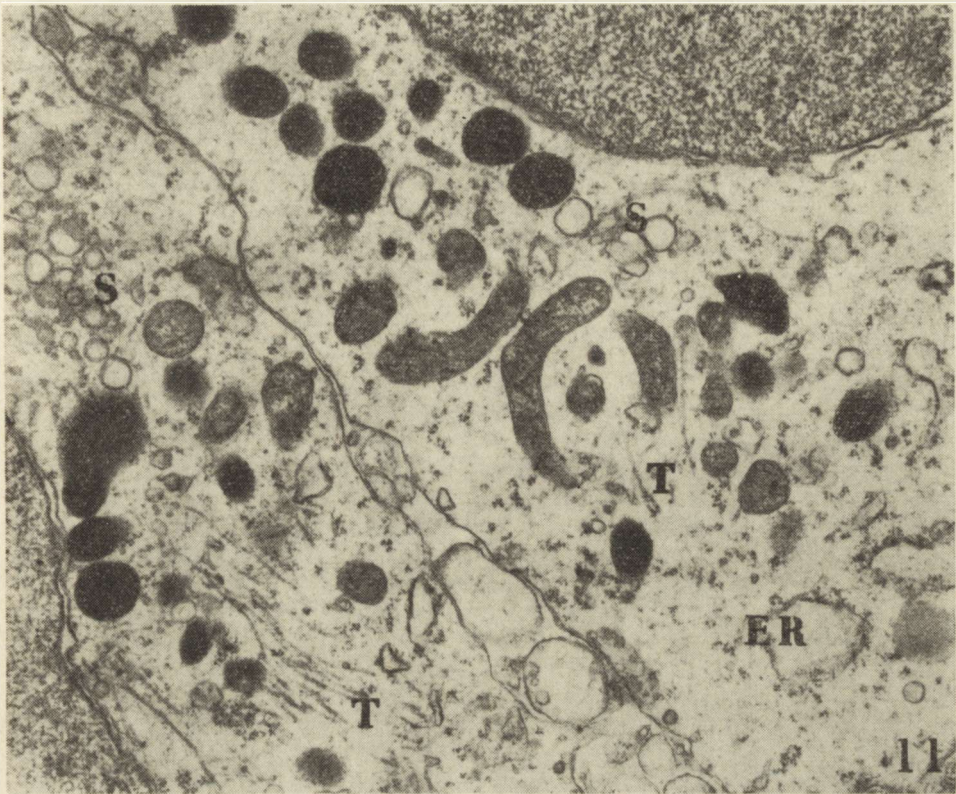


*Fig. 9.* Group II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 2 days). Astrocyte fragment. Cytoplasm with markedly dilated rough endoplasmic reticulum channels (ER) poor in ribosomes. Small mitochondria and very poorly developed Golgi apparatus (AG).  $\times 21\ 700$   
*Ryc. 9.* Grupa II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 2 dni). Fragment astrocyta z cytoplazmą zawierającą znacznie poszerzone kanały szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (ER) ubogie w rybosomy. Drobne mitochondria i bardzo słabo rozwinięty aparat Golgiego (AG). Pow. 21 700  $\times$



*Fig. 10.* Group II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 2 days). Oligodendrocyte fragment, containing numerous lysosome-like structures (L), dense bodies (db), microtubules (T) and small shrunken mitochondria with dark matrix.  $\times 28\ 200$   
*Ryc. 10.* Grupa II (TAA 25 mg<sup>0/0</sup>, 2 dni). Fragment oligodendrocyta, którego cytoplazma zawiera liczne struktury lizosomo-podobne (L), ciała gęste (db), mikrotubule (T) oraz małe obkurczone mitochondria z ciemną macierzą. Pow. 28 200  $\times$





*Fig. 11.* Group II (TAA 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 6 days). Fragment of astrocyte with pale cytoplasm containing short segments of dilated rough (ER) and smooth (S) endoplasmic reticulum channels, numerous lysosome-like structures and microtubules (T).  $\times 21\,700$

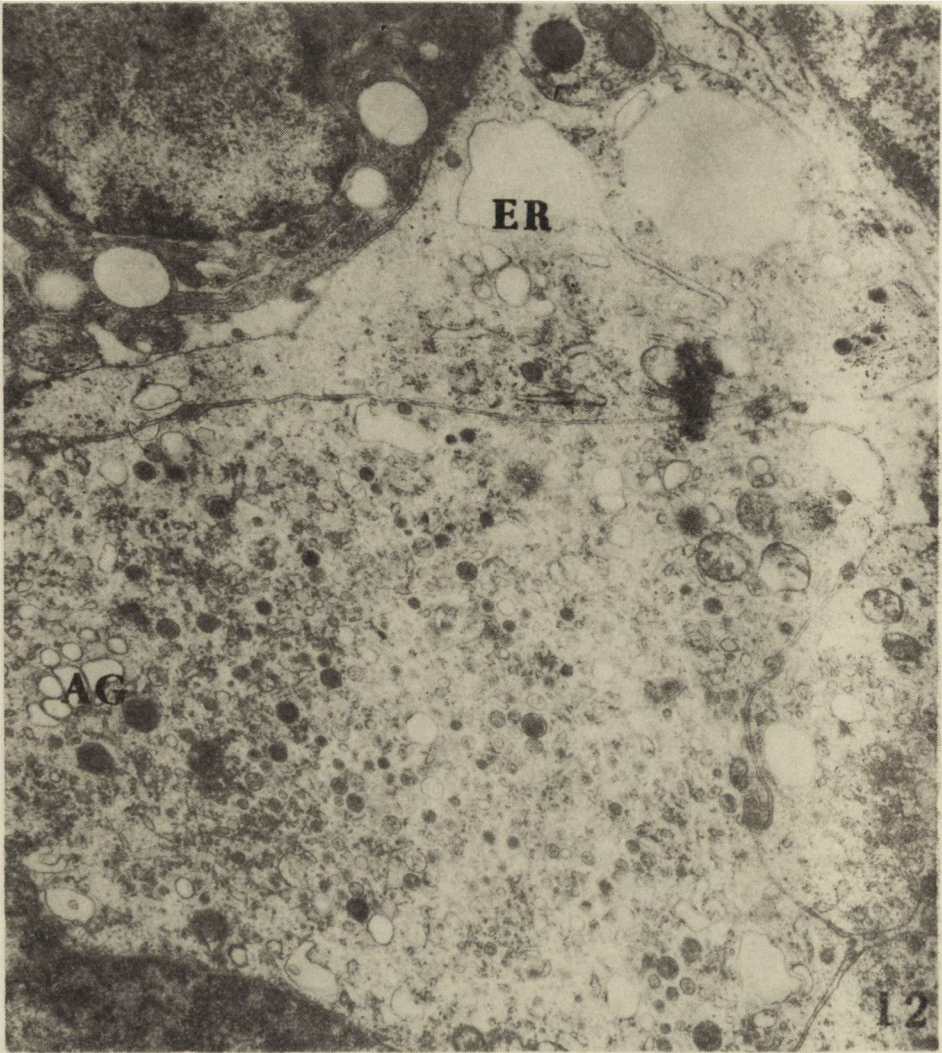
*Ryc. 11.* Grupa II (TAA 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 6 dni). Fragment astrocyta z jasną cytoplazmą zawierającą krótkie odcinki kanałów szorstkiej (ER) i gładkiej (S) siateczki śródplazmatycznej, liczne struktury lizosomo-podobne i mikrotubule (T). Pow. 21 700  $\times$

cytoplasm contained fine PAS-positive granules. The histoenzymatic reactions revealed decreased activities of all the three dehydrogenases examined.

Application of TAA in the higher dose (50 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>) led to significant changes already within 2 days after administration. The changes mostly involved the astrocytes. The astrocytic nuclei were enlarged, pale, with a distinct nuclear membrane and dark nucleolus. The cytoplasm did not stain and its residual fragments accumulated around nuclei. Some of the cells showed swollen cytoplasm and the presence of small vacuoles. Most of the glial cells contained PAS-positive substance in the form of fine granular deposits. The enzymatic reactions disclosed only traces of GDH and SDH activities and a somewhat higher G6PDH activity.

Electron microscopic observations of the cultures subjected to a 25 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> TAA dose for 2 days revealed ultrastructural changes mostly





*Fig. 12.* Group II (TAA 50 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 2 days). Fragments of some glial cells. In the upper part a cell with baloon-like dilatation of the rough endoplasmic reticulum channels (ER). Adjacent cell with numerous small lysosomes and vesicular structure of the smooth endoplasmic reticulum. AG — Golgi apparatus. In the upper left part fragment of oligodendrocyte.  $\times 28\ 200$

*Ryc. 12.* Grupa II (TAA 50 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, 2 dni). Fragmenty kilku komórek glejowych. W górnej części komórka z balonowato rozdętymi kanałami szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (ER). Przylegająca komórka zawiera liczne drobne lizosomy i pęcherzykowe struktury siateczki gładkiej. AG — aparat Golgiego. W górnej lewej części fragment oligodendocyta. Pow. 28 200 $\times$

involving astrocytes. Astrocytic nuclei were chromatin-poor, with evenly distributed chromatin granules. Some of them revealed segregation of the nucleolar material. Most of the astrocytes had dilated rough endoplasmic reticulum channels filled with electron-lucid material (Figs 8, 9). In a number of cells slight cytoplasm swelling with a significant deple-



tion of cellular organellae were observed. The majority of mitochondria were small, but ultrastructurally normal. Golgi apparatus was moderately developed with some channels dilated. Oligodendrocytes contained in the cytoplasm increased number of dense bodies, lisosome-like structures, lipid droplets, glial tubules and small and shrunk mitochondria with a dark matrix (Fig. 10).

After 4 days of TAA treatment the ultrastructural changes in the glial cells became more pronounced. The cytoplasm of astrocytes contained an increased number of lysosomes and abundance of glial tubules and glial filaments. Some of the cells were characterized by the proliferation of smooth endoplasmic reticulum in the form of small vesicles.

In the cultures subjected to TAA for 6 days a further progression of ultrastructural changes was observed. The dilated rough endoplasmic reticulum transformed into vesicular structures, mostly free of ribosomes. In some of the cells regions of cytoplasm free of organelles or their fragments were visible. In other cells proliferation of smooth endoplasmic reticulum was observed to appear in the form of numerous vesicles (Fig. 11). The astrocytic processes were rich in glial filaments. The most significant changes in the ultrastructure of astrocytes became apparent in the cultures subjected to a 2-day TAA treatment in a 50 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> dose. The cell nuclei contained chromatin aggregates under the envelope and electron dense nucleoli with a distinct granular part. Mitochondria were markedly swollen and enlarged, with an electron transparent matrix and rudimentary cristae. The rough endoplasmic reticulum channels were very dilated in most of the cells, and in some of them proliferation of the smooth endoplasmic reticulum was observed. The Golgi apparatus was poorly developed and forming vesicular structures (Fig. 12).

#### DISCUSSION

Since it is difficult to assume the existence of a selective hepatotoxic agent capable of inducing hepatogenic encephalopathy without interference of other pathological processes in the brain, less rigid criteria may be proposed favouring the selection of an agent to be applied in experimental studies. From the theoretical perspective, preference will be given to a compound which affects the liver: a) rapidly enough to ensure that, the onset of changes in the brain which are subsequent to the liver damage will precede both the manifestation of direct neurotoxic effects of the compound or its metabolites and the influence of disturbed function of other organs; b) strongly enough to render hepatogenic effects which will mask all the other effects. A number of earlier data have indirectly indicated that thioacetamide is the compound that might at least in part conform to such criteria. It was observed that intra-



peritoneal administration of this chemical into rats in doses similar to those applied in this study produced almost instantly degenerative changes in liver (Vorbrot et al. 1966; Vorbrot, Krzyżowska-Gruca 1970; Olason, Smuckler 1976). As to the neuropathological effects, this compound has not been thoroughly screened and the available data come, to our knowledge, from only few experimental approaches (Holm et al. 1977). Noteworthy in the context with this study is, however, that Holm and coworkers (1977) have noticed changes in EEG indicative of hepatic coma and morphological alterations in the glia of the cat brain following only two administrations of 50 mg per kg body weight of the compound in 24 h intervals. Considering that carbon tetrachloride, so far the most commonly used agent in such studies, produced changes of similar character and magnitude not earlier than after 4–6 months of continuous administration by the same route (Hilgier 1980; 1981a, b), thioacetamide appeared to be the compound of choice, if only for practical reasons.

Recent studies in this laboratory, in addition to confirming the rapid onset of degenerative changes in the liver following the administration of thioacetamide, have demonstrated that these changes are accompanied by the activation of enzymes involved in ammonia metabolism in the brain, which is the phenomenon typical for the early stages of hepatogenic encephalopathy (Hilgier et al. 1983). Although these results have rendered strong arguments in favor of the thioacetamide model, at least two essential questions related to the relevance of this model remained to be answered:

1) Do these biochemical changes in the brain reflect — or have the potential to develop to — the typical morphological and ultrastructural manifestations of hepatic encephalopathy?

2) What kind of changes are brought about by factors appearing in the blood subsequently to liver damage and what, in turn, is the contribution of thioacetamide itself?

Both questions directly pertain to the criteria to which a relevant hepatotoxic agent should conform. Beside, the second question is of importance in light of the possibility that thioacetamide or its metabolites may be transported across the blood-brain barrier, though a direct evidence is still missing.

The present study appears to give answers to these questions, which favour the selection of thioacetamide as a factor inducing hepatogenic encephalopathy. Incubation of astroglia cultures in the presence of sera derived from rats treated with thioacetamide long enough to produce liver damage resulted in the formation of pathological forms of astrocytes strikingly resembling those observed in other experimental hepatogenic gliopathies. The morphological features of these cells, such as large size, oval shape, lack of processes, granular cytoplasm and peri-



pherally situated nucleus, as well as their enzymatic properties including high G6PDH and low SDH and GDH activities, are virtually identical to those described for Opalski cells *in vitro* (Mossakowski et al. 1970). On the ultrastructural level, this similarity finds manifestation in the presence of inclusion bodies in the cytoplasm of astrocytes and changes in their normal cytoplasmic organelles (Mossakowski et al. 1971). Noteworthy, the other cell types of CNS present in the culture were much less affected by the sera, which agrees well with the picture observed as a rule in various forms of encephalopathy of hepatic origin (Mossakowski 1978). Thioacetamide added directly to the cultures of rat cerebellum tissue induced marked degenerative changes in the cells, which may be interpreted to reflect a generalized cytotoxic effect of the compound. These direct effect does not show any cellular selectivity. Moreover identical subcellular changes were previously observed to follow the administration of the compound to a variety of tissue ranging from rat liver parenchyma (Vorbrodt et al. 1966), to human fibroblasts and yeast cell cultures (Diala et al. 1980).

All the results suggest that, the gliopathy induced *in vitro* by the sera from thioacetamide-treated rats is causally related to the presence in these sera of factors which appear in the blood secondarily to liver impairment. The absence of direct effects of thioacetamide is not surprising, since the compound will most likely have disappeared from blood two days after administration, although this assumption remains to be confirmed experimentally. Hence, from the practical perspective, such a serum appears to be an excellent starting material for the fractionation of pathogenic factors involved in hepatogenic encephalopathy. Subsequently, this would allow to screen and classify the factors according to their pathogenic potential and to the character of morphological and biochemical changes they produce. The relevance of using such an experimental approach is underscored by the multitude of putative hepatogenic factors which have been suggested to be encephalopathic and which may be transported with the serum to the brain, but the role of which in inducing specific glial changes has not been conclusively established (for recent reviews see Fischer 1974; Mossakowski 1978; Zieve 1981). In the preceding paper we have demonstrated the increased levels of ammonia and phenols in sera of rats treated with thioacetamide according to the same protocol (Hilgier et al. 1983). While the role of the former in hepatogenic encephalopathy has been repeatedly confirmed in different experimental approaches, including direct tests in astrocytic cultures (Mossakowski et al. 1970), the pathogenic effects of phenolic compounds in the brain, though speculated upon, have not been studied in detail (Holm et al. 1977). Furthermore, in light of what has been said above, the two factors are unlikely exhausting the list of compounds present in the serum which may be pathogenic to the



brain. Further studies in this laboratory will be directed towards revealing the nature of these compounds.

The purity of the thioacetamide model needs to be further verified in studies *in vivo*. This verification is of particular importance in light of the possibility that the compound or its metabolites may penetrate the brain tissue and exert their neurotoxic action at early times after administration, before having been cleared from the body. In this connection, more information is needed about the permeability of the blood-brain barrier to thioacetamide and the metabolism of this compound.

### ENCEFALOPATIA WĄTROBOWA U SZCZURA WYWOŁANA PODAWANIEM TIOACETAMIDU

#### II. Badania cytochemiczne i ultrastrukturalne astrocytów w hodowli *in vitro*

#### Streszczenie

Przeprowadzono ocenę wpływu tioacetamidu (TAA) — czynnika hepatotoksycznego prowadzącego w warunkach *in vivo* do rozwoju encefalopatii wątrobowej — na astrocyty w organotypowej hodowli mózdzku noworodków szczurzych.

Doświadczenia prowadzono w dwóch grupach. W pierwszej TAA podawano bezpośrednio do środowiska odżywczego hodowli w stężeniu 25 i 50 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, w grupie drugiej hodowle prowadzono w środowisku zawierającym surowicę zwierząt traktowanych uprzednio tym czynnikiem. Dodatek do hodowli surowicy zwierząt zatrutych tioacetamidem wywoływał w astrocytach zmiany charakterystyczne dla gliopatii wątrobowej, znane z doświadczeń z innymi czynnikami patogennymi, a wyrażające się pojawieniem się przerosłych komórek gwiazdzistych pozbawionych wypustek, których cytoplazma wypełniona była ziarnistymi złogami PAS-dodatnimi. Zmianom tym w obrazie mikroskopowo-elektronowym odpowiadały nieprawidłowości szorstkiej siateczki śródplazmatycznej i mitochondriów oraz obecność ciał wtętowych w cytoplazmie. Sam TAA wywoływał nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe astrocytów. Uzyskane wyniki wskazują, że patogenny czynnik (lub czynniki) prowadzący do rozwoju gliopatii wątrobowej znajduje się w surowicy zwierząt z uszkodzoną przez tioacetamid wątrobą. Nie jest nim natomiast sam czynnik hepatotoksyczny.

### ПЕЧЕНОЧНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ У КРЫСЫ ВЫЗВАННАЯ ВВЕДЕНИЕМ ТИОАЦЕТАМИДА

#### II. Цитохимические и ультраструктурные исследования астроцитов в культуре

#### Резюме

Произведено оценку влияния тиоацетамида (ТАА) — гепатоксического фактора, ведущего в условиях *in vivo* к развитию печеночной энцефалопатии, на астроциты в органотипичной культуре мозжечка крысиновых новорожденных.



Эксперименты проводились в двух группах. В первой группе ТАА вводили непосредственно в жидкую среду культуры в концентрации 25 и 50 мг%, во второй группе культуру проводили в среде содержащей сыворотку животных подверженных предварительно действию этого фактора. Добавка к культуре сыворотки животных отравляемых тиаоацетамидом вызывала в астроцитах изменения характерные для печеночной глиопатии, известные из экспериментов с другими патогенными факторами и выражающиеся в появлении переросших звездчатых клеток лишенных отростков, цитоплазма которых была выполнена гранулезными отложениями PAS положительными. Этим изменениям в электронно-микроскопической картине соответствовали аномалии шорховатой средиплазматической сети и митохондрий, а также наличие инклюзионных тел в цитоплазме. ТАА введенный в культуру вызывал неспецифические дегенеративные изменения астроцитов. Полученные результаты показывают, что патогенный фактор (или факторы) ведущий к развитию печеночной глиопатии находится в сыворотке животных с поврежденной тиаоацетамидом печенью. Но сам гепатотоксический фактор не является патогенным фактором.

## REFERENCES

1. Diala E., Mittwoch U., Wilkie D.: Antimitochondrial effects of thioacetamide and ethylenethiourea in human and yeast cell cultures. *Br. J. Cancer*, 1980, 42, 112—120.
2. Diemer N. H.: Glial and neuronal changes in experimental hepatic encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.*, 1978, suppl. 71, 58, 1—144.
3. Fischer J. E.: Hepatic coma in cirrhosis, portal hypertension, and following portocaval shunt. *Arch. Surg.*, 1974, 108, 325—338.
4. Hilgier W.: Zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu i glutaminianu w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 121—126.
5. Hilgier W.: Zawartość glutaminy oraz aktywność aminotransferazy glutaminowej w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1981a, 19, 67—73.
6. Hilgier W.: Zawartość amoniaku oraz aktywność syntetazy glutaminowej i glutaminazy w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1981b, 19, 351—358.
7. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
8. Holm E., Striebel P., Munzenmaier R., Kaltermann R.: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. *Leber Magen Darm*, 1977, 7, 241—254.
9. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
10. Mossakowski M. J.: Experimental studies on the pathogenesis of hepatogenic encephalopathy. *Riv. Patol. Nerv. Ment.*, 1978, 37, 25—36.
11. Mossakowski M. J., Borowicz J. W., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Ultrastructure of Opalski cells cultured *in vitro*. *Acta neuropath.*, (Berl.) 1971, 19, 301—306.
12. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatic gliopathy in tissue culture. *Acta neuropath.*, (Berl.) 1970, 16, 1—16.
13. Olason D., Smuckler E. A.: Changes in hepatic nuclei induced by acetamide and thioacetamide. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1976, 100, 415—418.
14. Vorbrodts A., Krzyżowska-Gruca S.: The effect of thioacetamide on the embryonic rat liver and hepatoma cells. *Folia Hist. Cytochem.*, 1970, 8, 11—22.



15. Vorbrodt A., Stęplewski Z., Krzyżowska-Gruca S.: The effect of thioacetamide on the rat liver parenchymal cells. *Folia Hist. Cytochem.*, 1966, 4, 7—20.
16. Zieve L.: The mechanism of hepatic coma. *Hepatology* 1981, 1, 360—365.

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



WOJCIECH HILGIER

ENCEFALOPATIA WĄTROBOWA U SZCZURA WYWOŁANA  
PODAWANIEM TIOACETAMIDU  
III. ZAWARTOŚĆ AMONIAKU I SUBSTRATÓW JEGO METABOLIZMU  
W MÓZGU

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Nieswoiste uszkodzenia wątroby o przebiegu przewlekłym i podostрым mogą stanowić podłoże zespołu neurologicznego, któremu towarzyszą charakterystyczne zmiany patologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym. Patomechanizm uszkodzeń OUN w chorobach wątroby, prowadzących do jej niewydolności, nie jest dotychczas jednoznacznie wyjaśniony. Najpowszechniej przypuszcza się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za patogenezę zespołu encefalopatii wątrobowej jest toksyczne działanie amoniaku, którego poziom w tym zespole znacznie wzrasta zarówno w surowicy krwi, jak i w mózgu (Kyu, Cavanagh 1970; Cavanagh, Kyu 1971; Hindfelt 1975; Hindfelt i wsp. 1977; Lockwood i wsp. 1979; Hilgier 1981b).

Dotychczasowe badania nad metabolizmem amoniaku w mózgu, w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej, były prowadzone z zastosowaniem następujących modeli doświadczalnych: 1) operacyjne wytworzenie pozawątrobowego przepływu krwi wrotnej; 2) doświadczalne upośledzenie metabolizmu amoniaku przy nieuszkodzonym miększu wątroby i zachowanym krążeniu wrotnym; 3) doświadczalne uszkodzenie wątroby przy zastosowaniu substancji chemicznych.

Najczęściej stosowano dwa pierwsze modele doświadczalne, w których jednakże nie dochodzi do metabolicznego upośledzenia funkcji wątroby. W modelu trzecim uszkodzenie wątroby wywoływane przeważnie podawaniem czterochloru węgla (CCl<sub>4</sub>) wymagało długotrwałego (6-miesięcznego) działania środka uszkadzającego.

W naszym zespole opracowano nowy model toksycznej encefalopatii wątrobowej wywołanej tioacetamidem. Już po 48-godzinnym zatruciu w obrazie morfologicznym mózgu obserwowano zmiany o cechach charakterystycznych dla encefalopatii wątrobowej (Hilgier i wsp. 1983). Podobne obrazy obserwowano w badaniach na hodowlach tkankowych,



którym do medium inkubacyjnego dodawano surowice pochodzące od zwierząt poddanych zatruciu tioacetamidem i zawierające zwiększony poziom amoniaku oraz fenoli (Kraśnicka i wsp. 1983).

Celem pracy jest ocena zawartości amoniaku,  $\alpha$ -ketoglutaranu, glutaminianu i glutaminy, substratów biorących udział w cyklu metabolizmu amoniaku w OUN, w modelu toksycznej encefalopatii wątrobowej wywołanej działaniem tioacetamidu.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 154 szczurach rasy Wistar, samicach. Uszkodzenie wątroby wywoływano przez dootrzewnowe wstrzykiwanie roztworu tioacetamidu w dawce 250 mg/kg masy ciała (Hilgier i wsp. 1983). Zwierzęta kontrolne otrzymywały w tych samych warunkach dootrzewnowe iniekcje fizjologicznego roztworu soli w tej samej objętości.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację bez użycia narkozy w następujących grupach: grupa I — jednorazowa iniekcja i dekapitacja po 24 godzinach; grupa II — dwukrotna iniekcja w odstępie 24 godzin i dekapitacja po 24 godzinach; grupa III — dwukrotna iniekcja w odstępie 24 godzin i dekapitacja po 7 dniach od ostatniej iniekcji.

Do badań biochemicznych pobierano obie półkule mózgowie natychmiast po dekapitacji. Przeprowadzano oznaczenia zawartości amoniaku,  $\alpha$ -ketoglutaranu, glutaminianu oraz glutaminy.

Poziom amoniaku oznaczano przy zastosowaniu odczynnika Nesslera według metody opisanej przez Sadasivudu i wsp. (1977).

Ze świeżo pobranych półkul sporządzano 10% homogenaty, w oziębionym do temperatury około 4°C TCA, w homogenizatorze typu szkło—szkło. Homogenaty wirowano 10 min przy 2000  $\times$  g. Do 1 ml uzyskanego nadsącza dodawano 0,5 ml odczynnika Nesslera i 2 ml wody redestylowanej. Gęstość optyczną roztworu odczytywano przy długości fali 420 nm.

Poziom  $\alpha$ -ketoglutaranu oznaczano metodą spektrofotometryczną według Bergmeyera i Bernta (1963), przy użyciu dehydrogenazy glutaminianowej. Półkule mózgu homogenizowano w 4 objętościach 0,6 M kwasu nadchlorowego ( $\text{HClO}_4$ ), a następnie wirowano 10 min przy 3000  $\times$  g. Pobierano 4 ml nadsącza, doprowadzano do pH 7,6 przy użyciu 1 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$ , odstawiano na 10 min do łaźni lodowej, a następnie odsączano wytrącony  $\text{KClO}_4$ . Przesącz doprowadzano do temperatury pokojowej. Mieszanina reakcyjna zawierała: 3,75 ml przesącza, 0,05 ml NADH (ok.  $8 \cdot 10^{-3}\text{M}$ ). Odczytywano ekstynkcję początkową wobec wody redestylowanej, przy długości fali 366 nm, po czym dodawano 0,05 ml dehydrogenazy glutaminianowej (2 mg białka/ml) zawieszony w 2,8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i po 4 min inkubacji w temperaturze 25°C ponownie odczytywano



ekstynkcję. Z różnic ekstynkcji obliczano zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu, porównując z krzywą wzorcową.

Poziom glutaminianu oznaczano spektrofotometryczną metodą według Bernta i Bermeyera (1963), przy użyciu dehydrogenazy glutaminianowej. Półkule mózgu homogenizowano w 4 częściach 0,6 M  $\text{HClO}_4$ , a następnie wirowano 10 min przy  $3000 \times g$ . Pobierano 3 ml nadsączu i doprowadzano do pH około 9 przy użyciu 2 M roztworu fosforanów ( $\text{K}_3\text{PO}_4$  i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) o pH około 12, odstawiano na 10 min do łaźni lodowej, a następnie odsączano wytrącony  $\text{KClO}_4$ . Przesącz doprowadzano do temperatury pokojowej. Mieszanina reakcyjna zawierała: 3 ml buforu glicynohydrazynowego (0,5 M glicyny i 0,4 M hydrazyny o pH 9), 0,2 ml przesączu (próbna ślepa zawierała 0,2 ml wody redestylowanej) i 0,2 ml  $\text{NAD}^+$  (ok.  $3 \times 10^{-2}\text{M}$ ). Bezpośrednio odczytywano ekstynkcję przy długości fali 366 nm, po czym dodawano 0,05 ml dehydrogenazy glutaminianowej (ok. 10 mg białka/ml) wolnej od jonów amonowych i ponownie odczytywano ekstynkcję po 30 min. Z różnicy ekstynkcji obliczano zawartość glutaminianu według wzoru podanego przez autorów metody.

Poziom glutaminy oznaczano według swoistej spektrofotometrycznej metody Kupchika i Knoxa (1970). Półkule mózgu homogenizowano w oziębionym do temperatury około  $4^\circ\text{C}$  0,15 M  $\text{KCl}$  (1 cz. tkanki + 4 cz.  $\text{KCl}$ ). Do oznaczeń używano homogenatów. Mieszaniny inkubacyjne w końcowej objętości 1 ml i końcowym stężeniu buforu boranowego 0,3 M pH 8,5 zawierały: 0,05 ml 20% homogenatu z nerki w 0,15 M  $\text{KCl}$ , 0,2  $\mu\text{mole}$  kwasu fenylopirogronowego oraz 0,1 ml homogenatu mózgowego. Próby ślepe stanowiły mieszaniny zawierające L-glutaminę i nie zawierające homogenatu mózgowego lub odwrotnie. Po 1 godzinie inkubacji w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  do prób dodawano po 0,1 ml 60% kwasu metafosforowego. Próby mieszano i odstawiano na 10 min, po czym ponownie mieszano i wirowano przez 10 min przy około  $600 \times g$ . Do 0,8 ml uzyskanego nadsączu dodawano po 0,4 ml buforu arsenowoboranowego o pH 6,5 i odstawiano na 30 min. Po tym czasie odczytywano ekstynkcję w stosunku do wody redestylowanej przy długości fali 300 nm. Zawartość glutaminy obliczano na podstawie wzoru podanego przez autorów metody.

## WYNIKI

Poziom amoniaku,  $\alpha$ -ketoglutaranu, glutaminianu oraz glutaminy w mózгах zwierząt kontrolnych i doświadczalnych przedstawiono w tabelach 1 i 2.

Z uzyskanych danych wynika, że w modelu chemicznego uszkodzenia wątroby tioacetamidem w żadnym przedziale czasowym nie stwierdzono statystycznie znamiennych zmian w poziomie amoniaku oraz  $\alpha$ -ketoglutaranu (Tab. 1).



*Tabela 1.* Zawartość amoniaku i  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu szczura w następstwie zatrucia tioacetamidem

*Table 1.* The ammonia and  $\alpha$ -ketoglutarate content in the rat brain following thioacetamide intoxication

Grupa doświadczalna Experimental group	Amoniak Ammonia			$\alpha$ -ketoglutaran $\alpha$ -ketoglutarate		
	$\mu$ mole/kg tkanki $\mu$ moles/kg tissue			$\mu$ mole/kg tkanki $\mu$ moles/kg tissue		
	kontrola control	tioacetamid thioacetamide	p	kontrola control	tioacetamid thioacetamide	p
I	*0,22±0,02 (6)	0,24±0,04 (6)	nz	84,2±22,8 (6)	93,8±24,4 (7)	nz
II	0,22±0,03 (6)	0,24±0,05 (6)	nz	92,0±17,8 (6)	105,9± 9,3 (6)	nz
III	0,23±0,05 (6)	0,23±0,03 (6)	nz	86,1±16,5 (6)	86,1±17,9 (7)	nz

\* — średnia arytmetyczna  $\pm$  SD  
arithmetic mean  $\pm$  SD

p — prawdopodobieństwo  
probability

nz — różnica statystycznie nieznamienne  
difference statistically insignificant

W nawiasach liczba zwierząt

In parentheses number of animals

Poziom glutaminianu (Tab. 2) w I grupie doświadczalnej również utrzymuje się na niezmienionym poziomie w stosunku do wartości kontrolnych. W pozostałych dwóch grupach eksperymentalnych obserwuje się niewielkie, choć statystycznie znamienne, obniżenie poziomu tego związku wynoszące odpowiednio 5 i 6%.

*Tabela 2.* Zawartość glutaminianu i glutaminy w mózgu szczura w następstwie zatrucia tioacetamidem

*Table 2.* The glutamate and glutamine content in the rat brain following thioacetamide intoxication

Grupa doświadczalna Experimental group	Glutaminian Glutamate			Glutamina Glutamine		
	mmole/kg tkanki mmoles/kg tissue			mmole/kg tkanki mmoles/kg tissue		
	kontrola control	tioacetamid thioacetamide	p	kontrola control	tioacetamid thioacetamide	p
I	*11,39±0,26 (6)	11,30±0,26 (6)	nz	5,38±0,75 (5)	8,15±1,50 (7)	<0,01
II	11,28±0,38 (6)	10,71±0,27 (6)	<0,05	5,26±0,54 (5)	11,73±1,25 (5)	<0,01
III	11,05±0,19 (5)	10,36±0,41 (6)	<0,01	5,25±0,41 (5)	8,33±1,52 (6)	<0,01

\* — średnia arytmetyczna  $\pm$  SD  
arithmetic mean  $\pm$  SD

p — prawdopodobieństwo  
probability

nz — różnica statystycznie nieznamienne  
difference statistically insignificant

W nawiasach liczba zwierząt

In parentheses number of animals



Zawartość glutaminy (Tab. 2) we wszystkich grupach doświadczalnych wyraźnie rośnie, a przyrosty wynoszą odpowiednio 51, 123 i 53<sup>0</sup>/. W trzeciej grupie doświadczalnej poziom glutaminy w stosunku do grupy drugiej był niższy o około 29<sup>0</sup>/.

#### OMÓWIENIE

W niniejszej pracy stwierdzono brak zmian w zawartości  $\alpha$ -ketoglutaranu oraz glutaminy, dwóch pierwszych substratów metabolizmu amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym, przy jednoczesnym wzroście aktywności dehydrogenazy glutaminianowej (Hilgier 1983) oraz poziomu glutaminy. Wykazano również brak zmian w zawartości amoniaku w mózgu, przy jednoczesnym wyraźnym wzroście poziomu tego związku oraz fenoli w surowicy krwi, stwierdzonym w poprzednich badaniach na tym samym modelu doświadczalnym (Hilgier 1983). Holm i wsp. (1977) w swoich badaniach nad patogenezą encefalopatii wątrobowej sugerują, że wysoki poziom amoniaku oraz fenoli w surowicy krwi może być odzwierciedleniem upośledzenia metabolicznej funkcji wątroby. Amoniak jako związek bezbarierowy może przedostawać się z łożyska naczyniowego do ośrodkowego układu nerwowego i tu podlegać dalszemu metabolizmowi. Związek ten przy udziale dehydrogenazy glutaminianowej zostaje związany z  $\alpha$ -ketoglutaranem, co prowadzi do wytworzenia glutaminianu. Ten z kolei w reakcji katalizowanej przez syntetazę glutaminy jest przekształcany w glutaminę.

Interesujący jest fakt, że w modelu tioacetamidowym zmianom zawartości amoniaku w surowicy krwi nie towarzyszą zmiany jego poziomu w mózgu. Jak wykazali Vergara i wsp. (1974), w modelu z ostrą hyperamonemią a potwierdziły to nasze poprzednie prace z doświadczalną przetoką wrotno-układową (Hilgier 1981b), wzrostowi poziomu amoniaku we krwi towarzyszy proporcjonalny wzrost jego zawartości w ośrodkowym układzie nerwowym. Procesowi temu zawsze towarzyszą zmiany w poziomie  $\alpha$ -ketoglutaranu (Hawkins i wsp. 1973; Duffy i wsp. 1974; Hindfelt 1975; Hilgier 1980). W badaniach przedstawionych w niniejszej pracy poziom tego związku utrzymywał się jednak w granicach wartości kontrolnych. Można więc przypuszczać, że w zaistniałych warunkach przy niezmienionej zawartości amoniaku i  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu oraz przy wysokiej aktywności dehydrogenazy glutaminianowej i syntetazy glutaminowej (Hilgier 1983) mamy do czynienia z bardzo wydolnym cyklem detoksykacyjnym, czego dowodem może być wysoki poziom glutaminy. Jak wynika z prac Bradforda i Mc Ilwaina (1966), sama glutamina nie jest czynnikiem neurotoksycznym, a jej wysoki poziom w komórce jest jedynie wyrazem dokonania się kolejnego etapu reakcji w cyklu detoksykacji amoniaku w mózgu. Nie można jednak wykluczyć, że czynnikiem odpowiedzialnym za objawy encefalo-



patii może być  $\alpha$ -ketoglutaraminian, związek charakteryzujący się wysokimi własnościami neurotoksycznymi, jak wykazali to Duffy i wsp. (1974) oraz Vergara i wsp. (1974). Związek ten powstaje w reakcji katalizowanej przez transaminazę glutaminową z glutaminy. Duffy i wsp. (1974) wykazali również proporcjonalną zależność między stężeniem glutaminy a  $\alpha$ -ketoglutaraminianu. W poprzedniej pracy (Hilgier 1981a) na modelu toksycznej encefalopatii wątrobowej wywołanej podawaniem  $\text{CCl}_4$  wykazano również wysoki poziom glutaminy, któremu towarzyszy znaczna aktywność enzymu syntetyzującego  $\alpha$ -ketoglutaraminian. Można więc przypuszczać, że również w zatruciu tioacetamidem istnieją sprzyjające warunki do syntezy tego związku. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia doświadczalnego. Nie można wykluczyć również, że uzyskane wyniki są wyrazem zbyt krótkotrwałego okresu działania czynnika uszkadzającego wątrobę, jakim jest tioacetamid, ponieważ już w 7 dni od zaprzestania intoksykacji poziom glutaminy oraz aktywność badanych enzymów wykazują tendencję spadkową w stosunku do szczytowego okresu nasilenia się ich zmian (Hilgier i wsp. 1983).

### ПЕЧЕНОЧНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ У КРЫСЫ ВЫЗВАННАЯ ВВЕДЕНИЕМ ТИОАЦЕТАМИДА

#### III. Предварительная оценка метаболизма аммиака

##### Резюме

Было исследовано содержание аммиака  $\alpha$ -кетоглутарана, глутамата и глутамина в головном мозгу крыс в модели токсической печеночной энцефалопатии вызванной действием тиоацетамида в трех экспериментальных группах (методические детали описаны в первой части работы).

Констатировано, что в мозгу крыс во всех интервалах времени не приходит к статистически достоверным изменениям в уровне аммиака и  $\alpha$ -кетоглутарана. Уровень глутамата в I группе удерживался на неизменном уровне по отношению к контрольным группам. Во II и III группах констатировано небольшое снижение уровня этого соединения равняющееся соответственно 5 и 6%. Содержание глутамина возрастало во всех трех экспериментальных группах и рост составлял соответственно 51, 123 и 59%.

Полученные результаты наводят на мысль, что в примененной модели не приходит к ослаблению цикла детоксикации аммиака в головном мозгу, а только к его стимулированию.

### THIOACETAMIDE-INDUCED HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN THE RAT

#### III. Preliminary evaluation of Ammonia metabolism

##### Summary

The content of ammonia,  $\alpha$ -ketoglutarate, glutamate and glutamine was evaluated in the rat brain in the model of toxic hepatic encephalopathy induced by thioacetamide in the three experimental groups (the methods were described in the first part of this paper).



No statistically significant changes were observed in the level of ammonia and  $\alpha$ -ketoglutarate in the rat brain in all the periods throughout. In the first experimental group the level of glutamate was the same as compared to the control values. In the second and third experimental group a slight decrease of this compound level (5% and 6% respectively) was observed. The glutamine content increased in the three experimental groups by 51, 123 and 59%. The results suggest that in the applied experimental model the ammonia detoxycation cycle in the brain is stimulated rather than deteriorated.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bergmeyer H. V., Bernt E.: Oxyglutarate. W: Methods of Enzymatic Analysis. Red. H. V. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963, 324—327.
2. Bernt W. E.: Bergmeyer H. V.: L-Glutamate. W: Methods of Enzymatic Analysis. Red. H. V. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963, 384—388.
3. Bradford H. F., Mc Ilwain H.: Ionic basis for the depolarization of cerebral tissue by excitatory acidic aminoacids. J. Neurochem., 1966, 13, 1163—1177.
4. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: On the mechanisms of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. J. Neurol. Sci., 1971, 12, 241—261.
5. Duffy T. E., Vergara F., Plum F.: Alfaketoglutaramate in hepatic encephalopathy. W: Brain dysfunction in metabolic disorders. Res. Publ. Assoc. nerv. Ment. Dis., vol. 53. Red. F. Plum, Raven Press, New York 1974, 39—52.
6. Hawkins R. A., Miller R. C., Nielsen C., Weech R. L.: The acute action of ammonia on rat brain metabolism in vitro. Biochem. J., 1973, 4, 1001—1008.
7. Hilgier W.: Zawartość  $\alpha$ -ketoglutaranu w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol., 1980, 18, 121—126.
8. Hilgier W.: Zawartość glutaminy oraz aktywność aminotransferazy glutaminowej w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol., 1981a, 19, 67—73.
9. Hilgier W.: Zawartość amoniaku oraz aktywność syntetazy glutaminowej i glutaminazy w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Neuropat. Pol., 1981b, 19, 351—358.
10. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. Neuropat. Pol., 1983, 21, 487—494.
11. Hindfelt B.: On mechanisms in hyperammonemic coma with particular reference to hepatic encephalopathy. Ann. N. Y. Sci., 1975, 253, 116—123.
12. Hindfelt B., Plum F., Duffy T. E.: Effect of acute ammonia intoxication on cerebral metabolism in rats with portocaval shunts. J. Clin. Invest., 1977, 59, 386—396.
13. Holm E., Striebel J. P., Munzenmaier R., Kattermann R.: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. Leber Magen Darm, 1977, 7, 241—254.
14. Kraśnicka Z., Albrecht J., Mossakowski M. J.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. II. Cytochemical and ultrastructural studies on astrocytes cultured *in vitro*. Neuropat. Pol., 1983, 21, 495—510.
15. Kupchik H. Z., Knox W.: Assay of glutamine and its aminotransferase with enol-borate of phenylpyruvate. Arch. Biochem. Biophys., 1970, 136, 178—186.
16. Kyu M. H., Cavanagh J. B.: Some effects of porto-caval anastomosis in the male rats. Brit. J. exp. Path., 1970, 51, 217—227.
17. Lockwood A. H., Mc Donald J. M., Reiman R. E., Gelbard A. S.: The dynamics of ammonia metabolism in man. J. Clin. Invest., 1979, 63, 449—460.



18. Sadasivudu B., Indira Rao T., Radhakrishna Murthy C.: Acute metabolic effects of ammonia in mouse brain. *Neurochem. Res.*, 1977, 2, 639—655.
19. Vergara F., Plum F., Duffy T. E.:  $\alpha$ -Ketoglutaramate: increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients in hepatic coma. *Science*, 1974, 183, 81—83.

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



URSZULA WYSMYK-CYBULA

PRÓBA OCENY METABOLIZMU KWASU  
 $\gamma$ -AMINOMASŁOWEGO (GABA) W MÓZGU SZCZURA  
W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

Zespół Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Tioacetamid (TAA) jest znanym od dawna środkiem hepatotoksycznym, szeroko stosowanym w doświadczalnej patologii (Gupta 1956; Gallagher i wsp. 1956). Uszkodzenie wątroby związane z jego podawaniem prowadzi między innymi do znacznego wzrostu poziomu fenoli i amoniaku w surowicy krwi oraz do wystąpienia w mózgu patologicznych postaci gleju, uznanych za charakterystyczne dla neuropatologicznego obrazu encefalopatii wątrobowej (Holm i wsp. 1977; Hilgier i wsp. 1983). Wielu autorów od dawna zwracało uwagę na przyczynowy związek między rozwojem encefalopatii wątrobowej a podwyższonym poziomem amoniaku we krwi (Adams, Foley 1953; Mc Dermot, Adams 1954; Bessmann, Bessmann 1955) lub zachwianiem jego detoksykacji w ośrodkowym układzie nerwowym (Mossakowski i wsp. 1978). Przypuszczenia te znalazły swoje potwierdzenie w badaniach na pozaustrojowych hodowlach tkankowych, w których wykazano, że pod wpływem amoniaku dochodzi do charakterystycznych, identycznych jak w encefalopatii wątrobowej *in vivo*, uszkodzeń gleju gwiazdzistego (Mossakowski i wsp. 1970). Analogiczne nieprawidłowości glejowe stwierdzono w hodowli tkankowej prowadzonej z surowicą zwierząt zatrutowanych tioacetamidem, wykluczając równocześnie jego bezpośredni wpływ na hodowlę (Kraśnicka i wsp. 1983). Amoniak, przedostając się z łożyska naczyniowego do ośrodkowego układu nerwowego, podlega tu dalszym przemianom. W przypadku wydolności cyklu detoksykacji amoniaku pierwszą reakcją chemiczną jego przemiany jest reduktywna aminacja  $\alpha$ -ketoglutaranu do glutaminianu, następnie zaś ATP-zależna amidacja do glutaminy (Mc Ilwain, Bachelard 1971). Biochemiczna odnoga tego cyklu prowadzi do syntezy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA), neurotransmitera o działaniu hamującym.



Wydawało się prawdopodobne, że przeciążenie cyklu detoksykacyjnego amoniaku w mózgu, w następstwie hiperamonemii związanej z uszkodzeniem wątroby, może być czynnikiem stymulującym dla syntezy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego. Sugerować to mogły również zmiany behawioralne zwierząt zatrutowanych tioacetamidem. W poprzednich badaniach (Wysmyk-Cybula 1983) wykazano, że poziom związku w mózgu zwierząt poddanych działaniu TAA podlega w okresie po zatruciu zmianom, ograniczonym do dwóch struktur ośrodkowego układu nerwowego — kory mózgu i prążkowie. Z drugiej strony na podstawie prac Salganicoffa i De Robertisa (1965) oraz Sellströma i wsp. (1975) wiadomo, że zarówno GABA, jak i metabolizujące go enzymy związane są z dwiema frakcjami komórkowymi mózgu — glejową i neuronalną, a zmiany behawioralne obserwowane u zwierząt doświadczalnych uwarunkowane są przemieszczeniami neurotransmitera z jednego przedziału komórkowego do drugiego (Sarhan, Seiler 1979). W związku z powyższym wydawało się celowe podjęcie próby oceny zawartości GABA we frakcji synaptosomalnej i tzw. pozasynaptosomalnej oraz przeprowadzenie badań enzymatycznych.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, obu płci o ciężarze ciała 180—220 g, które zatrutowano tioacetamidem podawanym dootrzewnowo w fizjologicznym roztworze soli kuchennej (1 g/10 ml), w dawce 250 g/1 kg masy ciała (Holm i wsp. 1977; Hilgier i wsp. 1983). Doświadczenia prowadzono w trzech grupach. Pierwszą grupę stanowiły zwierzęta zabijane w 24 godziny po jednorazowym podaniu tioacetamidem, drugą — zabijane w 24 godziny po dwukrotnym podaniu tioacetamidem w odstępach jednodobowych, a trzecią te, które otrzymywały tioacetamid dwukrotnie w odstępie 24 godzin, a zabijane były po 7 dniach od drugiego podania związku (Tab. 1). Zwierzęta zabijano przez dekapitację, a mózgi po wyjęciu z jamy czaszki poddawano bezpośrednio odpowiedniej preparatyce.

Przeprowadzono następujące oznaczenia biochemiczne: 1) poziom GABA we frakcji synaptosomalnej i pozasynaptosomalnej, zawierającej w dużej przewadze cytoplazmę komórek nerwowych i glejowych oraz mikrosomy z nieznaczną tylko zawartością pęcherzyków synaptycznych (Sarhan, Seiler 1979); 2) aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD), enzymu biorącego udział w syntezie GABA, w pełnym homogenacie; 3) aktywność transaminazy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA-T), enzymu katalizującego rozkład GABA, w pełnym homogenacie mózgu. (Upřednio opracowane metody oznaczania aktywności GAD i GABA-T wykorzystywane do porównania aktywności obu enzymów w różnych doświadczalnych modelach encefalopatii wątrobowej, prowadzone na



Tabela 1. Poziom GABA oraz aktywność enzymów: GAD i GABA-T w mózgu szczura po podaniu tioacetamidu (TAA)

Table 1. Content of GABA and activity of GABA metabolizing enzymes (GAD and GABA-T) in the rat brain following thioacetamide (TAA) intoxication

Grupa Group	Związek Compound	n	Aktywność GAD μmole <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /g świeżej tkanki/godz. GAD activity μmol <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> /g of wet tissue h		Zawartość GABA Content of GABA				Aktywność GABA-T μmole glutaminianu/g świeżej tkanki/godz. GABA-T activity μmol glutamate/g of wet tissue/h				
			$\bar{X}$	SD	n	frakcja synaptosomalna synaptosomal fraction	n	frakcja pozasynaptosomalna nonsynaptosomal fraction	n	$\bar{X}$	SD		
I	0,9% NaCl	5	14,57±1,11	p > 0,05	5	0,62±0,03	p > 0,05	5	0,92±0,13	p < 0,05	5	20,80±1,5	p > 0,05
	TAA	5	15,85±1,08		6	0,75±0,18		6	1,08±0,04		5	21,70±1,9	
II	0,9% NaCl	5	13,75±1,18	p > 0,05	6	*1,04±0,03	p < 0,001	6	1,21±0,13	p > 0,05	5	24,94±3,5	p > 0,05
	TAA	5	13,84±0,64		6	1,95±0,31		6	1,17±0,17		5	21,42±2,0	
III	0,9%NaCl	6	*11,84±0,93	p < 0,05	4	*0,78±0,14	p < 0,01	4	1,12±0,12	p > 0,05	6	*27,79±2,4	p < 0,01
	TAA	5	10,60±0,70		5	0,46±0,09		5	1,22±0,04		5	32,56±0,7	

$\bar{X} \pm SD$  – średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe

– arithmetic mean ± standard deviation

n – liczba zwierząt

number of animals

p – prawdopodobieństwo

probability

\* – znamienne statystycznie

statistically significant



homogenatach wybranych struktur mózgowych nie były dostosowane do oznaczeń we frakcjach subkomórkowych).

Oznaczenia kontrolne przeprowadzono w grupach zwierząt, którym podawano dootrzewnowo fizjologiczny roztwór soli kuchennej w analogicznym do doświadczalnego schemacie czasowym.

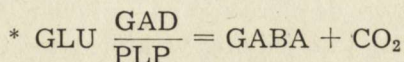
Izolowanie frakcji subkomórkowych. Izolowanie przeprowadzono wg metody opisanej przez Graya i Whittakera (1962) w modyfikacji Sarhana i Seilera (1979). Mózgi homogenizowano w 0,32 M sacharozie w temperaturze 0°C w proporcji 1 g/10 ml. Homogenaty wirowano przez 10 min przy 1000 g. Otrzymywano osad jądrowy i supernatant (S<sub>1</sub>). Supernatant wirowano przy 17000 g przez 15 min, uzyskując nieoczyszczoną frakcję synaptosomalną i supernatant (S<sub>2</sub>). Osad jądrowy przemywano 0,32 M sacharozą i wirowano przy 1000 g przez 10 min, otrzymując osad, który odrzucano i supernatant. Supernatant ten łączono z zawieszoną w 0,32 M sacharozie frakcją nieoczyszczonych synaptosomów i wirowano przez 15 min przy 17000 g. Uzyskany osad traktowano jako frakcję synaptosomalną, natomiast supernatant (S<sub>3</sub>) łączono z supernatantem (S<sub>2</sub>), uzyskując frakcję pozasynaptosomalną.

Oznaczanie poziomu GABA we frakcji synaptosomalnej. Poziom GABA oznaczano fluorometrycznie wg metody Grahama i Aprisona (1964). Ekstrakcję aminokwasu prowadzono w oziębionym 75% etanolu. Ekstrakty suszono w temperaturze 50°C. Osady rozpuszczano w wodzie destylowanej, pobierając do oznaczeń 25- $\mu$ l porcje wodnego roztworu GABA. Po odparowaniu, próby inkubowano w medium o składzie opisywanym przez autorów metody. Inkubację prowadzono w temperaturze 35°C przez 45 min, po czym reakcję przerywano i po degradacji nadmiaru NADP oraz przeprowadzeniu NADPH w NADP (używając roztworu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w stężonym roztworze NaOH), mierzono ekstynkcję produktu reakcji. Pomiary prowadzono na spektrofluorymetrze Aminco-Bowman przy długości fali wzbudzenia 365 nm i emisji 465 nm. Wyniki wyrażano w  $\mu$ molach GABA na g świeżej tkanki.

Oznaczanie poziomu GABA we frakcji pozasynaptosomalnej. Poziom GABA we frakcji pozasynaptosomalnej oznaczano metodą opisaną przez Lowe'a i wsp. (1958) opartą na reakcji ninhydryny z GABA, z wytworzeniem produktu reakcji charakteryzującego się silną fluorescencją. Zliofilizowane supernatanty otrzymane z frakcjonowanego wirowania rozpuszczano w 0,1 N kwasie solnym w proporcji 2 ml supernatantu + 2 ml kwasu solnego. Następnie 200- $\mu$ l porcje roztworu odbiałczano przy użyciu 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Po odwirowaniu próby inkubowano z 50 mM kwasem glutaminowym i ninhydryną. Konieczność obecności w tej reakcji kwasu glutaminowego została wyczerpująco opisana przez autorów metody. Pomiarów dokonano na spektrofluorymetrze Aminco-Bowman przy długości fali wzbudzenia 380 nm i długości fali emisji 480 nm. Wyniki wyrażano w  $\mu$ molach GABA na mg białka.



Oznaczanie aktywności dekarboksylazy glutaminianowej (GAD). Aktywność GAD oznaczano według metody opisanej przez Baxtera (1972), w modyfikacji Morina i Westerlaina (1978), dokonując pomiaru uwolnionego  $^{14}\text{C}$  powstającego w reakcji:



Pomiarów aktywności tego enzymu dokonywano w pełnym, 10% homogenacie mózgowym. Wyniki przedstawiono w  $\mu\text{mol}$ ach  $\text{CO}_2/\text{g}$  świeżej tkanki/godz.

Oznaczanie aktywności transaminazy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA-T). Pomiarów aktywności enzymu dokonano w 10% homogenacie pólkul mózgowych, opierając się na metodzie kolorymetrycznej opisanej przez Baxtera (1972). 0,3-ml porcje homogenatu w buforze boranowym, zawierającym fosforan pirydoksalu (PLP) i zredukowany glutation, były inkubowane w roztworze zawierającym  $\alpha$ -ketoglutaran ( $\alpha$ -OG) (250 mM), GABA (250 mM), PLP (200  $\mu\text{g}/1$  ml) oraz zredukowany glutation (100  $\mu\text{g}/1$  ml). W wyniku reakcji między GABA a  $\alpha$ -OG w obecności PLP, przy udziale GABA-T, wytwarzany jest kwas glutaminowy. W reakcji między kwasem glutaminowym a odczynnikiem miedziowym ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  w 0,05  $\text{NHCl}$ ) powstaje chelatowy związek miedzi z kwasem glutaminowym, który następnie reaguje z neocuproiną. Intensywność żółtego koloru kompleksu miedziowo-neocuproinowego jest proporcjonalna do ilości glutaminianu. Ekstynkcję mierzono przy długości fali 454 nm. Aktywność enzymu wyrażono w  $\mu\text{mol}$ ach glutaminianu/g tkanki/godzinę.

## WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono poziomy GABA w obu badanych frakcjach subkomórkowych i aktywności enzymów uczestniczących w jego metabolizmie, w różnych przedziałach czasowych po zatruciu tioacetamidem.

Z przedstawionych danych wynika, że w najwcześniejszym okresie po zatruciu (grupa I) występuje jedynie nieznaczny (wynoszący 17% w stosunku do wartości kontrolnych) wzrost zawartości GABA. Dotyczy on wyłącznie frakcji pozasynaptosomalnej, przy niezmienionym poziomie we frakcji synaptosomalnej i braku zmian w aktywności obu enzymów metabolizujących kwas  $\gamma$ -aminomasłowy.

W grupie II (zwierzęta po dwukrotnym zatruciu tioacetamidem), aktywność zarówno dekarboksylazy glutaminianowej, jak i transaminazy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego utrzymuje się nadal na poziomie war-

\* GLU — glutaminian

GAD — dekarboksylaza kwasu glutaminowego

PLP — fosforan pirydoksalu



tości kontrolnych. Dochodzi natomiast do znacznego (87%) wzrostu zawartości GABA we frakcji synaptosomalnej. Poziom GABA we frakcji pozasynaptosomalnej jest w tym czasie zbliżony do wartości kontrolnych.

Grupa III (zwierzęta uśmiercone po upływie 7 dni od powtórnego zatrucia tioacetamidem) jest jedyną, w której występują zmiany w aktywności obu enzymów metabolizujących kwas  $\gamma$ -aminomasłowy. Dochodzi w tym czasie do niewielkiego, lecz statystycznie znamiennego, obniżenia aktywności dekarboksylazy i wyraźnego wzrostu aktywności transaminazy kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego. Obserwuje się równocześnie obniżenie zawartości GABA we frakcji synaptosomalnej o 40% w stosunku do kontroli, podczas gdy jego poziom we frakcji pozasynaptosomalnej pozostaje niezmienny.

#### OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań pozwalają na stwierdzenie, że zatrucie tioacetamidem, związane z ciężkim uszkodzeniem wątroby i znacznym wzrostem amoniaku w surowicy krwi (Hilgier i wsp. 1983), prowadzi do zmian w zawartości GABA i aktywności enzymów uczestniczących w jego metabolizmie w mózgu. Zmiany dotyczące zawartości GABA są różne w obu badanych frakcjach subkomórkowych, a jej wahania i aktywność obu enzymów wykazują wyraźne odrębności w zależności od czasu po zatruciu. W najwcześniejszym okresie po jednorazowym podaniu tioacetamidu, poziom GABA wzrasta bardzo nieznacznie i to wyłącznie we frakcji pozasynaptosomalnej. Sugeruje to, że dochodzi w tym czasie do niewielkiej stymulacji syntezy neurotransmitera, przede wszystkim w perykarionach komórkowych, bez przesądzania o tym, czy proces ten występuje w komórkach nerwowych czy glejowych. Należy przy tym zwrócić uwagę na fakt, że dane powyższe nie są zgodne z poprzednimi spostrzeżeniami (Wysmyk-Cybula 1983), uzyskanymi w badaniach pełnych homogenatów tkankowych, w których wykazano spadek poziomu GABA w korze mózgu, a brak zmian jego zawartości w prążkowie. Być może niezgodność tę można wiązać z faktem, że badane frakcje subkomórkowe pochodzą z całego mózgu, a nie z jego wybranych struktur. Sugerować to może również glejowe pochodzenie wzrostu poziomu GABA, gdyż „frakcja pozasynaptosomalna” obejmuje zarówno istotę szarą jak i białą, podczas gdy w poprzednich badaniach uwzględniano jedynie struktury szare o przewodze neurocytów.

Bardzo znaczny wzrost poziomu GABA obserwowany w II grupie doświadczalnej ograniczony jest natomiast wyłącznie do frakcji synaptosomalnej. Zbiega się on w czasie z maksymalnym podwyższeniem poziomu amoniaku we krwi i glutaminy w mózgu, stwierdzonym w tym samym modelu doświadczalnym przez Hilgiera (1983), a także z naj-



głębszymi zaburzeniami behawioralnymi u zwierząt, wyrażającymi się obniżeniem ich reaktywności. Jest on zgodny z wynikami poprzednich badań (Wysmyk-Cybula 1983). Otwartym zagadnieniem pozostaje mechanizm wybiórczego wzrostu zawartości GABA w zakończeniach nerwowych. Sekwencje czasowe zmian — początkowe podwyższenie zawartości neurotransmitera we frakcji pozasynaptosomalnej, a następnie w synaptosomalnej, jednocześnie zaś powrót jego poziomu do normy we frakcji zawierającej (w przewodzie) cytoplazmę perykariolną komórek nerwowych i glejowych — sugeruje przemieszczenie neurotransmitera bądź z perykariolnych neurocytów, bądź też z komórek glejowych do zakończeń nerwowych. Na tę ostatnią możliwość wskazują spostrzeżenia Sarhana i Seilera (1979). Nie można jednakże wykluczyć zwiększonej lokalnej syntezy GABA w samych zakończeniach nerwowych. Badania Salganicoffa i de Robertisa (1965) wskazują bowiem wyraźnie na związek dekarboksylazy glutaminianowej z GABA-ergicznymi zakończeniami komórek nerwowych.

Spadek poziomu GABA we frakcji synaptosomalnej obserwowany w III grupie doświadczalnej wiąże się ze zmianami aktywności obu enzymów — obniżeniem aktywności GAD i wzrostem GABA-T. Wydaje się, że zaobserwowane zmiany w aktywności enzymów metabolizujących neurotransmitter mogą być odpowiedzią mechanizmów regulujących poziom substratu, w postaci zahamowania jego syntezy i podwyższenia rozpadu. Pełna interpretacja uzyskanych wyników możliwa będzie jednak dopiero po oznaczeniu aktywności enzymatycznej nie tylko w pełnym homogenacie tkankowym, lecz również w poszczególnych frakcjach subkomórkowych. Jest to niezbędne ze względu na znaczną kompartmentację metabolizmu GABA w mózgu (Sellström 1975; Sellström i wsp. 1975). Według Salganicoffa i De Robertisa (1965) aktywność GAD związana jest z zakończeniami nerwowymi, podczas gdy większość autorów przychyliła się do poglądu, że wychwyty i rozkład GABA odbywają się przede wszystkim w komórkach glejowych, pomimo że nie udało się dotąd jednoznacznie ustalić dokładnej lokalizacji komórkowej GABA-T (Robinson, Wells 1973; Hyde, Robinson 1974).

ПОПЫТКА ОЦЕНКИ МЕТАБОЛИЗМА  $\gamma$ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (ГАМК)  
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫСЫ  
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Исследовано влияние экспериментальной печеночной энцефалопатии вызванной введением гепатотоксического соединения — тиацетамида (ТАА) на уровень нейротрансмиттера —  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в двух клеточных фракциях — синаптосомальной и экстраинаптосомальной. Автор определяла также активность энзимов связанных с метаболизмом ГАМК: декарбоксилазы глутаминовой кислоты (ДГК) и трансаминазы



$\gamma$ -аминоасляной кислоты (Т-ГАМК). Активность обоих энзимов измерялась в полных мозговых гомогенатах. Констатируется, что в раннем периоде после введения ТАА (24 часа) приходит лишь к незначительному росту уровня ГАМК в экстраинапсосомальной фракции. Самые большие изменения наблюдались в синапсосомальной фракции в 48 часов после вторых инъекций тиоацетамида (ок. 87% рост). Рост содержания этого соединения совпадает во времени с максимальным повышением уровня аммиака в крови и глутамина в головном мозгу (Хильгер 1983), а также с наиболее глубокими поведенческими расстройствами у животных. Увеличение количества нейротрансмиттера в экстраинапсосомальной фракции в первой фазе эксперимента, а затем в синапсосомальной фракции в позднейшее время, внушает перемещение нейротрансмиттера из перикарионов нейроцитов или из глиозных клеток в нервные окончания. В третьей экспериментальной группе снижение уровня ГАМК в синапсосомальной фракции следует относить к понижению активности ДКГ и к повышению активности Т-ГАМК, что может быть ответом механизмов регулирующих концентрацию субстрата в форме заторможения его синтеза и повышения распада.

#### ATTEMPT OF EVALUATION OF $\gamma$ -AMINOBUTYRIC ACID METABOLISM IN THE RAT BRAIN IN EXPERIMENTAL ENCEPHALOPATHY

##### Summary

The GABA level and the glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA-aminotransferase activities were measured in the brains of rats subjected to thioacetamide treatment. The GABA content was assayed in the synaptosomal and postsynaptosomal fraction, and the enzymes activities were tested directly in cerebral homogenates. In early period 24 h following the 1st administration a slight increase of the GABA level was observed in the nonsynaptosomal fraction only. Following two administrations of TAA (48 h after the onset of the experimental a marked increase — about 87%) of the synaptosomal GABA was noted coinciding with the maximum increase of blood ammonia and cerebral glutamine level observed earlier in the same model (Hilgier 1983). The results are indicative of fluctuations in the distribution of GABA between the neuronal and the glial compartment. In the brains examined 7 days after the 2nd administration of TAA, a decrease of GABA content in synaptosomal fraction was noted which is consistent with the decreased GAD and enhanced GABA-T activity observed at the same time.

##### PISMIENNICTWO

1. Adams R. D., Foley J. M.: The neurological changes associated with liver disease. Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis., 1953, 32, 198—237.
2. Baxter C. T.: Assay of  $\gamma$ -aminobutyric acid and enzymes involved in its metabolism. W: Methods of neurochemistry. Red. R. Fried, M. Dekker, New York 1972, 1—61.
3. Bessmann S. P., Bessmann A. N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanisms of hepatic coma. J. Clin. Inv., 1955, 36, 622—628.
4. Gallagher C. H., Gupta D. N., Judah J. D., Rees K. R.: Biochemical changes in liver in acute thioacetamide intoxication. J. Path. Bact., 1956, LXXII, 193—201.
5. Graham L. T., Aprison M. H.: Fluorometric determination of aspartate, glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic methods. Anal. Biochem., 1966, 15, 487—497.



6. Gray E. G., Whittaker V. P.: The isolation of nerve endings from brain: An electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.*, 1962, 96, 79—88.
7. Gupta D. N.: Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J. Path. Bact.*, 1956, LXXII, 1, 183—191.
8. Hilgier W.: Encefalopatia wątrobowa u szczura wywołana podawaniem tioacetamidu. III. Zawartość amoniaku i substratów jego metabolizmu w mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 511—518.
9. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced encephalopathy in the rat. I. Preliminary morfological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
10. Holm E., Striebel J. P., Münzenmaier R., Kattermann R.: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. *Leber Magen Darm* 1977, 7, 241—254.
11. Hyde I. G., Robinson N.: Gamma-aminobutyrate transaminase activity in rat cerebellar cortex: A histochemical study. *Brain Res.*, 1974, 82, 109—116.
12. Kraśnicka Z., Albrecht J., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat: II. Morphological and ultrastructural studies on astrocytes cultured in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 495—510.
13. Lowe I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of glutamic decarboxylase and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8—18.
14. Mc Dermot W. V., Adams R. B.: Episodic stupor associated with an Eck fistula in the human with particular reference to the metabolism of ammonia. *J. Clin. Inv.*, 1954, 33, 1—9.
15. Mc Ilwain H., Bachelard H. S.: Biochemistry and the nervous system. 4th edition. Williams and Wilkins. Baltimore 1971.
16. Morin A. H., Westerlain C. G.: Stechiometry of GABA and CO<sub>2</sub> formation in glutamate decarboxylase assays: Alteration by an impurity L-U-(<sup>14</sup>C) glutamate. *J. Neurochem.*, 1978, 31, 371—373.
17. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 365—374.
18. Mossakowski M. J., Ostenda M., Pronaszko-Kurczyńska A.: Obraz mikroskopowo-elektronowy naczyń włosowatych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 327—337.
19. Robinson N., Wells F.: Distribution and localization of sites of gamma-aminobutyric acid metabolism in the adult rat brain. *J. Anat.*, 1973, 114, 365—378.
20. Salganicoff L., De Robertis E.: Subcellular distribution of the enzyme of the glutamic acid, glutamine and  $\gamma$ -aminobutyric acid cycles in rat brain. *J. Neurochem.*, 1965, 12, 4, 287—310.
21. Sarhan S., Seiler N.: Metabolic inhibitors and subcellular distribution of GABA. *J. Neurosci. Res.*, 1979, 4, 399—421.
22. Sellström A., Sjöberg L. B., Hamberger A.: Neuronal and glial system for  $\gamma$ -aminobutyric acid metabolism. *J. Neurochem.*, 1975, 25, 393—398.
23. Sellström A.: Gamma-aminobutyric acid transport in brain. Institute of Neurobiology Medical Faculty, University of Göteborg, Göteborg Sweden 1975.
24. Wysmyk-Cybula U.: Zawartość kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 129—134.

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



MILENA LAURE-KAMIONOWSKA, MARIA DAŁBSKA

## USZKODZENIA MÓZDŻKU W ZESPOLE NIEDOTLENIENIA OKOŁOPORODOWEGO

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN

Wpływ niedotlenienia okołoporodowego na mózdzek był, jak dotąd, rzadko uwzględniany w opracowaniach dotyczących uszkodzeń układu nerwowego w tym okresie życia (Norman 1957; Towbin 1970). Niektóre obserwacje sugerują, że uszkodzenia kory mózdzku występują rzadziej niż kory mózgu (Meyer 1949). Z przyczyn utrudniających analizę zmian w mózdzku u noworodków wymienić należy jego znaczne zróżnicowanie morfologiczne, związane z różnicami wieku filogenetycznego poszczególnych okolic, oraz szybko postępujące dojrzewanie w ostatnich tygodniach życia płodowego. Hopkins i wsp. (1980) zwracają uwagę, że wcześniejsze dojrzewanie neuronów w starszych filogenetycznie okolicach mózdzku jest istotnym czynnikiem warunkującym topografię uszkodzeń mózdzku u noworodków donoszonych. Nawiązując do tych obserwacji podjęto szczegółową analizę zmian w mózdzku u noworodków zmarłych w okresie okołoporodowym, zarówno donoszonych, jak i wcześniaków, z uwzględnieniem stopnia rozwoju określonej struktury w momencie zadziałania czynnika uszkadzającego.

### MATERIAŁ I METODY

Opracowanie dotyczy 20 noworodków zmarłych w wieku 28—40 tygodni życia płodowego w Klinice Neonatologii Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie i opracowanych neuropatologicznie w Pracowni Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN. Do analizy kliniczno-patologicznej wybrano te przypadki, w których przebieg ciąży i porodu pozwalał na rozpoznanie asfiksji okołoporodowej.

Do badań neuropatologicznych pobierano wycinki obejmujące robak i półkule mózdzku, a także z półkul i pnia mózgu. Materiał zatapiający w parafinie barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu oraz wędlug metody Klüver-Barrery.



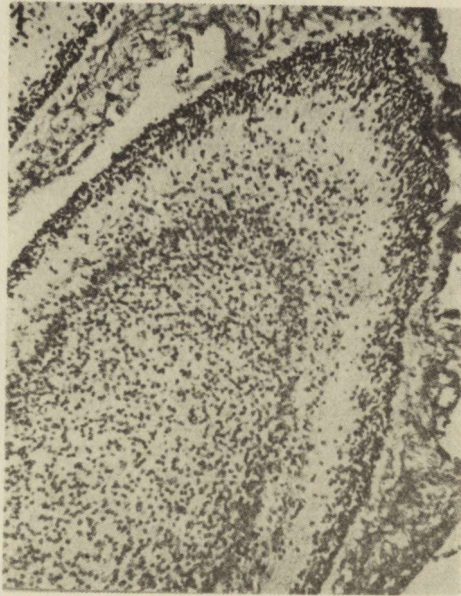
## WYNIKI

*Histologiczne cechy dojrzewania mózdzku*

Analiza zmian patologicznych wymaga przypomnienia kilku podstawowych danych umożliwiających ocenę fazy rozwojowej poszczególnych struktur mózdzku. Preparaty histologiczne mózdzku oceniane w mikroskopie świetlnym pozwalają, w oparciu o badania Friede'go (1973), Larroche (1977) oraz obserwacje własne, na wyznaczenie kilku orientacyjnych danych morfologicznych wskazujących na odmienność faz rozwojowych robaka i półkul mózdzku.

Rozwój kory mózdzku charakteryzują następujące zjawiska: ujawnienie się dostrzegalnych w preparatach histologicznych komórek Purkinjego; zanikanie *lamina dissecans*, która oddziela w czasie rozwoju warstwę komórek Purkinjego od warstwy ziarnistej wewnętrznej, stopniowe zagęszczanie komórkowe warstwy ziarnistej wewnętrznej i jej wyraźne oddzielenie się od istoty białej; stopniowy zanik warstwy ziarnistej zewnętrznej (Obersteinerera).

Komórki Purkinjego, chociaż migrują wcześniej w czasie rozwoju, można wyróżnić w robaku mózdzku po 25 tygodniu rozwoju, a w półkulach powyżej 32 tygodnia. Do tego momentu (ryc. 1) w warstwie komórek Purkinjego nie można dostrzec poszczególnych neuronów z powodu niedostatecznego rozwoju ich perikarionu. *Lamina dissecans* od-



Ryc. 1. 28 tygodni życia płodowego. Kora półkul mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 1. 28 weeks of gestation. Cerebellar cortex. Cresyl violet. × 100



dziela tę warstwę od wąskiego tylko pasma gęsto ułożonych neuroblastów należących do warstwy ziarnistej wewnętrznej.

Po 32 tygodniu rozwoju, gdy komórki Purkinjego w półkulach coraz lepiej uwidaczniają się, dzięki powiększeniu się zarówno jąder, jak i perikarionu oraz pojawieniu się pierwszych ziaren tigroidu, szybko postępuje zanik *lamina dissecans*. Od tego momentu wzrasta również zagęszczenie warstwy ziarnistej wewnętrznej (ryc. 2). U noworodka donoszonego (ryc. 3) warstwa ta jest już zwarta, dobrze oddzielona od istoty białej. Od tego okresu rozwoju można zauważyć zmniejszanie szerokości warstwy komórek rozrodczych Obersteinera.



Ryc. 2. 36 tygodni życia płodowego. Kora półkul mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100  $\times$

Fig. 2. 36 weeks of gestation. Cerebellar cortex. Cresyl violet.  $\times 100$

Objętość istoty białej mózdzku zwiększa się znacznie w ostatnich miesiącach życia płodowego i pierwszych miesiącach po urodzeniu w związku ze wzrostem dendrytów i aksonów oraz wejściem w stadium premielinizacyjne najstarszych szlaków mózdzku. Jądro zębate złożone z neuroblastów jest dobrze widoczne już w 30 tygodniu życia płodowego.

#### *Kliniczno-morfologiczna analiza materiału*

Opierając się na przedstawionych powyżej cechach rozwoju mózdzku opracowywane przypadki podzielono na dwie grupy.





*Ryc. 3.* Noworodek donoszony. Kora półkul mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×  
*Fig. 3.* 40 weeks of gestation. Cerebellar cortex. Cresyl violet. × 100

Grupa pierwsza obejmuje 8 noworodków nie donoszonych w wieku rozwojowym między 28 a 32 tygodniem. Pochodzą one z ciąży obciążonych patologią śródciążową, która może doprowadzić do niedotlenienia płodu, w tym przede wszystkim gestozą, ponadto krwawieniami w I i II trymestrze ciąży. Wskaźnik przyurodzeniowej oceny noworodka Apgar u wszystkich noworodków był niski, u większości wynosił 1—4, u żadnego nie przekraczał 5—7 punktów. U noworodków obserwowano zespół błon szklistych oraz niewydolność krążeniowo-oddechową. Większość z nich zmarła w ciągu kilku godzin po porodzie, dwa — w drugiej dobie życia.

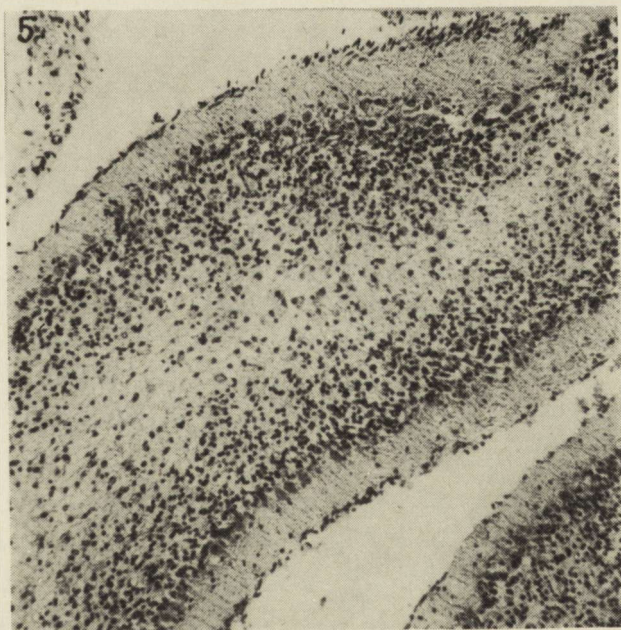
Neuropatologicznie prawie we wszystkich przypadkach stwierdzono wyraźne uszkodzenie półkul mózgu, w tym również kory, mimo jej wczesnego stadium rozwoju. Najwyraźniejsze zmiany zaobserwowano w korze hipokampa w postaci rozsianych uszkodzeń komórek nerwowych. W kilku przypadkach obecne były ogniska krwotoczne w gniazdach macierzy, w pozostałych nasilone przekrwienie przykomorowe. W trzech przypadkach stwierdzono krwotok podpajęczynówkowy. Zmiany w mózdzku były mniej widoczne poza jednym przypadkiem, w którym był on znacznie uszkodzony. W pozostałych przypadkach w robaku i w płacie grudkowo-kłaczkowym stwierdzono odcinkowe ubytki oraz obkurczenie komórek Purkiniego. Tylko w jednym przypadku można było dostrzec podobne zmiany w półkulach mózdzku. Ogniskowe zmi-





*Ryc. 4.* Odcinkowy zanik komórek Purkinjego. Przyp. 10/77. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

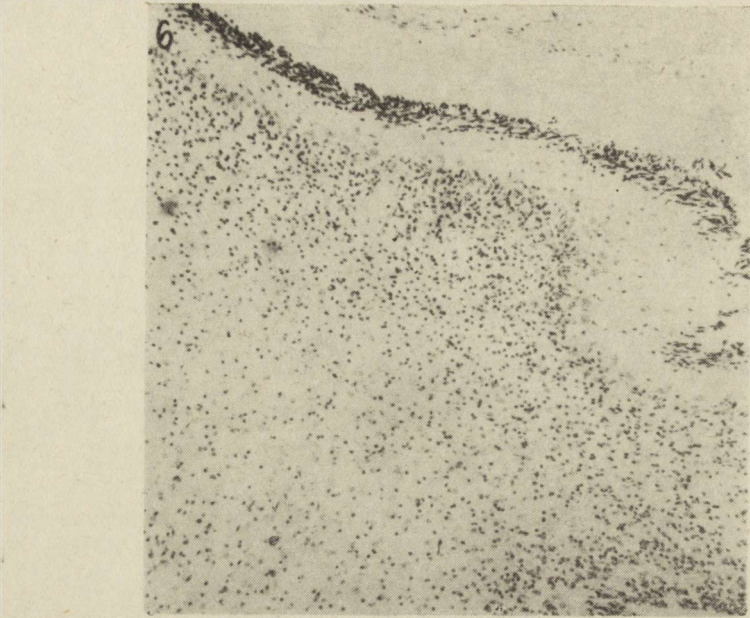
*Fig. 4.* Focal loss of Purkinje cells. Case 10/77. Cresyl violet. × 200



*Ryc. 5.* Przerzedzenie neuronów warstwy ziarnistej wewnętrznej i zewnętrznej. Przyp. 122/78. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

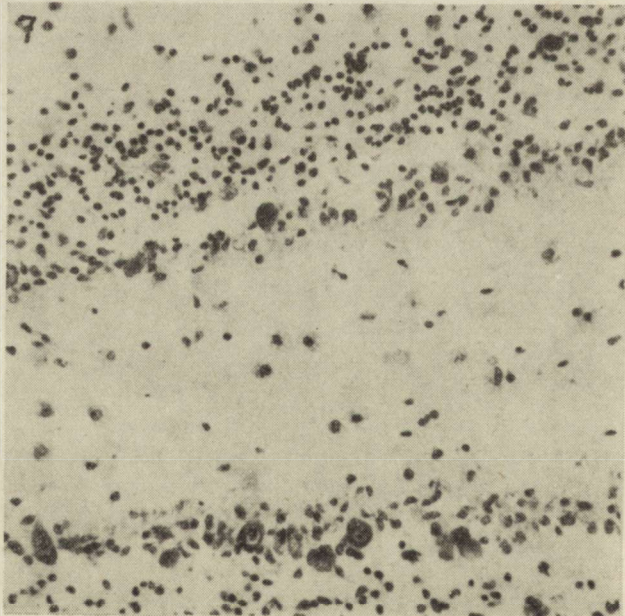
*Fig. 5.* Thin cellularity of external and internal granular layers. Case 122/78 Cresyl violet. × 100





*Ryc. 6.* Przerzedzenie neuronów warstwy ziarnistej przy zachowanych komórkach Purkinjego. Przyp. 58/76. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 6.* Selective granular cells necrosis. Case 58/76. Cresyl violet. × 100



*Ryc. 7.* Makrofagi w warstwie wewnętrznej ziarnistej i drobinowej. Przyp. 58/76. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

*Fig. 7.* Necrosis with macrophages of internal granular and molecular layers. Case 58/76. Cresyl violet. × 200



ny w warstwie ziarnistej obserwowano w dwóch, a uszkodzenie neuronów jądra zębatego we wszystkich przypadkach. W istocie białej stwierdzono przekrwienie i cechy obrzęku.

W grupie drugiej obejmującej noworodki powyżej 34 tygodnia rozwoju występowały również śródciażowe stany chorobowe prowadzące do niedotlenienia płodu. Były to: cholestaza wątrobowa, gestoza, przedwczesne odejście wód płodowych, zakażenie wewnątrzmaciczne. Kilka noworodków urodziło się w stanie ciężkim z punktami Apgar poniżej 5, z dużymi zaburzeniami oddychania, a nawet z bezdechem. Połowa noworodków w grupie była urodzona w stanie dobrym z punktami Apgar 8—10, zmarły one w pierwszych dniach życia z powodu ostrej niewydolności krążeniowej. U trzech do zgonu przyczyniło się powikłanie w postaci uogólnionej posocznicy.

W badaniu neuropatologicznym we wszystkich przypadkach rozpoznano encefalopatię niedotlenieniową wyrażającą się uszkodzeniami neuronów głównie w półkulach mózgu. W korze mózgu widoczne były ubytki komórek. W niektórych przypadkach stwierdzono również uszkodzenie komórek nerwowych pnia, a nawet ciężkie zmiany we wszystkich strukturach opuszki. W mózdkach, podobnie jak w grupie poprzedniej, uszkodzenia dotyczyły głównie komórek Purkiniego. Były one obecne we wszystkich przypadkach. W dwóch z nich stwierdzono całkowity brak komórek Purkiniego z wyrównawczą proliferacją gleju Bergmanna. W innych występowały ogniskowe ubytki komórek Purkiniego (ryc. 4), zachowane komórki wykazywały cechy schorzenia homogenizacyjnego lub były ciemne i obkurczone. Nasilenie zmian było wyraźniej większe w robaku i płacie grudkowo-kłaczkowym niż w półkulach. W pięciu przypadkach stwierdzono uszkodzenie warstwy ziarnistej wewnętrznej, która wykazywała nierówną barwliwość, a miejscami była przerzedzona (ryc. 5). W ogniskach tych obserwowano zmiany o cechach *kariorrhesis*. W dwóch przypadkach uszkodzenie warstwy ziarnistej wewnętrznej przeważało nawet nad zmianami w warstwie komórek Purkiniego (ryc. 6). W jednym z nich w ogniskach rozpadu widoczne były makrofagi występujące zarówno w warstwie ziarnistej wewnętrznej, jak i w drobinowej (ryc. 7). Warstwa ziarnista zewnętrzna była w tym przypadku dużo węższa, niż wynikałoby to z wieku rozwojowego płodu.

We wszystkich przypadkach stwierdzono uszkodzenie jądra zębatego. Jego neurony wykazywały różny stopień zmian od schorzenia ischemicznego pojedynczych komórek do ich martwicy eozynofilnej.

Istota biała w większości przypadków była obrzękła i przekrwiona, w jednym przypadku doszło do jej ogniskowego rozpadu, a w jednym widoczna była glejoza reparacyjna. Szczegółową analizę kliniczno-morfologiczną badanych przypadków zawiera tabela 1.



Tabela 1. Analiza kliniczno

Nr przyp.	Wiek (tyg.), ciężar (g), długość (cm), przeżycie noworodka	Patologia ciąży	Stan kliniczny noworodka
1	2	3	4
126/78	28 900/32 kilka godzin	obciążony wywiad położniczy, w 13 tyg. życia płodowego poronienie zagrażające, szew Shirodkara (krwawienie w II trym.), poród przedwczesny	Apgar 3—3, respirator
128/78	28/30 900 5 min	gestoza E, poród przedwczesny	Apgar 1 błony szkliste
124/78	28 900/36 3 godz.	gestoza E, poród przedwczesny	Apgar 2—4 aspiracja wód płodowych
59/76	30/32 1100/38 2 dni	gestoza E, poronienie zagrażające w 12 t. ż. pł., krwawienie w II trymestrze	Apgar 2—4
58/76	30/32 1200/39 1,5 doby	gestoza E, poronienie zagrażające w 12 t. ciąży, krwawienia w II trymestrze	Apgar 5—7, niewydolność krążeniowo-oddechowa
93/79	30 1100/39 2 dni	bez dolegliwości, poród przedwczesny	Apgar 5—7, ostra niewydolność krążenia, DIC
111/79	30 1300 13 godz.	poród przedwczesny	Apgar 5, zespół błon szklistych
86/79	28 1450/41 13 dni	cholestaza wewnątrzwątrobowa, obciążony wywiad położniczy	Apgar 5, bezdech pierwotny 5', posocznica, zapalenie płuc
55/78	34 1800/48 3 dni	gestoza E, przedwczesne odejście wód płodowych	Apgar 8, zmiany zapalne — ropnie płuc
57/78	34 1400/41 5 dni	przedwczesne odejście wód płodowych, niezgodność Rh, w 25 tyg. zagrażające poronienie	Apgar 2—6 (pierwszy oddech w 7'), zakażenie wewnątrzmaciczne, ropne zapalenie opłucnej, błony szkliste



## morfolożiczna przypadków

Obraz neuropatologiczny mózdku						Obraz neuropatologiczny mózgu
półkula	robak	płat grudko- wo-kłacz- kowy	jądno zębato	istota biała		
5	6	7	8	9	10	
P	-	+	-			uszkodzenie neuronów pnia, obrzęk
Z	-	-	-	+	-	
P	0	+	-			uszkodzenie neuronów pnia
Z	-	-	-	+	-	
P	0	-	+			uszkodzenie neuronów pnia i kory mózgu
Z	-	-	-	+	-	
P	+++	+++	+++			uszkodzenie neuronów pnia i kory mózgu zastój krwi
Z	-	++	++	+++	przekrwienie	
P	+	++	++			krwotok do gniazd macierzy, uszkodzenie neuronów pnia mózgu
Z	-	-	-	+++	przekrwienie	
P	-	-	-	-	przekrwienie, obrzęk	krwotok w macierzy przykomo- rowej
Z	+	-	-			
P	0	+	0	-	pogrubiałe ściany	krwotok podpajęczynówkowy, wybroczyny w macierzy przyko- morowej, uszkodzenie neuronów kory (Amon)
Z	-	-	-		naczyń	
P	-	+	-	+		uszkodzenie neuronów pnia, obrzęk
Z	-	-	-			
P	+	+	+	+++	przekrwienie	uszkodzenie neuronów kory i pnia mózgu
Z	-	+	+			
P	-	++	++	+++		wybroczyny w macierzy, rozsiane uszkodzenie neuronów kory i pnia mózgu
Z	-	-	-			



Tabela 1 c.d.

1	2	3	4
48/76	36 1800/43 5 dni	przedwczesne odejście wód płodowych	Apgar 2 (pierwszy oddech w 3'), choroba krwotoczna noworodków
50/76	34 1900/42 9 godz.	bez dolegliwości, poród przedwczesny	Apgar 7, ostra niewydolność krążeniowo-oddechowa
116/78 117/78	36 brak danych	praca w szkodliwych warunkach	wada rozwojowa płodu, zro ślak
59/78	36 1900/46 9 dni	gestoza E, przedwczesne odejście wód płodowych, zakażenie wewnątrzmaciczne	Apgar 8, posocznica, DIC
64/78	36 2330/48 6 godz.	przedwczesne odejście wód płodowych	Apgar 8, ostra niewydolność krążeniowo-oddechowa
35/80	40 2950/51 1 dzień	cholestaza wewnątrzwątrobową	Apgar 10, niewydolność krążeniowo-oddechowa
109/78	40 brak danych	poronienie zagrażające w 20 tyg. ż. pł.	Apgar 8, niewydolność krążeniowo-oddechowa, kardiomegalia
58/78	40 3660/54 2 dni	gestoza E, obciążony wywiad położniczy	Apgar 10, ostra niewydolność krążeniowo-oddechowa
122/78	40 3800/51 3 tyg.	cholestaza wewnątrzwątrobową	guz śródpiersia, niewydolność krążenia
80/79	40 4000/ 3 dni	cholestaza wewnątrzwątrobową, niezgodność Rh, wypadnięcie pępowiny	Apgar 1-2, 5' bez oddechu, uogólniona posocznica

P — warstwa komórek Purkiniego

Z — warstwa ziarnista

+++ — uszkodzenia komórkowe dużego stopnia

++ — uszkodzenia komórkowe umiarkowanego stopnia

+ — uszkodzenia komórkowe niewielkiego stopnia

0 — nie badane

-- — brak uszkodzeń



	5	6	7	8	9	10
P	++	++	0	-	przekrwienie	uszkodzenie neuronów kory i pnia, obrzęk
Z	-	-	0			
P	+	0	0	+++	-	wybroczyny w macierzy, uszkodzenie neuronów kory
Z	-	0	-			
P	+++	++	++			krwotok w macierzy z przebiegiem do komór, (116/78) uszkodzenie neuronów kory (117/78)
Z	---	-	-	+	-	
P	+	0	0	+	-	
Z	-	0	0	+	-	
P	+	++	+			uszkodzenie neuronów kory, obrzęk, nacieki makrofagowe opon
Z	+	+	-	+++	-	
P	-	+	+			uszkodzenie neuronów kory, krwotok podpajęczynówkowy
Z	-	-	+	0	przekrwienie	
P	-	+	-		przekrwienie,	uszkodzenie neuronów kory, obrzęk
Z	-	-	+	-	wylew krwotoczny	
P	+	+	+	+++	przekrwienie	uszkodzenie neuronów kory i pnia, przekrwienie i pomnożenie naczyń
Z	-	-	+			
P	+	-	+			uszkodzenie neuronów kory i pnia, obrzęk
Z	++	++	++	+++	obrzęk, rozpad	
P	+	-	+	++	obrzęk	uszkodzenie neuronów kory, obrzęk istoty białej półkul, naczyniakowatość opon
Z	++	-	+++			
P	++	+++	+++	+++	obrzęk, glejoza	uszkodzenia neuronów kory i pnia, obrzęk istoty białej, wylew podpajęczynówkowy
Z	++	-	++			



## OMÓWIENIE

W obu przedstawionych grupach przypadków stwierdzono klinicznie zespół zaburzeń wskazujących na istnienie ciężkiej asfiksji okołoporodowej, którą można by uznać za główną przyczynę zgonów noworodków.

Zmiany neuropatologiczne w mózdzku zaobserwowane w pierwszej, młodszej grupie są mniej nasilone niż w półkulach mózgu i niż można by oczekiwać na podstawie zespołu objawów klinicznych. Morfologicznie uchwytnie uszkodzenia występowały tylko w jądrze zębatym oraz w komórkach Purkiniego robaka i płata grudkowo-kłaczkowego. Te okolice kory mózdzku, filogenetycznie starsze, wyprzedzające w dojrzewaniu morfologicznym korę półkul dojrzewają znacznie wcześniej również pod względem metabolicznym, jak wykazały to badania histoenzymatyczne Farkas-Bargeton i Thieffry (1966). Tłumaczy to ich większe zapotrzebowanie energetyczne i związaną z tym większą wrażliwość na asfiksję (Hopkins i wsp. 1980). Opisując zmiany w przypadkach młodszej grupy można jednakże wyrazić wątpliwość, czy ewentualne uszkodzenia mniej dojrzałych okolic nie wymykają się obserwacji ze względu na ich słabe zróżnicowanie, związane z niedojrzałością komórek?

Szczegółowa analiza przypadków drugiej grupy, w której wszystkie elementy zarówno w korze robaka, jak i półkul mózdzku są dobrze widoczne, choć wykazują różny stopień dojrzałości, potwierdza jednak, że okolice dojrzałe o wyższym zapotrzebowaniu energetycznym są w nich bardziej uszkodzone. W korze mózdzku można zaobserwować uszkodzenie wszystkich jej warstw: komórek Purkiniego, warstwy ziarnistej wewnętrznej i zewnętrznej. W kilku przypadkach zwracała uwagę przewaga uszkodzenia neuronów warstwy ziarnistej, co w mózgach dorosłych jest rzadkim zjawiskiem. Martwice warstwy ziarnistej wewnętrznej w okresie okołoporodowym opisała między innymi Larroche (1968) jako nieprawidłowość towarzyszącą rozległej martwicy półkul mózgu. Większą wrażliwość na niedotlenienie komórek warstwy ziarnistej mózdzku w okresie okołoporodowym niż w mózdzku w pełni dojrzałym można tłumaczyć stopniem jej rozwoju. Zmiany w istocie białej: obrzęk, zgębczenie i rozpad również okazały się zależne od stopnia dojrzałości mózdzku. Występowały one przede wszystkim u noworodków donoszonych.

Całokształt zmian w mózdzku u noworodków donoszonych, aczkolwiek wydają się one mniej ciężkie niż współistniejące nieprawidłowości w półkulach mózgu, wskazuje jednak na znaczne jego uszkodzenie w zespole asfiksji okołoporodowej. Podobne obserwacje poczynili Hopkins i wsp. (1980). Ocenę odległych następstw tkankowych uszkodzeń mózdzku w okresie okołoporodowym utrudnia fakt, iż aktywność mitotyczna komórek warstwy ziarnistej zewnętrznej utrzymuje się do okresu popo-



rodowego (Jacobson 1978). Yu i Yu (1980) wykazali wprawdzie, że niedotlenienie hamuje aktywność proliferacyjną komórek zewnętrznej warstwy ziarnistej, można się jednakże spodziewać, że nawet jej częściowe zachowanie umożliwia uzupełnienie ubytków związanych z uszkodzeniem okołoporodowym, zwłaszcza w warstwie ziarnistej wewnętrznej. Tłumaczyłoby to rzadko spotykane doniesienia o obecności zmian w mózdku w przypadkach obciążonych w wywiadzie asfiksją okołoporodową. Ocena zmian w mózdkach u dzieci z ciężkimi mózgowymi uszkodzeniami okołoporodowymi, zmarłych w pierwszych latach życia wydaje się niezbędną dla rozstrzygnięcia tego problemu.

## ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗЖЕЧКА В СИНДРОМЕ ПЕРИНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

### Резюме

Целью работы является оценка влияния перинатальной гипоксии на мозжечок на фоне его развития. Исследованный материал 20 случаев новорожденных умерших в перинатальном периоде разделено на 2 группы — младших новорожденных до 32 недели беременности и старших новорожденных свыше 32 недели беременности. Критерием разделения на группы было развитие слоев коры мозжечка в периоде второй половины беременности, на 32 неделе беременности отчетливо выделяется слой клеток Пуркинье в полушариях мозжечка.

Во всех случаях констатировано клинически существование тяжелой перинатальной асфиксии.

В невропатологическом исследовании изменения в группе младших новорожденных относились главным образом ко клеткам Пуркинье в черве и в узелково-клочковатой доли, т. е. в областях коры филогенетически старших. В группе старших новорожденных повреждения нейронов относились ко всем слоям коры — клеток Пуркинье, внешнему и внутреннему зернистым слоям, охватывали старый и новый мозжечок. Обращает на себя внимание селективное повреждение нейронов зернистых слоев редко встречаемое в послеродовом периоде. Большая восприимчивость к гипоксии нейронов зернистого слоя в перинатальном периоде связана с большой метаболической активностью делящихся клеток внешнего зернистого слоя, которая удерживается еще после родов. Можно предполагать, что хотя бы частичное сохранение нейронов зернистого слоя может поспособствовать восполнению перинатальных повреждений в позднейшем периоде.

Подводя итоги можно сказать, что локализация повреждений нейронов в мозжечке в перинатальном периоде зависит от степени зрелости структуры. Перинатальная гипоксия вызывает повреждающее влияние на зернистые слои мозжечка, которые в этом периоде находятся в фазе активного развития.

## THE PERINATAL DAMAGE OF THE CEREBELLUM

### Summary

The effect of perinatal asphyxia on the cerebellum was estimated with regard to the maturation of this structure. Twenty examined cases were divided into two groups. The first group included newborns below the 32nd week of gestational age, the second group — the older ones. The maturation of the cerebellar cortex is known to take place about two months later in neo-than in archi-cerebellum. The Purkinje cells in the cerebellar hemispheres are discer-



nible in the light microscope since the 32nd week of gestation. This event was accepted as criterion for the classification of our material.

A severe perinatal asphyxia was clinically diagnosed in all cases.

In the first group, lesions of the Purkinje cells were found in vermis and nodulo-floccular lobe, i.e. in phylogenetically old regions. In the second group the damage was visible not only on the Purkinje cells layer, but also in the granular external and internal layers. They were observed in archi- as well as in neo-cerebellar cortex. The lesions of granular layers dominated in some cases. This topography is unusual for older infants.

This indicates a high vulnerability of these layers during the perinatal period, when the divisions of neuroblasts in the external granular (Obersteiner's) layer occur. It is suggested that even a partial sparing of this layer may be sufficient to compensate the perinatal lesions, and therefore they are rarely described in older infants.

It is concluded that the topography of cerebellar lesions in the perinatal period is evidently dependent on the maturation period of this structure. This is most evident in the granular layers of the cerebellar cortex.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Farkas-Bargeton E., Trieffry S.: Maturation histoenzymologique du cortex cerebelleux et de la corne d'Ammon chez l'enfant. *C. R. Acad. Sci.*, 1966, 262, 2271—2274.
2. Friede R. L.: Dating the development of human cerebellum. *Acta Neuropath.*, 1973, 23, 48—58.
3. Hopkins I. J., Farkas-Bargeton E., Larroche J. C.: Neonatal neuronal necrosis: its relationship to the distribution and maturation of oxidative enzymes of newborn cerebral and cerebellar cortex. *Early hum. dev.*, 1980, 4, 51—60.
4. Jacobson M.: *Developmental Neurobiology*. Holt, Rinehart, Winston, New York 1978.
5. Larroche J. C.: Necrose cerebrale massive chez le nouveau-né, *Biol. Neonat.*, 1968, 13, 340—360.
6. Larroche J. C.: *Developmental pathology of the neonate*. Excerpta Medica, Amsterdam, London, New York, 1977, 348.
7. Meyer J. E.: Zür Etiologie und Pathogenese des fetalen und frühkindlicher Cerebralschädens. *Z. Kinderheilk.*, 1949, 6, 123—136.
8. Norman R. M., Urich H., Mc Meneman W. H.: Vascular mechanism of birth injury. *Brain* 1957, 80, 49—58.
9. Towbin A.: Central nervous system damage on the human fetus and newborn infant. Mechanical and hypoxic injury incurred in the fetal neonatal period. *Amer. J. Dis. Child.*, 1970, 119, 529—542.
10. Yu M. C., Yu W. A.: Effect of hypoxia on cerebellar development: morphologic and radioautographic studies. *Exp. Neurol.*, 1980, 70, 652—664.

Adres autorek: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa



ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

ZMIANY CZYNNOŚCI BIOELEKTRYCZNEJ MÓZGU I SERCA  
ORAZ CIŚNIENIA KRWI  
W DOŚWIADCZALNYM KRWOTOKU DO KOMÓR MÓZGOWYCH  
(Z kazuistyki doświadczalnej)

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Zaburzenia czynności serca u pacjentów z krwotokiem mózgu oraz ich mechanizm są przedmiotem badań od szeregu lat. Ostatnio problemem tym zajmowali się Goldstein (1979) oraz Yamour i wsp. (1980). Przyczyny wystąpienia zaburzeń rytmu serca w krwotokach podpajęczynówkowych próbowano wyjaśnić w badaniach doświadczalnych. Wyniki tych badań wskazują, że jedną z głównych przyczyn zaburzeń czynności serca u pacjentów i zwierząt ginących z powodu krwotoku mózgu, jest wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego i nadmierne pobudzenie układu sympatycznego (Burch i wsp. 1970; Estanol i wsp. 1977). Zaburzenia czynności serca podczas wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego u królika obserwowane były również w naszej pracowni w badaniach doświadczalnych nad całkowitym niedokrwieniem mózgowia (Kapuściński i wsp. 1980). Własne obserwacje kliniczne wskazują, że podczas masywnego krwotoku do mózgu u ludzi następuje gwałtowny wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego, czemu towarzyszy maksymalne pobudzenie układu sympatycznego i wzrost układowego ciśnienia tętniczego z zaburzeniami czynności serca (dane niepublikowane). Następstwem tego jest okresowe obniżenie ciśnienia krwi, którego poziom może być krytyczny dla życia. Dlatego też organizm broni się przed śmiercią mobilizując wszystkie możliwe rezerwy hemodynamiczne. Wymioty obserwowane podczas krwotoku do mózgu u ludzi służą temu celowi, ponieważ ich mechanizm polega m. in. na próbie wyrównania zaburzeń krążenia. Towarzyszący wymiotom ponowny wzrost ciśnienia krwi nasila krwotok mózgowy, co jest klasycznym przykładem błędnego koła.

W ostatnim okresie w naszej pracowni przeprowadzono serię badań nad skutkami niedokrwienia mózgu u chomików mongolskich (*Meriones*



*unguiculatus*) (Kapuściński, Mossakowski 1983). Celem zmniejszenia wpływu zabiegu chirurgicznego na uzyskane wyniki, zwierzętom wszczepiano elektrody do zapisu elektrokortykogramu w dniu poprzedzającym właściwe doświadczenia. Na początku doświadczeń u jednego ze zwierząt z ciągłym zapisem czynności bioelektrycznej mózgu, serca oraz ciśnienia krwi wystąpił krwotok dokomorowy rozpoznany pośmiertnie. Wydawało się więc celowe opisanie tego przypadku.

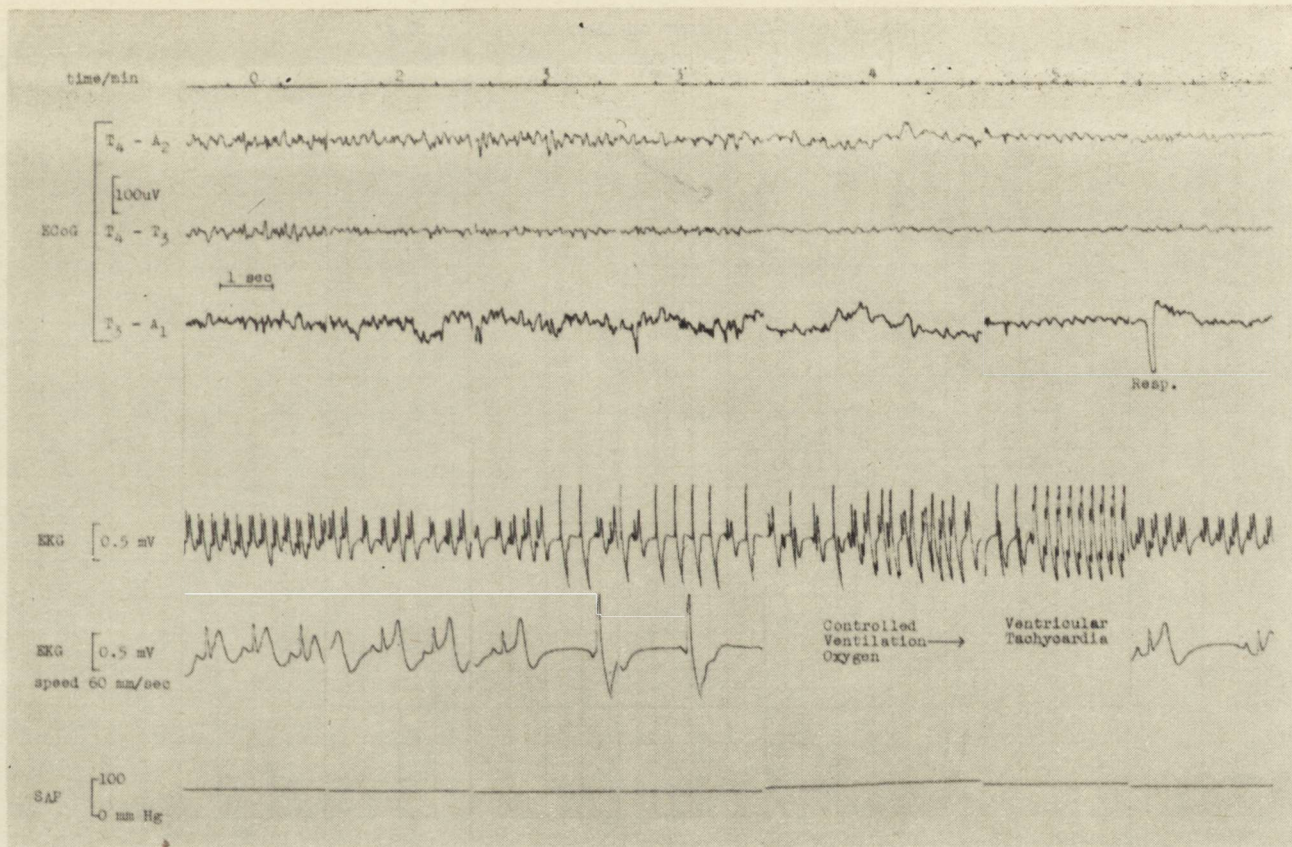
#### MATERIAŁ I METODY

Zwierzę uśpiono Nembutalem wstrzykniętym dootrzewnowo w dawce 70 mg/kg masy ciała. Po odsłonięciu kości czaszki wywiercono 2 symetryczne otwory o średnicy 1 mm w okolicy skroniowej, w które wprowadzono elektrody igłowe do zapisu elektrokortykogramu (ECoG), umieszczając je w kontakcie z oponą twardą i mocując do czaszki przy pomocy kolodium. Następnego dnia po wstrzyknięciu tej samej dawki Nembutalu igłowe elektrody odniesienia wkłuwano w podbródek zwierzęcia. Zapis ECoG prowadzono w układzie jednobiegowym:  $T_4$ — $A_2$  — prawa półkula,  $T_3$ — $A_1$  — lewa półkula oraz w układzie dwubiegowym:  $T_4$ — $T_3$  — odprowadzenie międzypółkulowe, przy stałej czasu 0,03 s i prędkości przesuwu papieru 15 i 60 mm/s. W ocenie zapisu ECoG brano pod uwagę amplitudę i częstotliwość czynności bioelektrycznej mózgu. Elektrokardiogram (EKG) zapisywano wkłuwając elektrody igłowe do prawej przedniej i lewej tylnej łapy (drugie odprowadzenie kończynowe). Układowe ciśnienie krwi (SAP) rejestrowano przez cewnik umieszczony w lewej tętnicy udowej przy użyciu przetwornika ciśnienia (Statham P 23) i elektromanometru (EK 4, Farum). Zmienne fizjologiczne zapisywano w sposób ciągły przy użyciu 8-kanalowego elektroencefalografu (Acutrace 8, Beckman). Następnie preparowano tętnice szyjne wspólne przygotowując je do zamknięcia. W tchawicy umieszczano rurkę tracheotomijną celem prowadzenia kontrolowanej wentylacji.

#### WYNIKI

Po zarejestrowaniu wartości kontrolnych badanych zmiennych, u zwierzęcia jako pierwsze wystąpiły zaburzenia rytmu serca. Charakteryzowały się one na początku okresowym brakiem pobudzeń zatokowych (ryc. 1 — 2 minuta), a w zapisie EKG występował wysoki załamek T. W 3 minucie obserwowano już zmniejszenie się amplitudy i częstotliwości zapisu ECoG w odprowadzeniu dwubiegowym. Towarzyszyły temu znaczne zaburzenia czynności serca z okresowo występującym rytmem węzłowym. Ciśnienie krwi nie wykazywało jeszcze istotnych zmian. Ze względu na pogorszenie czynności bioelektrycznej mózgu

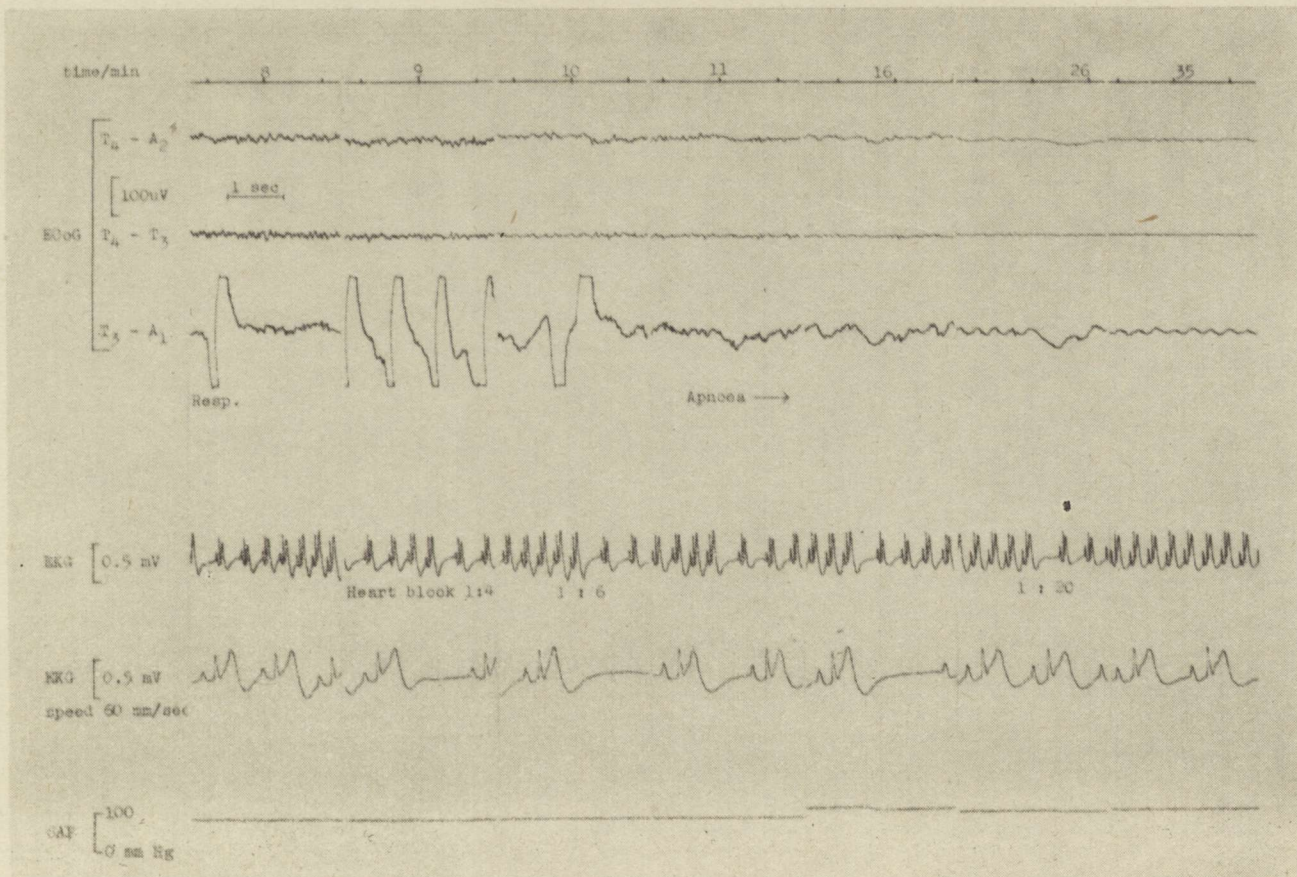




Ryc. 1. Krwotok do komór mózgowych u chomika mongolskiego. Ventricular tachycardia — częstoskurcz komorowy; Resp. — oddech

Fig. 1. Intraventricular hemorrhage in gerbil. Resp. — respiration

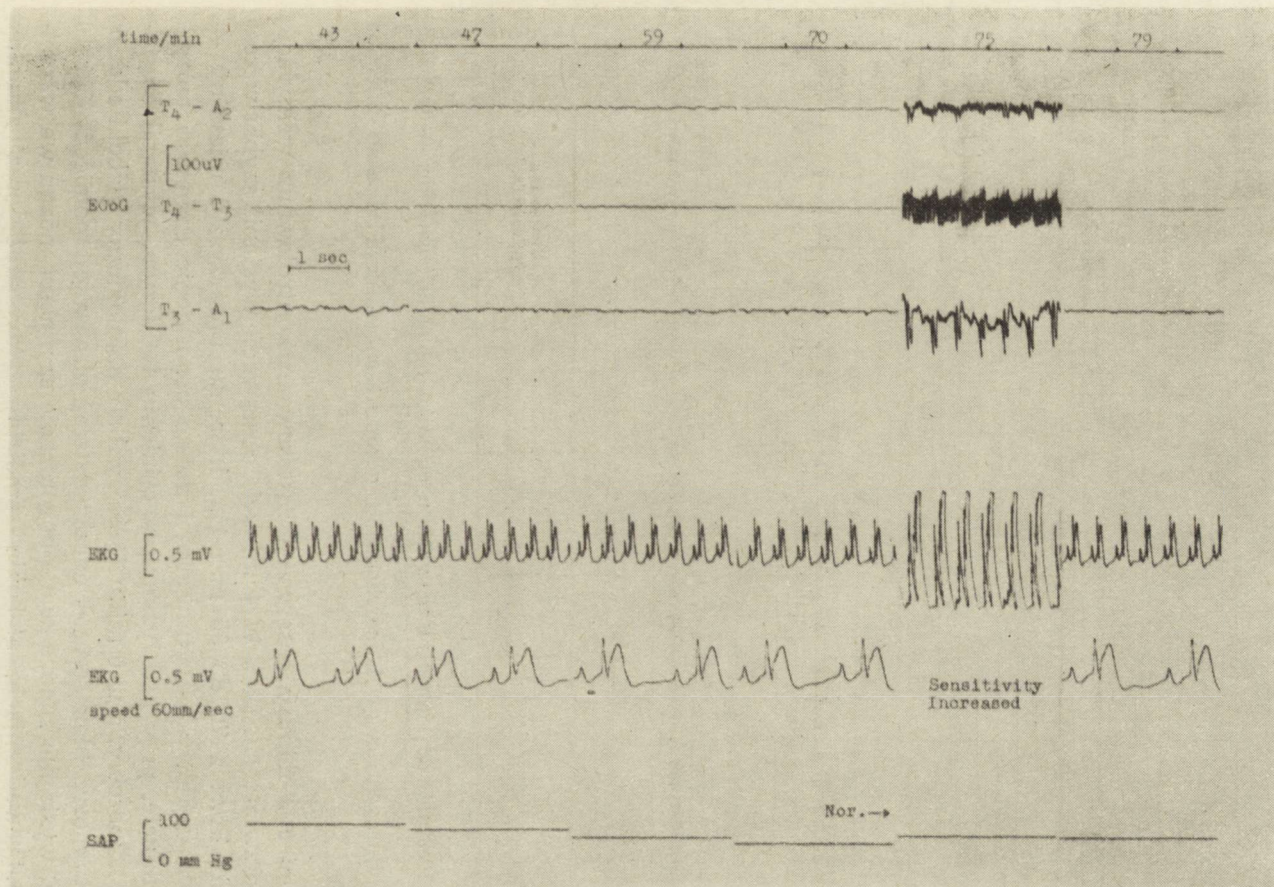




Ryc. 2. Krwotok do komór mózgowych u chomika mongolskiego. Apnoea — bezdech; heart block — blok serca

Fig. 2. Intraventricular hemorrhage in gerbil



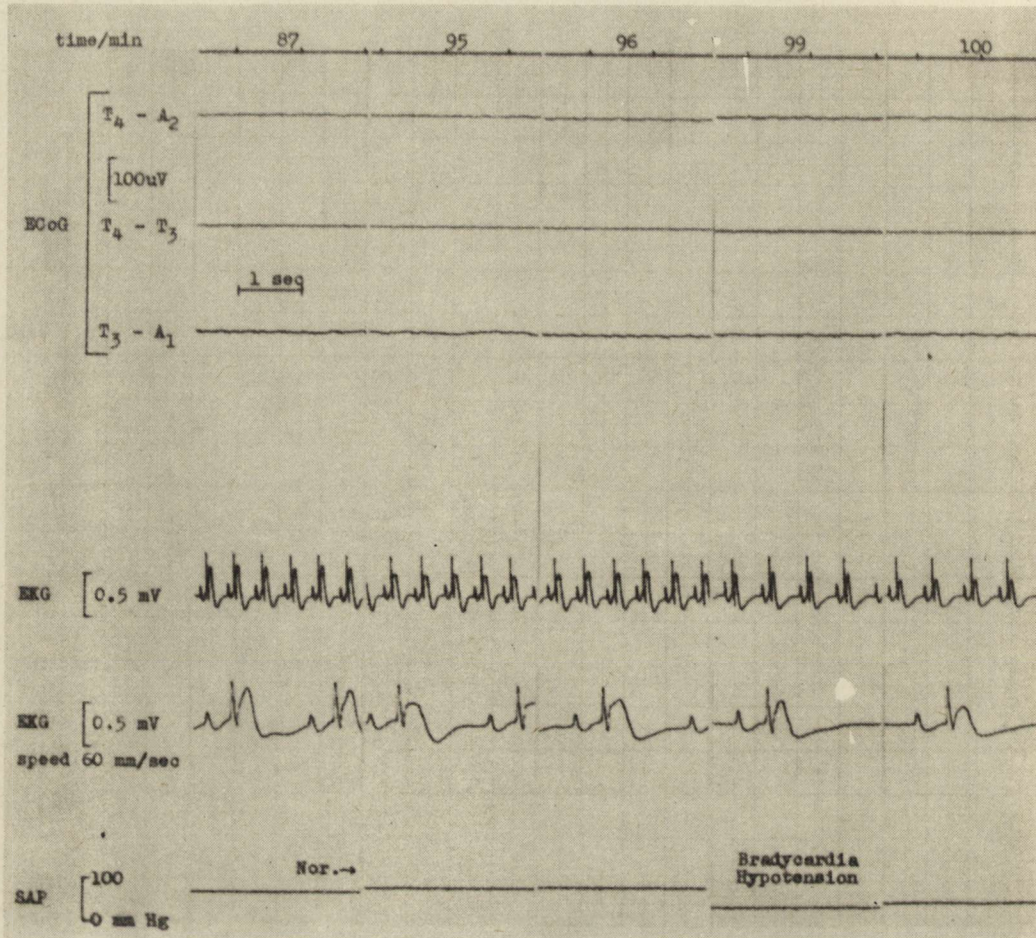


Ryc. 3. Krwotok do komór mózgowych u chomika mongolskiego. Nor — wstrzyknięcie noradrenaliny; sensitivity increased — wzmożona czułość

Fig. 3. Intraventricular hemorrhage in gerbil. Nor — noradrenaline injection

<http://rcin.org.pl>





Ryc. 4. Krwotok do komór mózgowych u chomika mongolskiego. Nor. — wstrzyknięcie noradrenaliny

Fig. 4. Intraventricular hemorrhage in gerbil. Nor. — noradrenaline injection

pod koniec 3 minuty obserwacji zastosowano kontrolowaną wentylację podając zwierzęciu tlen. W 4 minucie obserwacji wystąpił szybki wzrost ciśnienia krwi z 70 do 95 mm Hg, któremu towarzyszył mieszany — zatokowo-węzłowy — rytm serca i dalsze pogorszenie czynności mózgu. W 5 minucie, przy podwyższonym ciśnieniu tętniczym, wystąpił częstoskurcz komorowy, a w 6 minucie pojawił się patologiczny głęboki oddech samoistny oraz blok serca. Podczas dalszej obserwacji pomiędzy 8 i 10 minutą, wystąpiło zdecydowane pogorszenie czynności mózgu we wszystkich odprowadzeniach, głębokie samoistne oddychanie oraz zmienny blok serca (ryc. 2). Ciśnienie krwi w tym okresie utrzymywało się na poziomie 80 mm Hg. W 11 minucie wystąpił bezdech. Podczas dalszej obserwacji (pomiędzy 16 i 35 minutą) czynność bioelektryczna mózgu



zanikała, zmienny blok serca ustępował, a ciśnienie krwi ulegało ponownemu podwyższeniu do 110 mm Hg. Począwszy od 40 minuty zapisywano ciszę bioelektryczną mózgu, zaburzenia rytmu serca ustąpiły przy utrzymującym się wysokim załamku T w zapisie EKG, a ciśnienie krwi powoli się obniżało (ryc. 3). Przy poziomie ciśnienia krwi 50 mm Hg, w 70 minucie obserwacji, zwierzęciu wstrzyknięto dootrzewnowo 0,0005 mg noradrenaliny. Elektroencefalograf po maksymalnym wzmocnieniu w 75 minucie nie wykazywał czynności mózgu. Po przemijającym niewielkim wzroście ciśnienia krwi w 87 minucie powtórzono wstrzyknięcie noradrenaliny, jednakże działała ona już przemijająco. Podczas dalszej obserwacji odmóżdzonego zwierzęcia (ryc. 4) rozwijała się postępująca bradykardia i hipotensja. Sekcja mózgu wykazała masywny krwotok do wszystkich komór mózgowych. Źródłem krwawienia były naczynia mózgowe lewej okolicy skroniowej uszkodzone mechanicznie przez elektrodę ECoG, która wgłębiła się do lewej komory.

#### OMÓWIENIE

Opisany w pracy krwotok do komór mózgowych nie był rozpoznany podczas obserwacji. Przypuszczano, że był to szybko narastający obrzęk mózgu. Przypadek ten został przedstawiony dlatego, że ilustruje szereg badanych i opisywanych w piśmiennictwie mechanizmów. Pierwsze zaburzenia rytmu serca nieznacznie poprzedziły osłabienie czynności bioelektrycznej mózgu. Znaczne zaburzenia rytmu serca w postaci rytmu węzłowego, częstoskurczu komorowego oraz zmiennego bloku przewodnictwa wystąpiły dopiero podczas wzrostu ciśnienia krwi jako następstwo wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego. Zjawiska te będące wynikiem pobudzenia układu sympatycznego są dyskutowane w piśmiennictwie (Burch i wsp. 1970; Estanol i wsp. 1977; Kapuściński i wsp. 1980). Należy również zwrócić uwagę na występowanie w zapisie EKG wysokiego, poszerzonego załamka T oraz wydłużonego odcinka Q-T jako objawów obserwowanych u pacjentów z krwotokiem podpajęczynówkowym z powodu pękniętych tętniaków (Byer i wsp. 1947). Ciekawym i wymagającym dalszych badań zagadnieniem jest ustępowanie zaburzeń rytmu serca w okresie, kiedy zapisywano już ciszę bioelektryczną mózgu i ustała samoistna czynność oddechowa. Można sądzić, że krwotok spowodował w tym czasie wyłączenie czynności zarówno ośrodków oddechowych, jak i ośrodka naczynioruchowego. Przemawia za tym postępujące obniżanie się ciśnienia tętniczego krwi. Godne podkreślenia jest również przemijające działanie noradrenaliny, obserwowane w badaniach nad całkowitym niedokrwieniem mózgu (Pluta 1983). Wskazuje to na to, że w odmóżdżonym organizmie z powodu postępującej hipotensji i bradykardii nie można utrzymać przez dłuższy czas układowego ciśnienia krwi na prawidłowym poziomie.



ИЗМЕНЕНИЯ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА И СЕРДЦА,  
А ТАКЖЕ КРОВЯНОГО ДАВЛЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КРОВОТЕЧЕНИИ  
В МОЗГОВЫЕ ЖЕЛУДОЧКИ

(из экспериментальной казуистики)

Резюме

Описана динамика изменений биоэлектрической функции головного мозга и сердца, а также кровяного давления в ненамеренном кровотоке в мозговые желудочки у монгольского хомяка. Нарушения сердечного ритма предшествовали прогрессирующему ухудшению функции головного мозга, а затем выступили узловым ритмом, желудочковая тахикардия и сердечная блокада. Одновременно возросло давление крови и появились нарушения дыхательной функции ведущие к остановке дыхания. Во время записи биоэлектрической тишины головного мозга нарушения сердечного ритма прекратились, но давления крови нельзя было удержать фармакологически на нормальном уровне. Вскрытие мозга показало массивное кровоизлияние во все мозговые желудочки.

CHANGES OF BRAIN AND HEART BIOELECTRIC ACTIVITY AND BLOOD  
PRESSURE IN EXPERIMENTAL HEMORRHAGE INTO CEREBRAL  
VENTRICLES

(Experimental casuistics)

Summary

Dynamics of changes of brain and heart bioelectric activity and blood pressure was described in the accidental hemorrhage into cerebral ventricles. Disturbances of the heart function proceeded progressive suppression of the brain function and later on manifested in ventricular beats, ventricular tachycardia and heart block. Simultaneously an increase of blood pressure and respiratory disturbances appeared leading to apnoe. During electrocerebral silence, disturbances of the heart function disappeared, however, blood pressure could not be supported pharmacologically at the control level. Post-mortem examination of the brain revealed the massive hemorrhage into all cerebral ventricles.

PIŚMIENICTWO

1. Burch G. E., Colcolough H., Giles T.: Intracranial lesions and the heart. *Am. Heart J.*, 1970, 80, 574—575.
2. Byer E., Ashman R., Toth L. A.: Electrocardiograms with large, upright T waves and long Q-T intervals. *Am. Heart J.*, 1947, 33, 796—806.
3. Estanol B. V., Loyo M. V., Mateos J. H., Foyo E., Cornejo A., Guevara J.: Cardiac arrhythmias in experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 1977, 8, 440—447.
4. Goldstein D. S.: The electrocardiogram in stroke: relationship to pathophysiological type and comparison with prior tracings. *Stroke*, 1979, 10, 253—259.
5. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observation after 30 min bilateral occlusion of the common carotid artery in gerbils. W: Intern. Symp. on Stroke: Animal Models. Wiesbaden 1981. *Advances in the Biosciences*, vol. 43. Red.: E. Stefanovich, Pergamon Press, Oxford 1983, 63—82.



6. Kapuściński A., Tolova S. V., Pluta R.: Some disturbances of cardiovascular system in experimental compression ischemia of the rabbit brain. *Bull. Acad. Sci. Pol.* 1980, 28, 407—415.
7. Pluta R.: Badanie możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, praca doktorska, Warszawa, 1983.
8. Yamour B. J., Sridharan M. R., Rice J. F., Flowers N. C.: Electrocardiographic changes in cerebrovascular hemorrhage. *Am. Heart J.*, 1980, 99, 294—300.

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



WIELISŁAW PAPIERZ, JANUSZ ALWASIAK, ANTONI PRUSIŃSKI

### LEUKOENCEPHALOPATHIA MULTIFOCALIS PROGRESSIVA

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Patologii, Katedra Onkologii  
i Klinika Neurologiczna Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów  
AM, Łódź

Postępująca wielogniskowa encefalopatia (LMP), wyodrębniona jako jednostka kliniczno-morfologiczna w 1958 r. przez Aströma i wsp., jest jedną z najrzadszych chorób demielinizacyjnych. Nazwa wprowadzona przez autorów jej pierwszego opisu, sugerująca zwyrodnieniowy charakter procesu, przyjęła się w piśmiennictwie, mimo że już w 1959 r. Cavanagh i wsp. podejrzewali wirusową etiologię choroby. Przypuszczenie to poparte zostało pracami Zurhein i Chou (1965) oraz Silvermana i Rubinsteina (1965), którzy przy pomocy mikroskopu elektronowego wykryli w przypadkach LMP cząstki wirusopodobne w jądrach oligodendrocytów. Wyizolowanie wirusów z mózgu przez Padgetta i wsp. (1971) przyczyniło się do ugruntowania poglądu o wirusowej etiologii LMP.

Zazwyczaj można wykazać związek choroby z upośledzeniem odporności organizmu w przebiegu chorób układu krwiotwórczego (białaczki, chłoniaki, ziarnica złośliwa) lub w następstwie terapii immunosupresyjnej (przeszczep nerki, przewlekły toczень rumieniowaty, dychawica oskrzelowa, przewlekły gościec stawowy, zapalenie wielomięśniowe — Walker 1978). Niekiedy objawy choroby pojawiają się jednak bez uchwytnej przyczyny (Dąmbska i wsp. 1972; Brun i wsp. 1973; Rockwell i wsp. 1976; Van Horn i wsp. 1978).

#### OPIS PRZYPADKU

Kobietę, lat 26, poddawano przez trzy lata leczeniu immunosupresyjnemu (azatiopryna) z powodu kłębuszkowego zapalenia nerek. Kurację tę przerwano wobec narastającej leukopenii. Kilka tygodni później u chorej pojawiły się objawy afazji czuciowo-ruchowej i niedowład prawych kończyn oraz spowolnienie psychoruchowe. Objawy te nasilały się. Chorą przyjęto do Kliniki Neurologicznej AM w Łodzi (Nr hist.



chor. 29239). Badaniem EEG wykryto znacznego stopnia rozlane zmiany patologiczne z przewagą w odprowadzeniach czołowo-skroniowych po stronie lewej. Lewostronna angiografia szyjna nie wykazała zmian. Badanie przy użyciu komputerowej tomografii osiowej mózgu (Katedra i Zakład Radiologii AM w Warszawie) ujawniło w lewym płacie skroniowym ogniska zmniejszonej gęstości o nierównych obrysach. W dalszym przebiegu choroby niedowład kończyn stopniowo przeszedł w bezwład. Pogorszył się znacznie stan ogólny chorej. Po około 10 tygodniach od wystąpienia pierwszych objawów neurologicznych chora zmarła wśród objawów niewydolności krążeniowo-oddechowej. W rozpoznaniu klinicznym sugerowano wieloogniskową leukoencefalopatię postępującą, biorąc pod uwagę długotrwałą immunosupresję oraz po wykluczeniu procesu naczyniopochodnego i nowotworowego. Również wynik badania CT mógł sugerować LMP (Durham i wsp. 1980).

Badaniem sekcyjnym wykazano, że przyczyną zgonu było obustronne, zlewne zapalenie odoskrzelowe płuc. W wycinkach z nerek potwierdzono mikroskopowo rozpoznanie zapalenia kłębuszkowego.

Mózgowie i rdzeń kręgowy sekcjonowano po uprzednim utrwaleniu w 10% roztworze zobojętnionej formaliny. Powierzchnie zewnętrzne mózgowia, opony miękkie i tętnice koła tętniczego nie wykazywały zmian. Na przekrojach przez mózgowie stwierdzono rozległe obszary demielinizacji, których umiejscowienie przedstawiono schematycznie na rycinie 1. Preparaty barwiono według metod: Klüver—Barrery, Heidenhaina, Bielshowsky'ego, Holzera oraz hematoksyliną i eozyną. Z materiału utrwalonego w formalinie i nie zatopionego w parafinie wyko-

*Ryc. 1.* Schemat umiejscowienia ognisk demielinizacji w mózgowiu

*Fig. 1.* Scheme showing localization of macroscopically observed demyelinating foci

*Ryc. 2.* Ognisko rozpadu mieliny. Wśród licznych komórek żernych widać kilka astrocytów o hiperchromatycznych jądrach. H—E. Pow. 80 ×

*Fig. 2.* Focus of the myelin destruction. Some astroglial cells with hyperchromatic nuclei are seen among macrophages. H—E. × 80

*Ryc. 3.* Okołonaczyniowy naciek zapalny złożony z limfocytów. H—E. Pow. 100 ×

*Fig. 3.* Perivascular inflammatory infiltrate composed of lymphocytes. H—E. × 100

*Ryc. 4.* Przerosły astrocyt z nieregularnym i hiperchromatycznym jądrem — astrocyt „nietypowy”. H—E. Pow. 250 ×

*Fig. 4.* Hypertrophied astrocyte with irregular and hyperchromatic nucleus — „abnormal astrocyte”. H—E. × 250

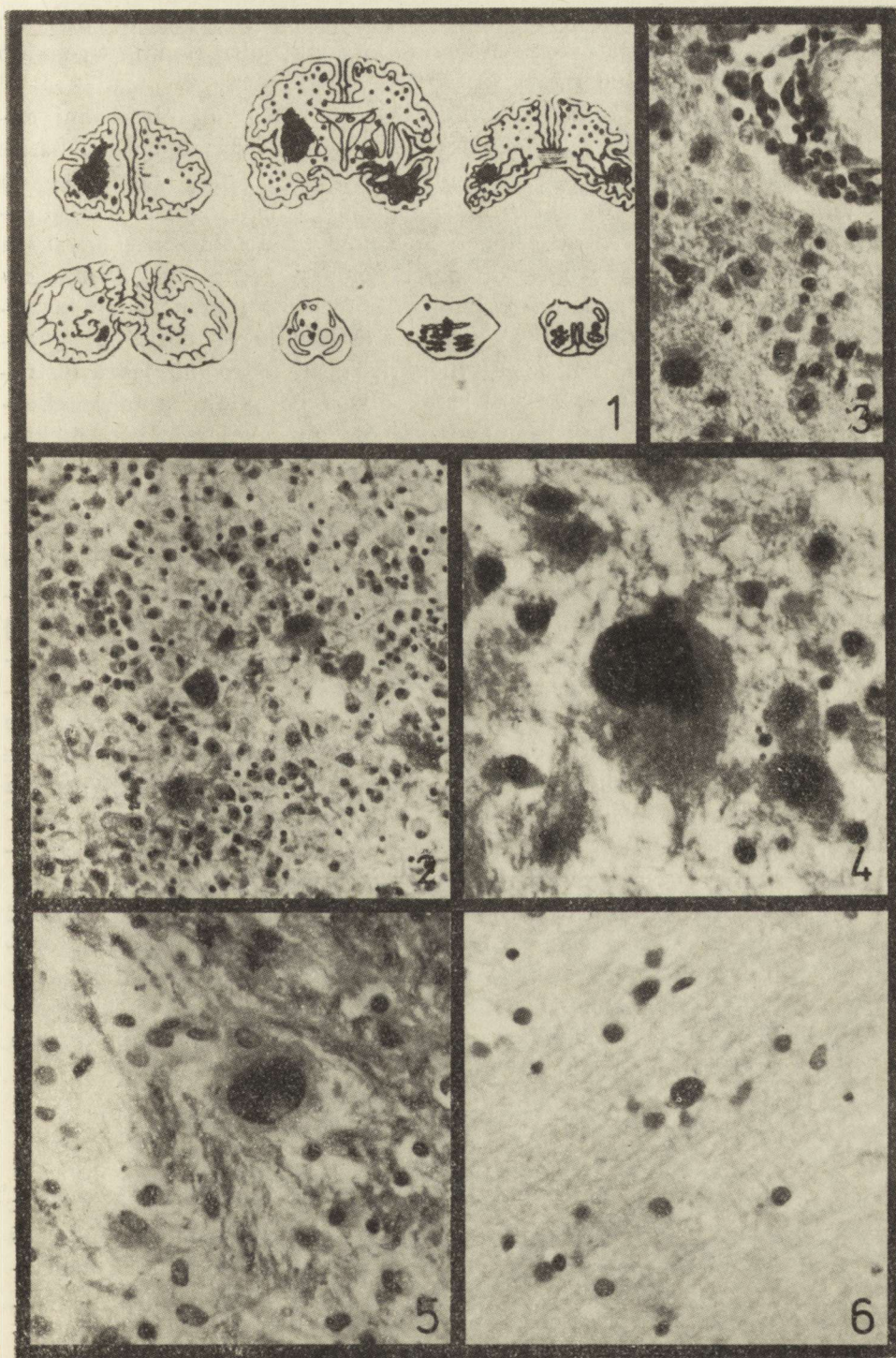
*Ryc. 5.* Oligodendrocyt z wyraźnie powiększonym jądrem wykazującym homogenne przejaśnienie w części środkowej. H—E. Pow. 250 ×

*Fig. 5.* Oligodendrocyte with hypertrophied nucleus containing homogenous „body” in its central part. H—E. × 250

*Ryc. 6.* Powiększone jądra oligodendrogleju w obszarze przylegającym do ogniska destrukcji mieliny. H—E. Pow. 200 ×

*Fig. 6.* Enlarged oligodendroglial nuclei within the area adjacent to focus of the myelin destruction. H—E. × 200







nano preparaty barwione Sudanem III. Pobrano również wycinki do badania w mikroskopie elektronowym. Skrawki ultracienkie oceniano w mikroskopie JEM-100 B.

*Badania w mikroskopie świetlnym.* Poza rozległymi obszarami demielinizacji — widocznymi makroskopowo — stwierdzono bardzo liczne i drobne jej ogniska, które uwidoczniły się w preparatach zabarwionych według Heidenhaina. Na obraz morfologiczny zmian ognisk demielinizacji składały się: 1) rozpad osłonek mielinowych do tłuszczów prostych z uprzątnieniem produktów rozpadu przez komórki żerne (ryc. 2); 2) okołonaczyniowe nacieki zapalne złożone z limfocytów i nielicznych komórek plazmatycznych (ryc. 3); 3) przerost astrogleju — obfita cytoplazma, hiperchromatyczne i nieregularnego kształtu jądro lub jądra (astrocyty „nietypowe” — ryc. 2,4); 4) zanik oligodendrogleju, a także obecność przerosłych komórek skąpowypustkowych, zawierających niekiedy kwasochłonne, homogenne wtręty śródjądrowe (ryc. 5).

W żadnym z ognisk demielinizacji proces uprzątniania produktów rozpadu mieliny nie był całkowicie zakończony. Centralne, a więc najstarsze części dużych ognisk, charakteryzował zanik oligodendrogleju, słaby odczyn zapalny wokół naczyń krwionośnych oraz dość liczne „nietypowe” astrocyty. Świeże ogniska demielinizacji wyróżniały się bardziej nasilonymi naciekami zapalnymi, nielicznymi „nietypowymi” astrocytami i obecnością przerosłych oligodendrocytów. Komórki gleju skąpowypustkowego z powiększonymi jądrami napotymano także w sąsiedztwie obszarów demielinizacji (ryc. 6). Ponadto stwierdzono przerzedzenie neuronów kory w okolicach sąsiadujących z polami rozległych zmian istoty białej. W oponach miękkich mózgu i mózdzku ujawniono ogniskowe, nieobfite skupienia limfocytów. W wycinkach z rdzenia kręgowego nie wykryto istotnych zmian morfologicznych.

W badaniach w mikroskopie elektronowym nie wykryto cząstek wirusopodobnych mimo ich poszukiwania w licznych wycinkach. Negatywny wynik dało także badanie immunologiczne z surowicą przeciw wirusowi SV-40 wykonane metodą peroksydazową na skrawkach parafinowych (badanie wykonano w pracowni neuropatologicznej Ottawa Civic Hospital w Kanadzie; kierownik pracowni B. Lach).

#### OMÓWIENIE

Przedstawiony przypadek zarówno pod względem klinicznym, jak i patomorfologicznym reprezentuje cechy typowe dla leukoencefalopatii wielogniskowej postępującej. Zasadniczym składnikiem obrazu morfologicznego są liczne, różnej wielkości pola rozpadu osłonek mielinowych. Uważa się, że demielinizacja w LMP zachodzi wskutek cytolizy oligodendrogleju, spowodowanej namnażaniem się wirusów w jądrach. Tworzy wirusopodobne wykryto w większości opisanych dotychczas przy-



padków (głównie w materiale pochodzącym z biopsji mózgu). Umiejscowione były one zwykle w jądrach oligodendrogleju, a niekiedy ponadto w astrocytach (Mazlo, Herndon 1977). Wirusy SV-40 i JC, które wykryto w preparatach mikroskopowo-elektronowych lub wyizolowano z mózgu chorych na LMP, należą do grupy papowa. Trzeci z tej grupy, wirus BK wyizolowany przez Gardner i wsp. (1971), może również odgrywać rolę w powstawaniu LMP (Walker 1978).

Wpływem wirusów na astroglej można tłumaczyć powstawanie w LMP „dziwaczych”, przerosłych komórek, przypominających astrocyty nowotworowe. Jest to tym bardziej prawdopodobne, ponieważ wirusy z grupy papowa mają właściwości onkogenne, indukując wzrost nowotworów u niektórych zwierząt doświadczalnych (Brun i wsp. 1973). Spośród wymienionych wirusów czynnikiem etiopatologicznym LMP bywa najczęściej wirus JC. Tym też tłumaczyć można negatywny wynik badania antygeny SV-40 w naszym przypadku (poszukiwania antygeny JC nie przeprowadzono z powodu braku odpowiedniej surowicy). Nie udało się również wykryć wirusów w mikroskopie elektronowym, pomimo przebadania licznych wycinków tkankowych. Można to wiązać z faktem, że dysponowano jedynie materiałem sekcyjnym. Nie przemawia to przeciwko wirusowej etiologii LMP, tym bardziej że w preparatach histopatologicznych stwierdzono ciała wtętowe w jądrach oligodendrocytów. Pewne rozpoznanie kliniczne LMP ustala się w zasadzie tylko na podstawie obrazu morfologicznego biopsji mózgu chorego. Inne metody diagnostyczne, zwłaszcza badania kontrastowe, odgrywają głównie rolę pomocniczą.

Komputerowa tomografia osiowa mózgu (CT) nie wykazuje wprawdzie obrazu swoistego dla LMP, ale rejestrowane tą metodą zmiany są dość typowe (Durham 1980). Rokowanie w LMP jest złe. Choroba trwa zwykle kilka miesięcy i kończy się zgonem chorego. Nie opracowano dotąd skutecznej metody leczenia. Stosowanie cytarabiny (leku hamującego namnażanie się wirusów), skuteczne w kilku przypadkach, w kilku innych spowodowało gwałtowne przyspieszenie choroby (Walker 1978; Van Horn i wsp. 1978). W piśmiennictwie podkreśla się znaczenie wczesnego rozpoznania klinicznego LMP w tych przypadkach, w których spadek odporności organizmu wiąże się ze stosowaniem leków immunosupresyjnych (Walker 1978). Zaprzestanie takiego leczenia powoduje niekiedy zahamowanie postępu LMP. W tym kontekście warto jest podkreślenia, że w naszym przypadku neurologiczny zespół kliniczny rozwinął się w kilka tygodni po zaprzestaniu podawania azatiopryny.

\*

Autorzy dziękują Panu dr. med. Bolesławowi Lachowi z Ottawa Civic Hospital w Kanadzie za wykonanie badania immunologicznego.



## ПРОГРЕССИРУЮЩАЯ МНОГООЧАГОВАЯ ЛЕЙКОЭНЦЕФАЛОПАТИЯ

Замечания по поводу случая

## Резюме

Представлен случай 26-летней женщины подвергнутой нескольколетнему иммуносупрессионному лечению по поводу клубочкового нефрита. Спустя два месяца после прекращения иммуносупрессионной терапии у пациентки выступили неврологические симптомы: сенсорно-моторная афазия, нарастающий парепарез и психо-двигательное замедление. Больная умерла в три месяца от появления неврологических симптомов.

Клинически диагностировано прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию. Морфологическое исследование головного мозга проявило многочисленные протяженные и мелкие очаги демиелинизации находящиеся в разных фазах развития. В этих очагах находились периваскулярные воспалительные инфильтраты, гигантские астроциты со странными и гиперхроматическими ядрами, а также олигодендроциты содержащие внутриядерные инклюзии. Хотя при помощи электронно-микроскопного исследования не удалось выявить вирусоподобных молекул, однако случай представляет собой типичную картину морфологических изменений характерную для многоочаговой лейкоэнцефалопатии.

## PROGRESSIVE MULTIFOCAL LEUKOENCEPHALOPATHY

(Some remarks on the basis of one case)

## Summary

The presented case concerns a 26 year old woman, who was given immunosuppressive therapy for three years due to glomerulonephritis. Two months after cessation of immunosuppression she showed some neurological symptoms (sensory-motor aphasia, right and then left side hemiparesis). The patient died in the third month of disease.

Clinical diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) found confirmation in the neuropathological examination. The brain revealed widespread focal demyelination, which ranged from microscopic foci to huge confluent areas found in both hemispheres, brain stem and cerebellum.

Perivascular inflammatory infiltrates, reactive fibrillary astrocytes with giant, bizarre forms were observed as well as intranuclear inclusion bodies in oligodendrocytes. However, electron-microscopic examination did not reveal any cell with virus-like particles. In spite of that the presented case reveals typical pattern of changes characteristic for PML.

## PIŚMIENNICTWO

1. Aström K. E., Mancall E. L., Richardson E. P. Jr.: Progressive multifocal leuko-encephalopathy. *Brain*, 1958, 81, 93—111.
2. Brun A., Nordenfeldt E., Kjellen L.: Aspects on the variability of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1973, 24, 232—243.
3. Cavanagh J. B., Greenbaum D., Marshall A. H. E., Rubinstein L. J.: Cerebral demyelination associated with disorders of the reticuloendothelial system. *Lancet*, 1959, 2, 524—529.
4. Dąmbska M., Korthals J., Mossakowski M. J.: Postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 545—554.



5. Durham D. S., Fryer J. A., O'Neill B. J., Williamson P. M.: Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Med. J. Aust.*, 1980, 2, 502—504.
6. Gardner S. D., Field A. M., Coleman D. V., Hulme B.: New human papovavirus (BK) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*, 1971, 1, 1253—1257.
7. Mazlo M., Herndon R. M.: Progressive multifocal leukoencephalopathy: ultrastructural findings in two brain biopsies. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1977, 3/5, 323—339.
8. Padgett B. L., Walker D. L., Zurhein G. M., Eckroade R. J., Dessel B. H.: Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet*, 1971, 1, 1257—1260.
9. Rockwell D., Ruben F. L., Winkelstein A., Mandelow H.: Absence of immune deficiencies in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Amer. J. Med.*, 1976, 61, 433—436.
10. Silverman L., Rubinstein L. J.: Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1965, 5, 215—224.
11. Walker D. L.: Progressive multifocal leukoencephalopathy: an opportunistic viral infection of the central nervous system. W: *Handbook of clinical neurology*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn, North Holland Publ., Amsterdam 1978, vol. 34, 307—329.
12. Van Horn G., Bastian F. O., Moake J. L.: Progressive multifocal leukoencephalopathy: Failure of response to transfer factor and cytarabine. *Neurology*, 1978, 28, 794—797.
13. Zurhein G. M., Chou S. M.: Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science* 1965, 148, 1477—1479.

Adres autorów: Zakład Anatomii Patologicznej AM, ul. Narutowicza 96, 90-141 Łódź



## DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W dniu 8 czerwca 1983 r. Rada Państwa nadała tytuł naukowy profesora zwyczajnego prof. dr hab. med. Antoniemu Prusińskiemu, kierownikowi Kliniki Neurologicznej AM w Łodzi.

Tytuły profesorów nadzwyczajnych tegoż dnia otrzymali:

— doc. dr hab. med. Hanna Jędrzejowska-Kuśakowska, kierownik Kliniki Neurologicznej Zespołu Nauczania Klinicznego II Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie,

— doc. dr hab. med. Antoni Musioł, kierownik Kliniki Neurologicznej Śl. AM w Katowicach.

\*

Rada Wydziału Lekarskiego AM w Poznaniu nadała w dniu 18 marca 1981 r. stopień naukowy doktora habilitowanego nauk medycznych w zakresie neurologii dr med. Andrzejowi Wajgtowi z Kliniki Neurologicznej AM w Poznaniu. Tematem pracy habilitacyjnej była „Rola zjawisk odpornościowych w etiopatogenezie stwardnienia rozsianego”.

W dniu 29 czerwca 1983 r. ta sama Rada nadała stopień naukowy doktora habilitowanego nauk medycznych w zakresie neurochemii dr farm. Zofii Adamczewskiej-Goncerzewicz, również z Kliniki Neurologicznej AM w Poznaniu. Tematem rozprawy habilitacyjnej był „Rozwój nerwu wzrokowego królika w świetle badań lipidowych”.

\*

W dniu 26 maja 1983 r. w Instytucie Psychoneurologicznym w Warszawie odbyła się pod przewodnictwem prof. I. Walda narada Specjalistów Wojewódzkich w dziedzinie neurologii. Jednym z punktów programu było omówienie przez prof. J. Dymckiego aktualnej sytuacji w zakresie neuropatologii. W dyskusji zwrócono uwagę na trudności w zakresie badań neuropatologicznych w terenie. Podkreślono, że sekcyjna weryfikacja rozpoznań klinicznych stanowi sprawdzian poziomu diagnostyki i terapii danego oddziału i winna stanowić istotny punkt oceny przy okazji wizytacji oddziałów przez specjalistów wojewódzkich. Liczba pracowników neuropatologicznych w kraju jest zbyt mała, działają one głównie przy Klinikach Neurologicznych AM. Terenowe oddziały neurologiczne mogłyby nawiązać z nimi współpracę i zapewnić sobie w ten sposób weryfikację sekcyjną materiału mózgowego oraz wykonywanie biopsji mięśni i nerwów obwodowych. Makroskopowe sekcje mózgu winny być wykonywane po utrwaleniu mózgowia w formalinie i przy zastosowaniu przekrojów czołowych, co pozwala na lepszy wgląd w topografię i strukturę zmian, niż praktykowane tradycyjnie przez patomorfologów sekcjonowanie mózgów nie utrwalonych po otwarciu układu komorowego tzw. „ciąciem książkowym”. W szpitalach, gdzie istnieją pracownie patomorfologii, pożądane byłoby nawiązanie współpracy z patomorfologami w celu unowocześnienia metod diagnostyki neuropatologicznej. Zwrócono również uwagę na niepokojące zjawisko spadku liczby wykonywanych w szpitalach sekcji ogólnych, co związane jest z niedoborem kadry patomorfologów.

\*

W Ośrodku Badań nad Nowotworami w Leyden (Holandia) powstał Międzynarodowy Rejestr Rodzinnych Przypadków Guzów Mózgu. Celem jego jest rejestracja wszystkich przypadków rodzinnego występowania guzów mózgu. Ośrodek



zwraca się z prośbą o nadsyłanie informacji z całego świata o takich przypadkach, zarówno publikowanych, jak i niepublikowanych.

Wstępne wyniki badań Ośrodka zostały opublikowane w dziele:

Tijssen C. C., Halprin M. R. and Endtz L. J., 1982,  
Familiar Brain Tumours, A Commented Register,  
Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands.

Adres Ośrodka:

International Register of Familial Brain Tumours (IRFBT)  
Comprehensive Cancer Centre,  
Vondellaan 47, 2332 AA Leyden  
The Netherlands.

*Jerzy Dymecki*



## WARUNKI PRENUMERATY

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

- do dnia 26 listopada na I półrocze roku następnego i na cały następny,
- do 31 maja na II półrocze roku bieżącego.

półrocznie	— 200.— zł
rocznie	— 400.— zł

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych. Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. Prenumerata ze zleceniem za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.



## CONTENTS

Mirosław J. Mossakowski, Lubomira Dydyk, Mieczysław Śmiałek: Selective white matter damage due to manganese intoxication . . . . .	455
Mieczysław Wender, Maria Śniatała-Kamasa, Aleksander Piechowski: Myelin associated glycoprotein (MAG) of the optic nerve in triethyl tin (TET) intoxication . . . . .	469
Lesław J. Maziarz: Influence of vincristin treatment on corpus callosum myelination in young rats . . . . .	475
Wojciech Hilgier, Jan Albrecht, Zuzanna Kraśnicka: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations . . . . .	487
Zuzanna Kraśnicka, Jan Albrecht, Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. II. Cytochemical and ultrastructural studies on astrocytes cultured <i>in vitro</i> . . . . .	495
Wojciech Hilgier: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. III. Preliminary evaluation of ammonia metabolism . . . . .	511
Urszula Wysmyk-Cybula: Attempt of evaluation of $\alpha$ -aminobutyric acid metabolism in the rat brain in experimental encephalopathy . . . . .	519
Milena Laure-Kamionowska, Maria Dąbbska: The perinatal damage of the cerebellum . . . . .	529
Andrzej Kapuściński: Changes of brain and heart bioelectric activity and blood pressure in experimental hemorrhage into cerebral ventricles (Experimental casuistics) . . . . .	543
Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak, Antoni Prusiński: <i>Progressive multifocal leucoencephalopathy</i> (Some remarks on the basis of one case) . . . . .	553
Chronicle and Information (Jerzy Dymecki) . . . . .	560



SPIS TREŚCI

Mirosław J. Mossakowski, Lubomira Dydyk, Mieczysław Śmiałek: Wybiórcze uszkodzenie istoty białej w zatruciu manganem . . . . .	455
Mieczysław Wender, Maria Sniatała-Kamasa, Aleksander Piechowski: Glikoproteina związana z mielina (MAG) nerwu wzrokowego w zatruciu trójetylkiem cyny (TET) . . . . .	469
Lesław J. Maziarz: Mielinizacja spoidła wielkiego u szczura w następstwie stosowania winkrystyny w rozwoju pozapłodowym . . . . .	475
Wojciech Hilgier, Jan Albrecht, Zuzanna Kraśnicka: Encefalopatia wątrobowa u szczura wywołana podawaniem tioacetamid. I. Wstępne badania morfologiczne i biochemiczne . . . . .	487
Zuzanna Kraśnicka, Jan Albrecht, Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski: Encefalopatia wątrobowa u szczura wywołana podawaniem tioacetamid. II. Badania cytochemiczne i ultrastrukturalne astrocytów w hodowli <i>in vitro</i> . . . . .	495
Wojciech Hilgier: Encefalopatia wątrobowa u szczura wywołana podawaniem tioacetamid. III. Zawartość amoniaku i substratów jego metabolizmu w mózgu . . . . .	511
Urszula Wysmyk-Cybula: Próba oceny metabolizmu kwasu $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej . . . . .	519
Milena Laure-Kamionowska, Maria Dąbska: Uszkodzenia mózdzku w zespole niedotlenienia okołoporodowego . . . . .	529
Andrzej Kapuściński: Zmiany czynności bioelektrycznej mózgu i serca oraz ciśnienia krwi w doświadczalnym krwotoku do komór mózgowych (Z kazuistyki doświadczalnej) . . . . .	543
Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak, Antoni Prusiński: <i>Leukoencephalopathia multifocalis progressiva</i> . Uwagi na marginesie przypadku . . . . .	553
Dział kroniki i informacji (Jerzy Dymecki) . . . . .	560

СОДЕРЖАНИЕ

Мирослав Я. Моссаковский, Любомира Дыдык, Мечислав Сьямялк: Селективное повреждение белого вещества в отравлении марганцом . . . . .	455
Мечислав Вендер, Мария Снятала-Камаса, Анджей Пеховски: Глюкопротеид объединенный с миелином (MAG) зрительного нерва в отравлении триэтиловом (TET) . . . . .	469
Леслав Я. Мазяж: Миелинизация большой спайки у крысы вследствие применения винкристина во внеэмбриональном развитии . . . . .	475
Войцех Хильгер, Ян Альбрехт, Зузанна Красьницка: Печеночная энцефалопатия у крысы вызванная введением tioacetamida I. Предварительные морфологические и биохимические исследования . . . . .	487
Зузанна Красьницка, Ян Альбрехт, Барбара Гайковска, Мирослав Я. Моссаковский: Печеночная энцефалопатия у крысы вызванная введением tioacetamida II. Цитохимические и ультраструктурные исследования астроцитов в культуре . . . . .	495
Войцех Хильгер: Печеночная энцефалопатия у крысы вызванная введением tioacetamida III. Предварительная оценка метаболизма аммиака . . . . .	511
Уршуля Высмык-Цыбуля: Попытка оценки метаболизма $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) в головном мозге у крысы в экспериментальной печеночной энцефалопатии . . . . .	519
Милена Ляуре-Камиионовска, Мария Домбска: Повреждения мозжечка в синдроме перинатальной гипоксии . . . . .	529
Анджей Капусьдиньски: Изменения биоэлектрической функции головного мозга и сердца, а также кровяного давления в экспериментальном кровотоке в мозговые желудочки (Из экспериментальной кazuистики) . . . . .	543
Велислав Папез, Януш Альвасяк, Антони Прусиньски: Прогрессирующая многоочаговая лейкоэнцефалопатия. Замечания по поводу случая . . . . .	553
Отдел хроники и информации (Ежи Дымецкий) . . . . .	560