

p. 105

11 ep.

z dom

egz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 22

1984

ZESZYT 1

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 22

1984

ZESZYT 1

KOMITET REDAKCYJNY

Janusz Alwasiak, Maria Dąbbska, Jerzy Dymecki, Janusz Groniowski, Józef Kaluża, Mirosław B. Kozik, Jerzy Kulczycki, Mirosław J. Mossakowski, Mieczysław 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, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław 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 1984.
Nakład: 550 egz. Objętość: ark. wyd. 11,70, ark. druk. 10, ark. A₁-13.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100. Oddano do składania 30 X 1983.
Podpisano do druku 11 IV 1984. Druk ukończono w kwietniu 1984.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 2371/83. Z-9. Cena zł 100.-



JANINA RAFAŁOWSKA

DOJRZEWANIE MIELINY, DEMIELINIZACJA I REMIELINIZACJA W OŚRODKOWYM I OBWODOWYM UKŁADZIE NERWOWYM *

Klinika Neurologiczna AM, Warszawa

DOJRZEWANIE MIELINY

Mielinizacja jest ważnym kryterium dojrzałości morfologicznej i biochemicznej oraz prawidłowej czynności komórki oligodendrogleju i komórki Schwanna. Badania nad mielinizacją ośrodkowego (OUN) i obwodowego układu nerwowego (PUN) prowadzone są w głównej mierze na materiale doświadczalnym. Materiał ten, badany w mikroskopie elektronowym, dał możliwość oceny procesu mielinizacji w różnych okresach rozwoju oraz pozwolił na wyjaśnienie niektórych podstawowych elementów tego procesu. Okazało się, że u różnych gatunków kręgowców mielinizacja przebiega podobnie i postępuje w kierunku ksobno-odsiebny i czaszkowo-ogonowy (z pewnymi odchyleniami dotyczącymi określonych zespołów neuronów, których rozwój ma znaczenie w czynności odruchowej). Powyższe dane znalazły potwierdzenie w dość wrywkowych pracach dotyczących mielinizacji u człowieka.

Mielinizacja w ośrodkowym układzie nerwowym

Przy pomocy tymidyny znakowanej trytem wykazano na materiale doświadczalnym gwałtowną proliferację komórek oligodendrogleju — tzw. glejozę mielinizacyjną — poprzedzającą mielinizację w ośrodkowym układzie nerwowym (Schonbach i wsp. 1968). Glejozę mielinizacyjną wykazano również w badaniach OUN człowieka (Friede 1961; Maślińska 1974; Rafałowska 1979). Glejoza doprowadza do znacznego zwiększenia liczby komórek glejowych, przypadających na 1 akson, jednak do stosunku 1 komórka — 1 akson, jak to ma miejsce w obwodowym układzie nerwowym, nie dochodzi (Samorajski, Friede 1968). W związku z tym istnieje koncepcja, że oligodendrocyt może wytwarzać mielinę w kilku

* Pracę wykonano w ramach planu węzłowego 10.4.05.4.1.

międzywęzłach, a nawet w szeregu aksonów (Peters 1962). Możliwe, że do tworzenia mieliny dochodzi w tych wszystkich częściach cytoplazmy oligodendrocytów, które przylegają do aksonu (Hirano, Dembitzer 1967). Prawdopodobnie bodźcem do mielinizacji jest dojrzałość morfologiczna komórek nerwowych (Peterson, Murray 1955) i ich metabolizm wpływający na przepływ aksonalny oraz na wzrost średnicy aksonu do $0.3 \mu\text{m}$ (Matthews 1968). Przy tej średnicy aksonu zaczyna się w OUN proces mielinizacji. Wypustka oligodendrocytu otacza na określonej długości włókno tworząc mezakson, pomiędzy błonami którego znajduje się cytoplazma komórki. Następnie tworzą się dalsze luźne skręty komórki mielinizującej (Peters 1960). Dzięki przyleganiu do siebie błon komórkowych wypustki oligodendrocytów tworzą się linie elektronowe — cienka gęsta i gruba gęsta — powtarzające się w odstępach $10,5\text{--}11,5 \mu\text{m}$. Wraz z postępem mielinizacji liczba skrętów wzrasta, czego efektem jest powstanie zbitej osłonki mielinoj. W przeciwieństwie do nerwu obwodowego, w OUN różnych gatunków kręgowców nie ma ścisłej zależności pomiędzy liczbą warstw mieliny u osobnika dorosłego a średnicą aksonów (Reine 1977; Hildebrand, Hahn 1978). Komórka oligodendrogleju mielinizuje odcinek jednego lub szeregu aksonów, tworząc międzywęzła, pomiędzy którymi powstaje przewężenie Ranviera, w przeciwieństwie do włókna w PUN nie osłonięte cytoplazmą komórki mielinizującej i błoną podstawną. Długość międzywęzła zależy od średnicy włókna (Peters, Vaughn 1970).

Mielinizacja w obwodowym układzie nerwowym

Badania nad mielinizacją obwodowego układu nerwowego u zwierząt i człowieka (Peters, Muir 1958; Cravioto 1965; Gamble 1966; Asbury 1967; Ochoa 1971) wykazały, że proces ten jest zbliżony do procesu mielinizacji w OUN. Pozwoliły one na wyodrębnienie stadiów rozwoju komórki Schwanna: 1) sznury komórek Schwanna wzdłuż pęczków aksonów, 2) migracja komórek, 3) podziały komórek, 4) mielinizacja (Cravioto 1965). W okresie migracji dochodzi do podziału na mniejsze pęczki bardzo licznych (500—800) małych aksonów związanych dotąd z 1 komórką Schwanna (Gamble 1966; Ochoa 1971). Równoległe ze wzrostem wielkości aksonów dochodzi do rozplemu komórek Schwanna, które dzielą pęczki aksonów na mniejsze niż poprzednio wiązki, zawierające po 50—150 aksonów. Powoduje to zwiększenie się kontaktu aksonów z cytoplazmą komórki Schwanna (Martin, Webster 1973). Podział komórek Schwanna trwa do czasu, gdy 1 komórka Schwanna przypada na 1 akson, czyli do wytworzenia się włókien przedmielinowych (Friede, Samorajski 1968). Etap ten jest początkiem mielinizacji (Cravioto 1965; Fraher 1972; Webster i wsp. 1973). Podobnie jak w OUN, jednym z bodźców do mielinizacji jest wzrost średnicy aksonu do około $1 \mu\text{m}$, niezależnie od gatunku zwierzęcia (Matthews 1968). Utworzenie wewnętrznego mezaksonu jest

początkiem mielinizacji, która przebiega podobnie jak w OUN — osłonka mielinowa wykazuje jednak pewne różnice w stosunku do mieliny OUN. Jedna komórka Schwanna mielinizuje jeden odcinek włókna nerwowego. W części proksymalnej nerwu (bliższej komórce macierzystej włókna) proces zaczyna się wcześniej. Tworzące się międzywęzła wyznaczają przewężenia Ranviera. W przeciwieństwie do włókna nerwowego w OUN, w PUN wypustka cytoplazmy komórki Schwanna oraz błona podstawna otaczają całe włókno mielinowe wraz z przewężeniem Ranviera (Peters, Vaughn 1970). Stały stosunek: średnica aksonu — grubość osłonki mielinowej — długość międzywęzła (Friede, Samorajski 1967; Matthews 1968) jest zakłócony jedynie w długich nerwach obwodowych, pochodzących z korzeni przednich odcinka krzyżowego rdzenia kręgowego (Friede i wsp. 1981) oraz w okresie mielinizacji (Gamble i wsp. 1978), w czasie której, zarówno w OUN, jak i w PUN, pojawiają się tzw. krótkie międzywęzła (Fracher 1978). Proces mielinizacji układu nerwowego u człowieka jest długotrwały; rozpoczyna się w korzeniach brzusznych odcinka szyjnego rdzenia kręgowego w 18 tygodniu życia płodowego (Niebrój-Dobosz i wsp. 1980b), następnie obejmuje stare filogenetycznie szlaki rdzenia kręgowego i korzenie grzbietowe, stare filogenetycznie szlaki w pniu mózgu oraz połączenia struktur podkorowych (Dekaban 1959). Istota biała półkul mózgowych i mózdzku oraz szlaki młode filogenetycznie (np. piramidowy boczny) są u noworodka ludzkiego niezmielinizowane. Nie wiadomo dokładnie, kiedy kończy się proces mielinizacji w OUN. W PUN średnice aksonu odpowiadające średnicom aksonów osobnika dorosłego zostają osiągnięte w wieku 5—9 lat (Rexed 1944). Należy przypuszczać, że w tym okresie proces mielinizacji zostaje zakończony. Możliwości interpretacyjne morfologicznych badań tego procesu nie są zbyt wielkie. Mikroskop elektronowy daje obraz bardzo ograniczonego obszaru tkanki i, mimo możliwości ilościowej oceny blaszek mieliny, nie pozwala na wnioskowanie o całości procesu. Mikroskop świetlny pozwala, z pewnym trudem, na określenie początku procesu mielinizacji, nie daje jednak możliwości ustalenia, czy proces jest zakończony, a mielina całkowicie dojrzała. Skorelowane badania morfologiczne i biochemiczne (Niebrój-Dobosz i wsp. 1980a,b) wykazały, że z postępem mielinizacji i nawarstwianiem blaszek mieliny idzie w parze jej dojrzewanie biochemiczne, przejawiające się zmianą stosunku frakcji mielinowych na korzyść mieliny ciężkiej i frakcji błonowej, wzrostem ilości cholesterolu i cerebrozydów (uznanego wskaźnika mielinizacji — Svennerholm, Vanier 1972) oraz spadkiem ilości kwasów tłuszczowych i trójglicerydów. Wykazano, że w okresie, gdy brak jeszcze morfologicznych cech mielinizacji, można wyodrębnić — niedojrzałe co prawda — frakcje mieliny. Badania te pozwoliły także na stwierdzenie, że w okresie gdy obraz morfologiczny wskazywał na zakończoną mielinizację, nie została osiągnięta jeszcze chemiczna dojrzałość mieliny. Wydaje się to

ważne w codziennej praktyce neuropatologicznej. Istotna jest bowiem umiejętność odróżnienia procesu chorobowego od niepełnej dojrzałości mieliny. W procesach chorobowych toczących się w niedojrzałym układzie nerwowym należy umieć zróżnicować, które cechy stanowią przejaw niepełnej mielinizacji, a które są wykładnikiem demielinizacji lub regeneracji mieliny.

DEMIELINIZACJA I REMIELINIZACJA W OŚRODKOWYM I OBWODOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Rozwój mikroskopii elektronowej, ultracytochemii, immunologii oraz stara metoda czesania włókien nerwowych pozwoliły na próby wyjaśnienia trudnych do interpretacji zjawisk klinicznych i pogłębienia danych, dostarczanych przez neuropatologię kliniczną. Stało się możliwe poszukiwanie mechanizmów różnych procesów chorobowych, między innymi chorób demielinizacyjnych ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego.

Zespoły i objawy kliniczne stanowiły inspirację do tworzenia modeli doświadczalnych. Modele te pozwalają na prześledzenie kolejnych etapów procesu demielinizacji pierwotnej (wynikającej z uszkodzenia komórki mielinotwórczej lub osłonki mielinowej) oraz regeneracji mieliny.

Jednymi z pierwszych doświadczeń, wywołujących demielinizację ocenianą w mikroskopie elektronowym i świetlnym, były upusty i ponowne wstrzyknięcia płynu mózgowo-rdzeniowego u kotów. Pierwsze cechy rozpadu mieliny pojawiają się po 2 dniach, a pełną demielinizację na obwodzie rdzenia kręgowego stwierdza się w mikroskopie świetlnym w 8 dniu doświadczenia. W 2 tygodniu wśród licznych komórek fagocytarnych wyróżnia się komórki „gleju reaktywnego”, biorące udział w remielinizacji zdemielinizowanych aksonów, a powstające z oligodendrocytów. Mielina tworzy się przez spiralne skręty płaszczyznowych wypustek komórki mielinizującej dookoła aksonu. Pierwszy pełny skręt spirali tworzy wewnętrzny mezakson. Obecna początkowo w obrębie wypustek cytoplazma komórki zanika w miarę narastania skrętów mieliny. Doprowadza to do zetknięcia się zewnętrznych i cytoplazmatycznych powierzchni wypustek i tworzenia się zbitej osłonki mielinowej. Niewielka ilość cytoplazmy pozostaje na zewnątrz osłonki oraz w okolicy okołomezaksonalnej. Zewnętrzna pętla cytoplazmy położona jest podobnie do położenia wewnętrznego mezaksonu. Pomiędzy zremielinizowanymi międzywęzłami powstają przewężenia Ranviera. Tak więc, obserwowane przez Bunge i wsp. (1962) stadia remielinizacji odpowiadają morfologicznym stadiom dojrzwania mieliny i stanowią pierwsze dane dotyczące remielinizacji w OUN dorosłych ssaków. Przejawy remielini-

zacji w mikroskopie elektronowym obserwowano w 15 dniu doświadczenia (Bunge i wsp. 1961).

Późniejsze badania można podzielić na 3 główne grupy: modele demielinizacji pochodzenia toksycznego, immunologicznego i wirusowego.

Demielinizacja pochodzenia toksycznego

Ośrodkowy układ nerwowy

Toksyna błonicza wprowadzona dordzeniowo oraz do przestrzeni podpajęczynówkowej powoduje zwyrodnienie mieliny zarówno na obwodzie ogniska w rdzeniu kręgowym, jak i w korzeniach rdzeniowych. Prowadzone na kotach badania włókien czesanych i mikroskopowo-elektronowe wskazują, że już po 6 godzinach od podania toksyny następuje poszerzenie przewężeń Ranviera, a następnie demielinizacja w ich okolicach wyrażająca się bardzo znacznym scieńczeniem osłonki mielinowej. Niekiedy cienka osłonka mielinowa widoczna jest w kilku kolejnych międzywęźlach (Harrison i wsp. 1972c). Blaszkki mieliny są poprzerywane, wzrasta liczba wcięć, przypominających wcięcia Schmidt-Lantermanna. Czasem zmiany w mielinie u kotów i królików przypominają plaster miodu, otaczający akson (Wiśniewski, Raine 1971). Fagocytoza dokonywana przez makrofagi pojawia się po 24 godzinach, przy czym komórki żerne nie fagocytują nieuszkodzonej mieliny (Wiśniewski, Raine 1971). Środkowa część wywołanego przez toksynę błoniczą ogniska demielinizacji wykazuje również zwyrodnienie aksonalne (Harrison i wsp. 1972a).

Zatrucie cjanowodorem młodych, dorosłych szczurów powoduje, podobnie do innych środków toksycznych, demielinizację pierwotną na brzegu ogniska, a w części środkowej zwyrodnienie aksonalne. W pierwszym stadium zatrucia badanie spoidła wielkiego w mikroskopie elektronowym wykazuje ciężki obrzęk aksonów, a po 24 godzinach zaczyna się proces zwyrodnienia mieliny z udziałem gleju i makrofagów w fagocytozie oraz uprzątania uszkodzonych tkanek (Hirano i wsp. 1968).

Cuprison zastosowany w diecie osesków mysich powoduje demielinizację konarów górnych mózdzku (Blakemore 1973a,b). Wraz z początkiem demielinizacji wzrasta liczba komórek mikrogleju, których wypustki w miarę rozpadu rozwarstwionych blaszek mieliny wnikają między elementy komórkowe i aksony. Wypustki te wykazują niską gęstość optyczną, zawierają glikogen, małe fragmenty mieliny i krople tłuszczu. Po zakończeniu procesu demielinizacji liczba komórek mikrogleju zmniejsza się, zanikają ich wypustki. Prawie całkowitą demielinizację uzyskuje się po 6—8 tygodniach diety zawierającej Cuprison (Johnson, Ludwin 1981). Zarówno w jednorazowej (Blakemore 1973a), jak nawracającej demielinizacji (Johnson, Ludwin 1981; Ludwin, Johnson 1981) podkreśla się obecność cech zwyrodnienia oligodendrocytów. W nawracającej demielinizacji pierwsze zmiany w osłonce występują w wewnętrznej pętli

cytoplazmy oligodendrocytu: obrzmienie, wzrost gęstości elektronowej, obecność ciał gęstych. Demielinizacja rozpatrywana jest jako wynik procesu „dying back”, dotyczącego komórki skąpowypustkowej: zmiany zwyrodnieniowe (lub martwica) oligodendrocytu prowadzą do zmian w mielinie w postaci rozwarstwienia blaszek oraz wewnątrzosłonkowej wakuolizacji. Dezintegracja mielin z fagocytozą mikroglejową (pojawiającą się w 4 tygodniu) doprowadza do całkowitej demielinizacji w ciągu 11 tygodni. Spada aktywność mitotyczna i proliferacyjna komórek makrogleju, w tym i oligodendrocytów.

Lizolecytyna wstrzyknięta dordzeniowo kotom powoduje powstanie, podobnie do toksyny błoniczej i cjanowodoru, ognisk uszkodzenia tkanek, na obwodzie których dochodzi do pierwotnej demielinizacji, a w środkowej części do zwyrodnienia aksonalnego włókien osiowych. Proces demielinizacji jest podobny do opisanego wyżej (Blakemore i wsp. 1977; Murray, Blakemore 1980).

Remielinizacja w OUN naśladuje mielinogenezę, jest jednak powolna i niekompletna. Po upływie roku od demielinizacji pobłoniczej, obecne są liczne aksony pozbawione całkowicie osłonki lub otoczone niewspółmiernie cienką mieliną (Wiśniewski, Raine 1971; Harrison i wsp. 1972a,b; Harrison 1980).

Po zatruciu cjanowodorem proces remielinizacji jest również powolny i niekompletny, mimo że zaczyna się już po upływie 1 tygodnia. Występuje on w 3 postaciach: a) remielinizacji, naśladującej mielinogenezę; b) remielinizacji, w przebiegu której dochodzi do oddzielenia aksonu od osłonki mielinowej przez wypustkę komórki mielinizującej (nie wiadomo, czy związanej z danym aksonem) lub do utworzenia koncentrycznej, podwójnej osłonki mielinowej; c) remielinizacji z wytwarzaniem niezwyklej konfiguracji mielin w postaci tzw. „zbytecznej” osłonki mielinowej Roseblutha, mielinizacji ciała komórki nerwowej lub tworzenia się długich pojedynczych blaszek mielin, kontaktujących się z szeregiem różnych aksonów (Hirano i wsp. 1968).

Po upływie 4 tygodni od odstawienia Cuprisonu wszystkie aksony w konarze górnym mózdzku otoczone są osłonką mielinową. Jest ona jednak cienka, prawidłowa proporcja pomiędzy średnicą aksonu a grubością osłonki nie jest osiągana nawet po 6 tygodniach (Blakemore 1973b). W nawracającej demielinizacji po Cuprisonie większość włókien jest niezmielinizowana po 16 tygodniach. Remielinizacja naśladująca mielinogenezę przebiega bardzo powoli. W początkowym okresie występują, podobnie do remielinizacji po zatruciu cjanowodorem, nieprawidłowe konfiguracje mielin (Johnson, Ludwin 1981).

Po podaniu lizolecytyny zremielinizowane międzywęzła w rdzeniu kręgowym są, podobnie jak w innych modelach doświadczalnych, krótsze niż w prawidłowym włóknie (Murray, Blakemore 1980).

W procesie de- i remielinizacji toksycznej w OUN biorą udział astrocyty. Szczególnie żywa reakcja astrocytarna towarzyszy procesowi rozpadu mieliny po diecie zawierającej Cuprison. Objętość cytoplazmy astrocytów wzrasta, zmienia się rozkład chromatyny jądrowej, wzrasta liczba filamentów i ilość złogów glikogenu. Od 4 tygodnia w cytoplazmie można stwierdzić małe fragmenty mieliny. Obecne są mitozy. Cienka wypustka astrocytarna otacza początkowo całe grupy zdemielinizowanych aksonów, a następnie pojedyncze aksony (Blakemore 1973a).

Otoczanie zdemielinizowanych aksonów wypustką astrocytarną poprzedza również remielinizację po lizolecytynie, a nasilenie reakcji astrocytarnej zależy od gatunku zwierzęcia (Blakemore i wsp. 1977). Oprócz różnic między gatunkami reakcja astrocytarna zależy prawdopodobnie od stopnia uszkodzenia układów enzymatycznych komórki. Uszkodzenie układu enzymów oddechowych w zatruciu cjanowodorem utrudnia, być może, udział astrocytów, opisany po innych zatruciach. Dyskusyjne jest zagadnienie tzw. gleju reaktywnego (Bunge i wsp. 1961) w OUN. Koncepcja transformacji i powstawania przejściowych postaci komórek makrogleju (Smart, Leblond 1961) nie znajduje potwierdzenia w badaniach mikroskopowo-elektronowych (Peters i wsp. 1976). „Multipotencjalne” zaś komórki glejowe mogą stanowić ultrastrukturalny odpowiednik komórek mikrogleju (Vaughn i wsp. 1970).

W remielinizacji w OUN mogą brać również udział komórki Schwanna. Na obwodzie rdzeniowego ogniska demielinizacji po toksynie błoniczej, w okolicy wnikania do rdzenia korzeni tylnych, pojedyncze mielinizujące się włókna otaczane są w 13 dniu cytoplazmą komórki Schwanna i błoną podstawną. W późniejszym okresie periodyczność ukształtowanej zbitej osłonki mielinowej wynosi 15,6 nm, odpowiada więc mielinie korzeni rdzeniowych (Harrison i wsp. 1972b). Zawiesina komórek Schwanna, wprowadzona do rdzeniowych uszkodzeń pobłonniczych, powoduje szybką remielinizację części aksonów i powstawanie dość grubej osłonki mielinowej (Harrison 1980).

W brzeżnej części jamistych uszkodzeń przodomózgowia rozwijających się po zatruciu szczurów cjanowodorem spotyka się również komórki Schwanna, pochodzące prawdopodobnie z nerwów obwodowych, towarzyszących oponowym naczyniom krwionośnym (Hirano i wsp. 1969).

Po podaniu lizolecytyny, podobnie do opisanych wyżej modeli doświadczalnych, część włókien wykazuje obwodowy typ remielinizacji. Naświetlanie promieniami X rdzenia kręgowego przed wprowadzeniem lizolecytyny obniża aktywność remielinizacyjną zarówno oligodendrocytów, jak i komórek Schwanna (Blakemore 1977). U naświetlanych zwierząt z przeszczepem nerwu kulszowego, jako źródłem komórek Schwanna, można uzyskać remielinizację, różną jednak w zależności od gatunku zwierzęcia doświadczalnego (Blakemore 1977).

Obwodowy układ nerwowy

Toksyna błonicza w obwodowym układzie nerwowym świnki morskiej i szczura uszkadza błony komórki Schwanna, wywołując zmiany w końcowych pętłach mieliny w przewężeniach Ranviera, rozpad powierzchniowych warstw osłonki, a następnie osłonki na całej jej szerokości i mezoaksonu, przerwy w błonie aksonalnej oraz drobne uszkodzenia w aksonie. W cytoplazmie komórek Schwanna pojawiają się wodniczki. Najwcześniej obserwuje się zmiany w okolicach przewężeń, są one najcięższe i doprowadzają szybko do znacznego poszerzenia przewężenia (Webster i wsp. 1961; Allt, Cavanagh 1969). Podobne zmiany obserwuje się po zatruciu ołowiem. Powoduje ono u szczurów zwyrodnienie komórek Schwanna i demielinizację. Rozpoczyna się ona również w przewężeniach Ranviera, następnie dochodzi do rozwarstwienia osłonki w międzywęźlu i tworzenia się z oddzielonych blaszek błoniastych struktur. Makrofagi fagocytują rozpadającą się mielinę (Lampert, Schochet 1968). Oprócz odcinkowej demielinizacji obserwowano zmiany w amficytach i niektórych komórkach czuciowych zwoju rdzeniowego, a niekiedy zwyrodnienie aksonalne (Schlaepfer 1969).

Remielinizacja po toksynie błoniczej widoczna jest już po 3 tygodniach, przebiega szybko i obejmuje wszystkie uszkodzone międzywęzła (Allt 1969; Wiśniewski, Raine 1971). Uważa się, że istnieją 2 typy odtworzenia przewężenia Ranviera: 1) przy znacznym jego poszerzeniu nowa, wtrącona komórka Schwanna wytwarza nowe międzywęzła, 2) mniejsze poszerzenie przewężenia pozwala na jego rekonstrukcję przez istniejącą poprzednio, częściowo uszkodzoną komórkę Schwanna (Jacobs 1967; Allt 1969).

Remielinizacja po zatruciu ołowiem naśladuje mielinogenezę, a wyraża się wytworzeniem cienkiej, w stosunku do średnicy aksonu, osłonki. Tak zwane twory cebulkowate („onion bulbs”) świadczą o powtarzającym się zwyrodnieniu i proliferacji komórki Schwanna, czyli o powtarzającej się de- i remielinizacji (Lampert, Schochet 1968).

Działanie czynników toksycznych wywołujących demielinizację jest bardzo różnorodne. Toksyna błonicza powoduje zahamowanie aktywności transferazy adenosynodwufosforybozy, koniecznej do syntezy białka oraz blokuje szybki przepływ aksonalny (Kidman i wsp. 1978). Cjanowodór obniża aktywny transport aminokwasów oraz aktywność oksydazy cytochromowej. Lizolecytyna obniża napięcie powierzchniowe błon komórkowych i powoduje zmiany w ich strukturze, prowadzące do uszkodzenia komórki (Kent i wsp. 1974). Ołów hamuje aktywność oksydazy cytochromowej. Związek chelatujący miedź — Cuprison — powoduje prawdopodobnie (podobnie jak trójetylenek cyny) zahamowanie aktywności Na^+ , K^+ -adenozynotrójfosfatazy, a przez to aktywnego transportu błonowego (Smith, Benjamins 1977). Jak widać, większość czynników tok-

sycznych wpływa na metabolizm komórki, przy czym nie dotyczy to wyłącznie komórki mielinizującej, ale także neurocytów, astrocytów, amficytów i komórek układu naczyniowego. W OUN demielinizacja jest poprzedzona przez obrzęk.

Badania nad demielinizacją pochodzenia toksycznego wykazują więc, że różnorodne czynniki toksyczne wywołują w OUN i PUN podobne zmiany — odcinkową demielinizację. W PUN demielinizacja ta ma związek zarówno z uszkodzeniem komórki Schwanna lub jej błon, jak też często segmentu aksonu, związanego z komórką Schwanna. Możliwość metabolicznej interakcji aksonu i komórki Schwanna (Kidman i wsp. 1979) zdaje się potwierdzać istnienie współzależności strukturalnej i czynnościowej włókna nerwowego oraz jego osłonki mielinowej. Dotyczy to prawdopodobnie również OUN.

Remielinizacja po opisanych wyżej czynnikach toksycznych jest w zasadzie jednorodna. Zarówno w OUN, jak w PUN naśladuje mielinogenezę, jest jednak procesem bardziej długotrwałym, szczególnie w OUN. Powolna i niepełna remielinizacja w OUN nie zależy od czynnika wywołującego demielinizację. Doświadczenia z uciskiem rdzenia kręgowego i nerwu II wykazują, że w zremielinizowanych włóknach, po długim nawet czasie, grubość osłonki mielinowej nie wraca do normy (Clifford-Jones i wsp. 1980), a międzywęzła są krótsze niż w warunkach fizjologicznych (Gledhill i wsp. 1973). Również krótkie wtrącone międzywęzła nie są swoiste dla remielinizacji po toksycznym uszkodzeniu. Stwierdzano je u zwierząt w regeneracji nerwu obwodowego (Lubińska 1959, 1961) oraz w okresie mielinizacji rozwojowej (Fraher 1978). Nie osiągają one zwykle normalnej długości. Świadczyć to może o zmniejszonym obszarze wypustki mielinizującej komórki Schwanna (Peyronnard i wsp. 1973).

Należy jednak zaznaczyć, że krótkie i cienkie zremielinizowane międzywęzła wykazują, podobnie jak w warunkach fizjologicznych, ścisłą zależność pomiędzy objętością mieliny a powierzchnią pola aksonu, związanego z daną komórką Schwanna (Smith i wsp. 1982).

Demielinizacja pochodzenia immunologicznego

Ośrodkowy układ nerwowy

Badania nad demielinizacją pochodzenia immunologicznego przeprowadzane są najczęściej na modelu ostrego i przewlekłego doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu oraz rdzenia (EAE). Surowica zwierząt chorych na EAE powoduje zahamowanie różnicowania się oligodendrogleju, prowadzi więc do upośledzenia lub braku mielinizacji w hodowli płodowego rdzenia kręgowego myszy (Bornstein, Raine 1970). Stwierdza się również zanik oligodendrocytów oraz wzrost glejazy włóknistej. Po krótkotrwałym działaniu surowicy remielinizacja występuje

po 1—2 tygodniach. Po przewlekłym działaniu surowicy EAE do remielinizacji nie dochodzi (Raine, Bornstein 1970).

Najwcześniejsze zmiany w EAE u szczurów to wzmożona przepuszczalność ścian drobnych naczyń żylnych dla białek osocza oraz komórek jednojądrzastych (Lampert, Carpenter 1965). Inwazja tych komórek, wykazujących powinowactwo do zmielinizowanych aksonów i oligodendrogleju, poprzedza demielinizację. Komórki jednojądrzaste wnikają w okolice przewężenia Ranviera, pod osłonkę lub pomiędzy blaszki mieliny, rozwarstwiając je. Blaszki te ulegają następnie fagocytozie. W obrębie strefy nacieku komórkowego obserwuje się również ogniskowe rozrzedzenie lub pęcherzykowaty rozpad mieliny (Lampert 1965). Podobne zmiany spotyka się u królików (Wiśniewski 1977) i świnek morskich (Wiśniewski, Keith 1977), uczulonych zasadowym białkiem mieliny lub istotą białą z adjuwantem Freund'a. Pojawiają się okołożylne nacieki złożone z komórek jednojądrzastych. Kontakt tych komórek z osłonką mielinową oraz wnikanie ich wypustek pomiędzy blaszki mieliny powoduje rozwarstwienie osłonki. Drugim rodzajem rozpadu mieliny jest rozpad pęcherzykowaty. Oba te procesy, w obszarze nacieku, przesuwają się wzdłuż aksonu pozbawiając go mieliny, która fagocytowana jest przez makrofagi. Niekiedy obserwuje się również zwyrodnienie aksonalne.

Uczulenie świnek morskich i królików swoistym antygenem z adjuwantem Freund'a pozwala również na wywołanie przewlekłego EAE (Prineas i wsp. 1969; Snyder i wsp. 1975) oraz EAE przewlekłego przebiegającego ze zwolnieniami (Snyder i wsp. 1975; Wiśniewski, Keith 1977). W rdzeniu kręgowym uzyskuje się zmiany ostre, analogiczne do wyżej opisanych, oraz zmiany przewlekłe, charakteryzujące się brakiem cech zapalnych w starych blaszkach, niekiedy z aktywną demielinizacją na ich obwodzie. Demyelinizacja ma charakter odcinkowy (Wiśniewski, Keith 1977). Odcinkowy charakter demielinizacji ma miejsce również w nerwie wzrokowym królika (Wiśniewski, Bloom 1975a), niezależnie od tego, czy demielinizacja wywołana została swoistym, czy nieswoistym antygenem. Uważa się więc, że każdy antygen, wywołujący komórkową reakcję immunologiczną, może powodować odcinkową demielinizację (Wiśniewski, Bloom 1975a). W oparciu o badania na świnkach morskich przyjmuje się również, że komórkowa reakcja immunologiczna na różne antygeny może być częściowo odpowiedzialna za demielinizację oraz może stanowić model do badań chorób demielinizacyjnych pochodzenia immunologicznego (Wiśniewski, Bloom 1975a).

Zarówno w ostrym, jak i w przewlekłym doświadczeniu ma miejsce remielinizacja, naśladująca mielinogenezę w OUN, przy czym, podobnie jak w mielinogenezie, jedna komórka oligodendrogleju związana jest z wieloma aksonami (Lampert 1965).

W świeżych ogniskach demielinizacyjnych wypustki astrocytów otaczają pęczki zdmielinizowanych aksonów (Snyder i wsp. 1975). Remielinizacja jest długotrwała i niepełna, liczne są aksony otoczone zbyt cienką, w stosunku do średnicy włókna, osłonką mielinową; wiele aksonów pozostaje zdmielinizowanych nawet po 10 miesiącach (Prineas i wsp. 1969). W obszarach demielinizacji, zlokalizowanych w okolicach wnikania do rdzenia korzeni rdzeniowych, w remielinizacji mogą uczestniczyć komórki Schwanna (Snyder i wsp. 1975).

Obwodowy układ nerwowy

W obwodowym układzie nerwowym doświadczalną demielinizację pochodzenia immunologicznego wywołuje się przez śródskórne wstrzyknięcie zawiesiny nerwu obwodowego (Äström i wsp. 1968; Ballin, Thomas 1969a) lub istoty białej mózgu (Schröder, Krücke 1970) z adjuwantem Freund'a. Uzyskuje się w ten sposób doświadczalne alergiczne zapalenie nerwów obwodowych (EAN). W doświadczalnym zapaleniu mózgu i rdzenia (EAE) dochodzi do demielinizacji również w obwodowym układzie nerwowym (Raine i wsp. 1969; Wiśniewski i wsp. 1969; Raine i wsp. 1971). Najwcześniejsze zmiany w EAN w nerwie kulszowym szczura to ogniskowe uszkodzenie wewnętrznej powierzchni ściany żyłek przez krążące w łożysku naczyniowym limfocyty. Limfocyt przybiera wygląd „ręcznego lusterka”, następnie spłaszcza się na powierzchni śródbłonna oraz przenika przez jego cytoplazmę, bez uszkodzenia błony komórkowej obu komórek. Limfocyty ulegają transformacji i dzielą się zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrznaczyniowo. Migrujące limfocyty stają się w przestrzeni okołonaczyniowej większe i różnokształtne. Niekiedy wokół naczyń stwierdza się, podobnie jak w OUN, płyn zawierający białko. Zmiany te poprzedzają demielinizację i obserwuje się je do 15 dnia doświadczenia (Äström i wsp. 1968). Podobne, zainicjowane przez komórki jednojądrzaste, zmiany obserwuje się w EAN u świnek morskich (Ballin, Thomas 1969a) i królików (Schröder, Krücke 1970). Naciek zapalny w endoneurium tworzą głównie limfocyty i monocyty. Demielinizacja występuje u tych zwierząt w ścisłym związku z komórkami jednojądrzastymi. Zwykle zaczyna się w przewężeniu Ranviera (Ballin, Thomas 1969a), w obrębie którego końcowe skręty mieliny oddzielają się od aksonu i tworzą się owoidy lub pęcherzyki ulegające fagocytozie makrofagowej. Zmiany mogą obejmować całe międzywęzła. Badania włókien czesanych wykazują jednak, że demielinizacja może zaczynać się w każdym miejscu międzywęzła (Wiśniewski 1977). Zwyródnienie aksonalne spotyka się sporadycznie w badaniach mikroskopowo-elektronowych (Ballin, Thomas 1969a; Schröder, Krücke 1970), natomiast badania włókien czesanych wskazują na jego równoległość z pierwotną demielinizacją (Wiśniewski 1977).

W ostrym doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (EAE), podobnie do doświadczalnego zapalenia nerwów (EAN), demielinizacja korzeni rdzeniowych następuje w obecności różnokształtnych komórek jednojądrzastych i makrofagów. Komórki te przenikają niekiedy przez cytoplazmę komórki Schwanna i błonę podstawną. Uszkodzenie mieliny występuje w miejscu kontaktu z inwazyjną komórką albo w postaci ogniskowego rozrzedzenia powierzchniowych blaszek albo w postaci zmian pęcherzykowatych, ulegających następnie fagocytozie (Wiśniewski i wsp. 1969). W obrazach mikroskopowo-elektronowych stwierdza się również obkurczenie mieliny przy przewężeniu Ranviera oraz jego poszerzenie. Komórki jednojądrzaste (makrofagi) atakują mezakson, oddzielając zewnętrzne blaszki osłonki. Rozwarstwienie przebiega wzdłuż grubej linii optycznej (Arnason 1975). Dochodzi więc do immunologicznej fagocytozy mieliny. Dane te odpowiadają opóźnionej reakcji nadwrażliwości komórkowej (Wiśniewski i wsp. 1969). Komórka Schwanna nie wykazuje wyraźnych zmian i nie ulega fagocytozie (Wiśniewski 1977).

W przewlekłym doświadczalnym zapaleniu mózgu i rdzenia aktywna demielinizacja korzeni przednich, dokonywana przez fagocytyjące komórki jednojądrzaste, kończy się w ciągu 3 tygodni od wystąpienia klinicznych objawów choroby; w tym okresie obserwuje się ogniskowe rozwarstwienia i poszerzenie całej osłonki, przypominające jej obrzmienie. Zwyródnienie aksonalne występuje rzadko, ale średnica aksonów zdemielinizowanych ulega zmniejszeniu (Raine i wsp. 1969). Redukcja ta ma charakter segmentarny (Raine i wsp. 1971). W przewlekłym doświadczeniu z klinicznymi nawrotami choroby (niejasnego zresztą pochodzenia wobec jednorazowego uodpornienia) obserwuje się 3 rodzaje uszkodzeń: 1) świeże — aktywne, z naciekami komórek jednojądrzastych zlokalizowanych okołonaczyniowo i wzdłuż międzywęzli; 2) stare (najczęstsze), z włóknami ulegającymi remielinizacji oraz 3) mieszane, z cechami aktywnej demielinizacji i remielinizacji (Raine i wsp. 1971).

Remielinizacja korzeni rdzeniowych i nerwów obwodowych w EAN oraz EAE rozpoczyna się wcześnie, w 3—4 tygodniu po uodpornieniu, i obejmuje prawie wszystkie (a w każdym razie bardzo liczne) włókna. Przejawia się zmniejszoną średnicą aksonu oraz cienką w stosunku do jego średnicy osłonką (Ballin, Thomas 1969; Prineas i wsp. 1969; Raine i wsp. 1971). Połowę fizjologicznej grubości osłonka mielinowa osiąga w ciągu 10 miesięcy (Raine i wsp. 1969). Podobnie do procesu remielinizacji w OUN, remielinizacja w PUN naśladuje w zasadzie mielino-genezę, jest ona jednak znacznie szybsza i pełniejsza. W przebiegu remielinizacji obserwowano w EAN nadmierną proliferację komórek Schwanna i prawdopodobnie związane z tym nieprawidłowości w postaci mielinizacji ciała komórki Schwanna, związanej ze zmielinizowanym już aksonem lub też np. mielinizacji kompleksu: komórka Schwanna — nie-

zmielinizowany akson. Może to wskazywać na dużą aktywność komórek Schwanna „poszukujących” aksonu do mielinizacji (Ballin, Thomas 1969b). Obserwuje się również twory o charakterze „onion bulbs” (Schröder, Krücke 1970).

Demielinizacja pochodzenia wirusowego

Ośrodkowy układ nerwowy

Wyniki badań na modelach doświadczalnych i dane pochodzące z naturalnych modeli zwierzęcych wskazują na możliwość pierwotnej demielinizacji OUN w przebiegu zakażeń wirusowych. Trwałe zakażenie, przebieg z rzutami i zwolnieniami, zmiany zapalno-demielinizacyjne oraz przejawy ostrej i przewlekłej demielinizacji występują w przebiegu nosówki prostej, zapalenia wątroby myszy, visny oraz zapalenia mózgu i rdzenia Theilera u myszy (Martin, Nathanson 1979). Dwa zasadnicze mechanizmy mogą odpowiadać za powstanie demielinizacji: 1) bezpośrednie cytotatyczne działanie wirusa na oligodendroglę; 2) reakcja immunologiczna gospodarza na wirus lub antygeny OUN. Prawdopodobnie w większości zakażeń odgrywają rolę oba te mechanizmy (Dal Canto, Rabinowitz 1982). Cztery mechanizmy immunologiczne mogą doprowadzić do demielinizacji pochodzenia wirusowego: 1) cytoliza zakażonych oligodendrocytów — odpowiedź immunologiczna sprowadza się do neutralizacji uwolnionego wirusa; 2) swoiste wirusowe antygeny wbudowane w błonę komórkową zakażonych komórek wywołują atak immunologiczny, skierowany przeciw tym antygenom, co doprowadza do śmierci komórki; 3) mielina może występować w charakterze „widza” — zostaje ona uszkodzona niejako „przy okazji”, w przebiegu nieswoistej reakcji immunologicznej, skierowanej przeciwko nie związanym z mielina antygenom; 4) w początkowym okresie infekcji wirusowej mogą być uwolnione antygeny mieliny, wywołujące odpowiedź autoimmunologiczną (Martin, Nathanson 1979). Każdy z tych mechanizmów może brać udział we wszystkich modelach doświadczalnych.

Obwodowy układ nerwowy

W obwodowym układzie nerwowym zwierząt zapalenia wielonerwowe z demielinizacją są wywoływane przez liczne wirusy z grupy RNA i bakterie, np. przy okazji szczepień (Arnason 1975). Niektóre wirusy, jak np. wirus opryszczki zwykłej, powodują demielinizację aksonów zarówno obwodowego, jak i ośrodkowego układu nerwowego (Kristensson i wsp. 1982). W przebiegu wyżej wymienionych zakażeń dochodzi do odcinkowej demielinizacji, a następnie remielinizacji. Komórki Schwanna, podobnie jak to ma miejsce w remielinizacji w przebiegu innych chorób

w PUN, proliferują wzdłuż obnażonego aksonu, który następnie remielinizują, wytwarzając nowe, krótsze niż poprzednie, międzywęzła i cieńszą osłonkę mielinową (Arnason 1975).

CHOROBY DEMIELINIZACYJNE U CZŁOWIEKA

Kliniczny przebieg EAE, zwłaszcza z możliwością nawrotów choroby, rozsiane w OUN i PUN obszary demielinizacji z naciekiem komórek jednojądrzastych w świeżych ogniskach oraz występowanie ognisk demielinizacyjnych w różnym czasie upodabniają ten model doświadczalny do stwardnienia rozsianego (SM) i poszczepiennego (np. po szczepieniu przeciw wścieklicznie) zapalenia mózgu i rdzenia (Raine i wsp. 1971). Badania ultrastrukturalne ognisk demielinizacji w SM wykazują rozwarstwienie lub oddzielenie blaszek mieliny, produkty rozpadu mieliny w makrofagach i astrocytach, zmiany zwyrodnieniowe niektórych aksonów i obszary zdemielinizowanych aksonów, pomiędzy którymi widoczne są wypustki astrocytów włóknistych (Perier, Gregoire 1965; Prineas i wsp. 1969). W biopsjach mózgowych u chorych z SM, poza obszarami zdemielinizowanymi, stwierdza się liczne fagocyty i drobne zmiany zwyrodnieniowe w mielinie (Suzuki i wsp. 1969). W materiale sekcyjnym, w rdzeniowych blaszkach demielinizacyjnych, obserwuje się remielinizację przez komórki Schwanna, zidentyfikowaną w badaniu mikroskopowo-elektronowym (Ghatak i wsp. 1973). Możliwe, że zwieżność i cofanie się niedowładów obwodowych nerwu VII w przebiegu SM (Hausmanowa 1952) związane jest z udziałem komórek Schwanna w remielinizacji brzeżnej części mostu. Mimo pewnych różnic w obrazie morfologicznym EAE i SM (między innymi wyraźne zmiany patologiczne w komórkach makrogleju w SM — Suzuki i wsp. 1969), uważa się, że mechanizm uszkodzenia mieliny jest podobny w obu tych procesach (Wiśniewski 1977).

W obwodowym układzie nerwowym pewną analogię do EAN i EAE stanowi u człowieka zespół zapalenia wielonerwowego Guillain-Barré-Strohla (G-B-S) lub tzw. idiopatycznego zapalenia wielonerwowego. Wspólną cechą morfologiczną, w dość dużym materiale klinicznym, stanowi demielinizacyjne zapalenie nerwów obwodowych z okołonaczyniowymi naciekami limfocytarnymi na każdym poziomie PUN, przy czym nacieki współistnieją lub poprzedzają kliniczny początek choroby (Asbury i wsp. 1969). Podobnie jak w modelach doświadczalnych, odcinkowa demielinizacja związana jest z inwazją komórek jednojądrzastych. W ich obecności dochodzi do siatkowatych lub pęcherzykowatych zmian w mielinie, fagocytowanej następnie przez makrofagi. Akson wykazuje zmiany niewielkie. Zespół objawów odpowiada więc pierwotnej chorobie demielinizacyjnej (Wiśniewski i wsp. 1969). Warto podkreślić, że zespół G-B-S poprzedzają często różne infekcje wirusowe lub bakteryjne, zabiegi chirurgiczne itd. Wskazuje to na możliwość infekcji jako

czynnika etiologicznego. Podobnie więc do EAN, zespół G-B-S jest przejawem opóźnionej nadwrażliwości komórkowej swoiście uczulonych limfocytów (Asbury i wsp. 1969).

Podobne do wyżej opisanych, zmiany morfologiczne (poza zwyrodnieniem pęcherzykowatym) stwierdzono w nawracającym idiopatycznym zapaleniu wielonerwowym (Prineas 1971; Prineas, McLeod 1976). Odcinkowej aktywnej demielinizacji towarzyszy również redukcja średnicy aksonów. Remielinizujące się włókna wykazują cienką osłonkę mielinową, częste są twory o charakterze „onion bulbs”. Nasuwająca skojarzenie ze stwardnieniem rozsianym (Prineas 1971), powtarzająca się de- i remielinizacja powoduje odsuwanie na zewnątrz komórki Schwanna (której mielina została zniszczona) oraz błony podstawnej tej komórki. Odsuwanie to następuje w związku z podziałem komórki Schwanna, otaczającej zdemielinizowane międzywęzle przed remielinizacją (Dyck 1975). Im więcej epizodów de- i remielinizacji (niezależnie od przyczyny), tym więcej jest warstw koncentrycznie ułożonych komórek Schwanna i błony podstawnej. Struktury typu „onion bulbs” nie stanowią o swoistości procesu chorobowego, a jedynie o powtarzającej się de- i remielinizacji. W nerwach czaszkowych i w OUN zmiany te są niezmiernie rzadkie. Tak zlokalizowane nieprawidłowości stwierdzano u zmarłych, u których neuropatia przerostowa współistniała ze stwardnieniem rozsianym (Schoen e i wsp. 1977).

Ostre rozsiane zapalenie mózgu i rdzenia, SM, niektóre zapalenia poszczepienne, zespół Guillain-Barré-Strohla oraz zapalenie wielonerwowe z nawrotami wykazują szereg cech klinicznych i morfologicznych, podobnych do stwierdzanych w demielinizacyjnych modelach doświadczalnych. Istnieją również podobieństwa w przebiegu i morfologii chorób demielinizacyjnych człowieka w ośrodkowym oraz obwodowym układzie nerwowym. Jednak niejasna etiologia tych chorób oraz niemożność — na obecnym etapie wiedzy — wyjaśnienia ich patogenezы (*vide*: 4 mechanizmy immunologiczne) każą odnosić się z rezerwą do „zaszufladkowywania” demielinizacji do określonych patomechanizmów immunologicznych.

Powtarzające się w bardzo różnych procesach w OUN i PUN zmiany w mielinie w postaci rozwarstwienia oraz siatkowatego lub pęcherzykowatego zwyrodnienia wskazują na możliwość jej nieswoistego uszkodzenia w przebiegu reakcji immunologicznej nie skierowanej przeciwko mielinie. W badaniach *in vitro* okazało się, że swoiście aktywne makrofagi wydzielają przy udziale plazminogenu proteazy zasadowe, powodujące uszkodzenie mieliny. Możliwe, że pęcherzykowate zwyrodnienie mieliny jest morfologicznym przejawem tego procesu (Dal Canto, Rabinowitz 1982). Mielina, podobnie jak inne tkanki, ma ograniczone możliwości reakcji na działanie czynników chorobotwórczych. Różne więc czynniki uszkadzające mogą wywoływać podobne lub takie same zmiany morfologiczne.

Dotychczasowy stan badań nad de- i remielinizacją pozwala na wysunięcie następujących wniosków:

1. Zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym proces demielinizacyjny zaczyna się zwykle od przewężeń Ranviera, stopniowo obejmuje międzywęźle i doprowadza do odcinkowej demielinizacji aksonu.
2. Wyrodnijająca mielina ulega fagocytozie.
3. Komórki jednojądrzaste zapoczątkowują proces demielinizacji jedynie w przebiegu reakcji immunologicznej.
4. Zdemielinizowany akson wykazuje niewielkie zmiany; zwykle ulega zmniejszeniu średnica zdemielinizowanego odcinka.
5. Wydolność komórek mielinizujących — oligodendrocytów i komórek Schwanna — zapewnia odnowę mieliny.
6. Morfologiczny obraz remielinizacji odpowiada procesowi dojrzewania mieliny.
7. Zremielinizowane międzywęźla są krótsze, a osłonka mielinowa przez długi czas nie osiąga grubości fizjologicznej w stosunku do średnicy włókna nerwowego.
8. Proces remielinizacji w ośrodkowym układzie nerwowym jest znacznie wolniejszy i ograniczony w porównaniu z tym procesem w obwodowym układzie nerwowym.
9. Niepełna i powolna remielinizacja w OUN ma prawdopodobnie związek z następującymi czynnikami: a) w przeciwieństwie do komórki Schwanna oligodendrocyt mielinizuje szereg odcinków włókna nerwowego lub szereg aksonów; b) wypustki komórek gwiaździstych otaczają w OUN zdemielinizowane aksony; c) oligodendrocyty są prawdopodobnie mniej aktywne i mają mniejszą zdolność proliferacyjną niż komórki Schwanna.
10. Komórki Schwanna mogą wspomagać remielinizację w ośrodkowym układzie nerwowym zwłaszcza w rdzeniu kręgowym. Ich źródłem są zwykle korzenie rdzeniowe.
11. Proces demielinizacji i remielinizacji przebiega podobnie u różnych gatunków ssaków i u człowieka, mimo istnienia różnic międzygatunkowych.

СОЗРЕВАНИЕ МИЕЛИНА, ДЕМИЕЛИНИЗАЦИЯ И РЕМИЕЛИНИЗАЦИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ И ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Резюме

На основании данных по литературе описан процесс миелиногенеза, демиелинизации и ремиелинизации у человека и животных. Рассмотрена экспериментальная демиелинизация токсического, иммунологического и вирусного происхождения, а также некоторые демиелинизационные заболевания человека.

MYELINATION, DEMYELINATION AND REMYELINATION IN THE CENTRAL AND PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM

Summary

Review of current data concerning myelination, demyelination and remyelination in the human and animal central and peripheral nervous system is presented. Experimental models of demyelination, including those of toxic, immunological and viral origin and selected human demyelinating diseases are discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Allt G.: Repair of segmental demyelination in peripheral nerves. Electron microscopic study. *Brain*, 1969, 92, 639—646.
2. Allt G., Cavanagh J. B.: Ultrastructural changes in the region of the node of Ranvier in the rat caused by diphtheria toxin. *Brain*, 1969, 92, 459—468.
3. Arnason B. G. W.: Inflammatory polyradiculoneuropathies. W: *Peripheral neuropathy*. Red. P. J. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert. W. B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto 1975, II, 1110—1148.
4. Asbury A. K.: Schwann cell proliferation in developing mouse sciatic nerve. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 735—743.
5. Asbury A. K., Arnason B. G., Adams R. D.: The inflammatory lesion in X idiopathic polyneuritis. Its role in pathogenesis. *Medicine*, 1969, 48, 173—215.
6. Åström K. E., Webster H. de F., Arnason B. G.: The initial lesion in experimental allergic neuritis. A. Phase and electron microscopic study. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 469—496.
7. Ballin R. H. M., Thomas P. K.: Electron microscope observation on demyelination and remyelination in experimental allergic neuritis. Part 1. Demyelination. *J. Neurol. Sci.*, 1969a, 8, 1—18.
8. Ballin R. H. M., Thomas P. K.: Electron microscope observation on demyelination and remyelination in experimental allergic neuritis. Part 2. Remyelination. *J. Neurol. Sci.*, 1969b, 8, 225—237.
9. Blakemore W. F.: Demyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse induced by cuprisone. *J. Neurol. Sci.*, 1973a, 20, 63—72.
10. Blakemore W. F.: Remyelination of the superior cerebellar peduncle in the mouse following demyelination induced by feeding cuprisone. *J. Neurol. Sci.*, 1973b, 20, 73—83.
11. Blakemore W. F.: Remyelination of CNS axons by Schwann cells transplanted from the sciatic nerve. *Nature (London)* 1977, 266, 68—69.
12. Blakemore W. F., Eames R. A., Smith K. J., McDonald W. J.: Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lyssolecithin. *J. Neurol. Sci.*, 1977, 33, 31—43.
13. Bornstein M. B., Raine C. S.: Experimental allergic encephalomyelitis: antiserum inhibition of myelination *in vitro*. *Lab. Invest.*, 1970, 23, 536—539.
14. Bunge M. B., Bunge R. P., Ris H.: Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult spinal cord. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1961, 10, 67—94.
15. Bunge R. P., Bunge M. B., Ris H.: Electron microscopic observations on normal demyelinating and remyelinating white matter W: IV Intern. Congress of Neuropathology, Proceedings, Red. H. Jacobs, Thieme, Stuttgart 1962, 136—142.

16. Clifford-Jones R. E., Landon D. N., McDonald W. I.: Remyelination during optic nerve compression. *J. Neurol. Sci.*, 1980, 46, 239—243.
17. Cravioto H.: The role of Schwann cells in the development of human peripheral nerves. An electron microscopic study. *J. Ultrastruct. Res.*, 1965, 12, 634—651.
18. Dal Canto M. C., Rabinowitz S. C.: Experimental models of virus-induced demyelination of the central nervous system. *Ann. Neurol.*, 1982, 11, 109—127.
19. Dekaban A.: Neurology of infancy. Williams, Wilkins, Baltimore 1959.
20. Dyck P. I.: Pathologic alterations of the peripheral nervous system of man. W: Peripheral neuropathy. Red. P. I. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert. Saunders, Philadelphia, London, Toronto 1975, I, 296—336.
21. Fraher J. P.: A quantitative study of anterior root fibres during early myelination. *J. Anat. (Lond.)*, 1972, 112, 99—123.
22. Fraher J. P.: Quantitative studies on the maturation of central and peripheral parts of individual ventral motoneuron axons. II. Internodal length. *J. Anat. (Lond.)*, 1978, 127, 1—15.
23. Friede R. A.: A histochemical study of DNP-diaphorase in human white matter, with some notes on myelination. *J. Neurochem.*, 1961, 8, 17—30.
24. Friede R. L., Meier T., Diem M.: How is the exact length of an internode determined? *J. Neurol. Sci.*, 1981, 50, 217—228.
25. Friede R. L., Samorajski T.: Relation between the number of myelin lamellae and axon circumference in fibers of vagus and sciatic nerves of mice. *J. comp. Neurol.*, 1967, 130, 223—232.
26. Friede R. L., Samorajski T.: Myelin formation in the sciatic nerve of rat. A quantitative electron microscopic histochemical and radioautographic study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 546—570.
27. Gamble H.: Further electron microscope studies of human fetal peripheral nerves. *J. Anat.*, 1966, 100, 487—502.
28. Gamble H. J., Fenton J., Allsopp G.: Electron microscope observation on the changing relationships between unmyelinated axons and Schwann cells in human nerves. *J. Anat. (Lond.)*, 1978, 127, 363—378.
29. Ghatak N. R., Hirano A., Doron Y., Zimmerman M.: Remyelination in multiple sclerosis with peripheral type myelin. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 262—267.
30. Gledhill R. F., Harrison B. M., McDonald W. J.: The pattern of remyelination in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 20, 73—83.
31. Harrison B. M.: Remyelination by cells introduced into a stable demyelinating lesion in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.*, 1980, 46, 63—81.
32. Harrison B. M., McDonald W. J., Ochoa J.: Central demyelination produced by diphtheria toxin: an electron microscopic study. *J. Neurol. Sci.*, 1972a, 17, 281—291.
33. Harrison B. M., McDonald W. J., Ochoa J.: Remyelination in the central diphtheria lesion. *J. Neurol. Sci.*, 1972b, 17, 293—302.
34. Harrison B. M., McDonald W. J., Ochoa J., Ohlrich G. D.: Paranodal demyelination in the central nervous system. *J. Neurol. Sci.*, 1972c, 16, 489—494.
35. Hausmanowa I.: Porażenie obwodowe w przebiegu stwardnienia wieloogniskowego. *Neurol. Pol.*, 1949, 23, 3—14.
36. Hildebrand C., Hahn R.: Relation between myelin sheath thickness and axon size in spinal cord white matter of some vertebrate species. *J. Neurol. Sci.*, 1978, 38, 421—434.
37. Hirano A., Dembitzer M.: A structural analysis of the myelin sheath in the central nervous system. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 555—567.
38. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Remyelination in the central ner-

- vous system after cyanide intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 234—245.
39. Hirano A., Zimmerman H. M., Levine S.: Electron microscope observations of peripheral myelin in a central nervous system lesion. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1969, 12, 348—365.
 40. Jacobs J. M.: Experimental diphtheritic neuropathy in the rat. *Brit. J. Exp. Path.*, 1967, 48, 204—216.
 41. Johnson E. S., Ludwin S. K.: The demonstration of recurrent demyelination and remyelination of axons in the central nervous system. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981, 53, 93—98.
 42. Kent C., Schimmel S. D., Vagelos P. R.: Lipid composition of plasma membranes from developing chick muscle cells culture. *Bioch. Biophys. Acta*, 1974, 360, 312—321.
 43. Kidman A. D., Dolan L., Sippe H. J.: Blockade of fast axonal transport by diphtheritic demyelination in the chicken sciatic nerve. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 57—61.
 44. Kidman A. D., Hanvell M., Cooper N.: Failure of diphtheritic demyelination to block slow axonal transport in the chicken sciatic nerve. *J. Neurochem.*, 1979, 33, 357—359.
 45. Kristenson K., Svennerholm B., Vahlne A., Nilheden E., Person L., Lycke E.: Virus-induced demyelination in herpes simplex virus-infected mice. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 205—216.
 46. Lampert P. W.: Demyelination and remyelination in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1965, 24, 271—385.
 47. Lampert P. W., Carpenter S.: Electron microscopic studies on the vascular permeability and the mechanism of demyelination in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1965, 24, 11—24.
 48. Lampert P. W., Schochet S. S.: Demyelination and remyelination in lead neuropathy. Electron microscopic studies. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 527—545.
 49. Lubińska L.: Region of transition between preserved and regenerating parts of myelinated nerve fibers. *J. comp. Neurol.*, 1959, 113, 315—336.
 50. Lubińska L.: Demyelination and remyelination in the proximal parts of regenerating nerve fibers. *J. comp. Neurol.*, 1961, 117, 275—289.
 51. Ludwin S. K., Johnson E. S.: Evidence for a “dying back” gliopathy in demyelinating disease. *Ann. Neurol.*, 1981, 9, 301—305.
 52. Maślińska J.: Quantitative study of glial elements in the white matter of the human spinal cord during ontogenetic development. *Folia Morphol.*, 1974, 12, 400—402.
 53. Martin J. R., Nathanson N.: Animal models of virus-induced demyelination. W: *Progress in Neuropathology*. Red. H. M. Zimmerman. Raven Press, New York 1979, 4, 27—50.
 54. Martin J. R., Webster H. de F.: Mitotic Schwann cells in developing nerve: their changes in shape, fine structure and relationships. *Dev. Biol.*, 1973, 32, 417—431.
 55. Mathews M. A.: An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anat. Rec.*, 1968, 161, 337—351.
 56. Murray J. A., Blakemore W. F.: The relationship between internodal length and fibre diameter in the spinal cord of the cat. *J. Neurol. Sci.*, 1980, 45, 29—41.
 57. Niebrój-Dobosz I., Fidziańska A., Rafałowska J., Sawicka E.: Correlative bio-

- chemical and morphological studies of myelination in human ontogenesis. I. Myelination of the spinal cord. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1980a, 49, 145—152.
58. Niebrój-Dobosz I., Fidziańska A., Rafałowska J., Sawicka E.: Correlative biochemical and morphological studies of myelination in human ontogenesis. II. Myelination of the nerve roots. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1980b, 49, 153—158.
 59. Ochoa J.: The sural nerve of the human foetus: electron microscope observations and counts of axons. *J. Anat.*, 1971, 108, 231—245.
 60. Perier O., Gregoire A.: Electron microscopic features of multiple sclerosis lesion. *Brain*, 1965, 88, 937—952.
 61. Peters A.: The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 8, 431—446.
 62. Peters A.: Myelination in the central nervous system. W: IV Intern. Congress of Neuropathology, Proceedings. Red. H. Jacobs, Thieme, Stuttgart 1962, II, 50—54.
 63. Peters A., Muir A. R.: The relationship between axons and Schwann cells during development of peripheral nerves in the rat. *Q. J. exp. Physiol.*, 1958, 44, 117—130.
 64. Peters A., Palay S., Webster H. de F.: Neuroglial cells mediate between astrocytes and oligodendrocytes. In: *The fine structure of the nervous system*. Red. Peters A., Palay S., Webster H. de F., Saunders, Philadelphia, London, Toronto 1976, 254.
 65. Peters A., Vaughn I.: Morphology and development of the myelin sheath. In: *Myelination*. Red. Davison A., Peters A., Thomas Ch. C. Springfield, Illinois, USA, 1970.
 66. Peterson E. R., Murray M. R.: Myelin sheath formation in cultures of avian spinal ganglia. *Am. J. Anat.*, 1955, 96, 319—356.
 67. Peyronnard J. M., Aquayo A. J., Bray S. M.: Schwann cell internuclear distances in normal and regenerating unmyelinated nerve fibres. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 56—59.
 68. Prineas J. W.: Demyelination and remyelination in recurrent idiopathic polyneuropathy. An electron microscopic study. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1971, 18, 34—57.
 69. Prineas J. W., McLeod J. G.: Chronic relapsing polyneuritis. *J. Neurol. Sci.*, 1976, 27, 427—458.
 70. Prineas J., Raine C. S., Wiśniewski H.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. III. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the central nervous system. *Lab. Invest.*, 1969, 21, 472—483.
 71. Rafałowska J.: Some problems of the development and aging of nervous system. I. Spinal cord in the 2nd half of fetal life and early infancy. *Neuropatol. Pol.*, 1979, 17, 39—53.
 72. Raine C. S.: Morphological aspects of myelin and myelination. W: *Myelin*. Red. P. Morell. Plenum Press, New York, London 1977, 1—50.
 73. Raine C. S., Bornstein M. B.: Experimental allergic encephalomyelitis: a light and electron microscope study of remyelination and "sclerosis" in vitro. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1970, 29, 552—574.
 74. Raine C. S., Wiśniewski H., Prineas J.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. II. Chronic experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system. *Lab. Invest.*, 1969, 21, 316—327.
 75. Raine C. S., Wiśniewski H., Dowling P. C., Cook S. D.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. IV. Recurrent episodes

- and peripheral nervous system plaque formation in experimental allergic encephalomyelitis. *Lab. Invest.*, 1971, 25, 28—34.
76. Rexed B.: Contributions to the knowledge of the postnatal development of the peripheral nervous system in man. *Acta Psychiat. (Kbh)* 1944, supp. 33.
 77. Samorajski T., Friede R. L.: A quantitative electron microscopic study of myelination in the pyramidal tract of rats. *J. comp. Neurol.*, 1968, 134, 323—338.
 78. Schlaepfer W. W.: Experimental lead neuropathy: a disease of the supporting cells in the peripheral nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1969, 28, 401—418.
 79. Schoene W. C., Carpenter C., Behan P. O., Geschwind N.: "Onion bulb" formation in the central and peripheral nervous system in association with multiple sclerosis and hypertrophic polyneuropathy. *Brain*, 1977, 100, 755—773.
 80. Schonbach J., Hu K. W., Friede R. L.: Cellular and chemical changes during myelination: histologic, autoradiographic, histochemical and biochemical data on myelination in the pyramidal tract and corpus callosum. *J. comp. Neurol.*, 1968, 134, 21—37.
 81. Schröder J. M., Krücke M.: Zur Feinstruktur der experimentellallergischen Neuritis beim Kaninchen. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1970, 14, 261—283.
 82. Smart J., Leblond C. F.: Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from radioautography after injections of thymidine — H^3 . *J. comp. Neurol.*, 1961, 116, 349—367.
 83. Smith M. E., Benjamins J. A.: Model system for study of perturbations of myelin metabolism. In: *Myelin*, Red. P. Morell. Plenum Press, New York, London 1977, 447—488.
 84. Smith K. J., Blakemore W. F., Murray J. A., Patterson R. C.: The relationship between internodal myelin volume and axon surface area in normal, remyelinated and regenerated nerve fibres. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1982, 8, 239.
 85. Snyder D. H., Valsanis M. P., Stone S. H., Raine C. S.: Progressive demyelination and reparative phenomena in chronic experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1975, 34, 209—221.
 86. Suzuki K., Andrews J. M., Waltz J. M., Terry R. M.: Ultrastructural studies of multiple sclerosis. *Lab. Invest.*, 1969, 20, 444—454.
 87. Svennerholm L., Vanier M. T.: The distribution of lipids in the human nervous system. II. Lipid composition of human foetal and infant brain. *Brain Res.*, 1972, 47, 457—468.
 88. Webster H. de F., Martin J. R., O'Connell M. F.: The relationship between interphase Schwann cells and axons before myelination: a quantitative electron microscopic study. *Dev. Biol.*, 1973, 32, 401—416.
 89. Webster H. de F., Spiro D., Waksman B., Adams R. D.: Phase and electron microscopic studies of experimental demyelination. II. Schwann cell changes in guinea pig sciatic nerves during experimental diphtheritic neuritis. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1961, 20, 5—34.
 90. Wiśniewski H. M.: Immunopathology of demyelination in autoimmune diseases and virus infection. *Brit. Med. Bull.*, 1977, 33, 54—59.
 91. Wiśniewski H. M., Bloom B. R.: Experimental allergic optic neuritis (EAON) in the rabbit. A new model to study primary demyelinating diseases. *J. Neurol. Sci.*, 1975a, 24, 257—263.
 92. Wiśniewski H. M., Bloom B. R.: Primary demyelination as a nonspecific consequence of a cell-mediated immune reaction. *J. Exp., Med.*, 1975b, 141, 346—359.
 93. Wiśniewski H., Keith A. B.: Chronic relapsing experimental allergic encephalo-

- myelitis: an experimental model of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*, 1977, 1, 144—148.
94. Wiśniewski H., Prineas J., Raine C. S.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. I. Acute experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system. *Lab. Invest.*, 1969, 21, 105—118.
95. Wiśniewski H., Raine C. S.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. Part 5. (Central and peripheral nervous system lesions caused by diphtheria toxin). *Lab. Invest.*, 1971, 25, 73—80.
96. Wiśniewski H., Terry R. D., Whitaker J. N., Cook S. D., Dowling P. C.: Landry-Guillain-Barré syndrom. A primary demyelinating disease. *Arch. Neurol.*, 1969, 21, 269—276.
97. Vaughn J. E., Hinds P. L., Skoff R. P.: Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. The multipotential glia. *J. comp. Neurol.*, 1970, 140, 175—206.
- Adres autorki: Klinika Neurologiczna AM, ul. Oczuki 6, 02-007 Warszawa

WITOLD J. BRZOSKO, ZBIGNIEW K. LASKOWSKI,
BARBARA DĄBROWSKA-BERNSTEIN, DOROTA MATA CZ, JERZY KULCZYCKI,
JANINA PŁACHCIŃSKA

STUDIES ON THE PATHOGENESIS OF SUBACUTE SCLEROSING PANENCEPHALITIS

Department of Immunopathology, Institute of Infectious and Parasitic Diseases,
Medical Academy, Warsaw I Neurologic Clinic, Institute of Psychoneurology,
Warsaw

Although the etiology of subacute sclerosing panencephalities (SSPE) seems to be elucidated (Connolly et al. 1967; Horta-Barbossa et al. 1969), the pathogenesis of this lethal disease is far from being fully understood. The main unexplained pathogenic phenomenon in SSPE is the persistence of measles-like virus infection of the central nervous system (CNS) despite an active antiviral immune response of the host. It has been recently postulated and demonstrated by *in vitro* studies (Barry, Oldston 1974; Barry et al. 1975) that such a phenomenon can be best explained by antibody-induced antigen modulation. As the result, infected cells lose their virus-specific recognition receptors to which the reactants of the immune system must attach themselves before they destroy the infected cells.

The present study was undertaken to find out if this mechanism may be responsible for the persistence of measles-like virus infection of the CNS and the development of SSPE.

MATERIAL AND METHODS

Patients. The studies were carried out on 3 SSPE cases. Two of them were boys, one a girl. They were 5, 7 and 8 years old, respectively. The children were admitted to the hospital and SSPE was diagnosed on the basis of clinical symptoms and EEG pattern and high anti-measles antibody titer measured by immunofluorescence (IF) in serum and cerebrospinal fluid (CSF). In each patient at the time of admittance the clinical symptoms of disease had lasted 1 to 2 years. The children were under clinical control until death (4—6 months). Serum

from each patient was checked for complement-dependent cytotoxicity (CDC) and the peripheral blood lymphocytes (PBL) for cell-mediated cytotoxicity (CMC). From each autopsy case, the brain, *medulla oblongata* and the spinal cord were taken 2 to 4 hours after death.

Anti-measles antibody titer was stable during the observation period both in the serum and CSF in all patients and varied between 1:4000 in the serum and 1:80 in CSF.

Immunofluorescence. In each case the tissue material from frontal, parietal, temporal and occipital lobes, from basal nuclei, *pons Varoli*, *medulla oblongata* and spinal cord was taken for IF. As control the brain from autopsy of a 35-year-old woman who died of liver cirrhosis was used. For immunofluorescence and immune electron-microscopy (IEM) material from control brains was prepared by the same method as the SSPE brains. The tissue blocks were snap-frozen in petroleum ether, precooled to -80°C in acetone-dry ice mixture and stored until use at -20°C in a freezer.

SSPE viral antigen(s), IgG, IgM, IgA, $\text{C}_1'q$, C_3' and C_4' were localized in $3\ \mu$ cryostat sections. Localization of SSPE antigens were carried out by direct IF. For staining 2 reagents were used: anti-SSPE and anti-measles FITC globulins. Anti-SSPE reagent was prepared from SSPE serum and anti-measles reagent from a measles convalescent serum by ammonium sulphate precipitation and FITC conjugation. The staining dilution of the reagents was determined by IF direct staining on measles-infected HeLa cell smears. They were prepared from HeLa cells infected with the commercial vaccinal measles strain L-16, harvested 4–5 days after infection. From these cells drop smears were prepared on slides and used after fixation in acetone. IF direct staining was carried out at room temperature for 30 minutes, then the slides were washed out 3 times with phosphate buffered saline (PBS), and mounted with 10% glycerin in PBS. The specificity of the reagents for measles virus antigen(s) was checked by the blocking and absorption procedure presented elsewhere (Wrzos et al. 1979). The immunoreagents for IF localization of IgG, IgM, IgA, $\text{C}_1'q$, C_3' , C_4' and guinea pig C_3' were Behring and Biomed products.

Identification of immune complexes (IC) bound to glial and neuronal cells was done on cryostat sections by binding of exogenous homologous, or heterologous C_3' , and by dissociation of immune complexes by low pH. Binding of homologous C_3' was done on a set of 4 cryostat sections mounted on separate slides and fixed in acetone. C_3' was supplied with SSPE serum diluted 1:10 and 1:20. The control consisted of the same serum heated for 30 min at 56°C prior to the reaction. The binding procedure of heterologous C_3' was similar to that except that C_3' was heterologous (from a guinea pig). Dissociation of the immune complex was carried out on unfixed cryostat sections mounted on microscope slides in

glycine-HCl buffer pH 2.8. Dissociation was checked by staining of slides for both measles antigen(s) and IgG by IF. Specificity of dissociated IgG was controlled on drop smears of HeLa cells infected with L-16 measles virus after concentration of dissociating solution $50 \times$ on an Amicon concentrator.

Anti-measles antibody titers in the sera and CSF of our SSPE patients were determined by indirect IF. As a substrate were used drop smears of HeLa cells infected with measles virus strain L-16.

All IF studies and photography were done on a Reichert Polyvar-type microscope.

IEM was done on ultrathin sections cut from 10μ cryostat sections obtained from the parietal lobe of SSPE brain, fixed in 1% buffered formalin and stained with goat antihuman IgG labelled with peroxidase (goat anti-human IgG Px). Ultrathin sections were cut on a LKB microtome, stained with lead citrate and uranyl acetate. IEM photography was done with a Philips electron microscope.

Cytotoxicity assay. The approach of Brunner et al. (1968) was followed, except that microtiters were used in place of culture tubes. The assay was based on incubation of PBL from SSPE patients and PBL from healthy blood donors as a control, with the ^{51}Cr -labelled Lu-106 cell line persistently infected with measles virus. The amount of chromium release from Lu-106 cells indicated the number of destroyed cells. For labelling 2×10^6 target cells in 0.5 ml Eagle's minimum essential medium with 5% fetal calf serum (MEM 5% FCS) were incubated with 100 μCi of $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ solution (specific activity 50—400 μCi — Świerk, Poland) for 1 hour at 37°C . Next, the target cells were washed 3 times in ice-cold MEM 5% FCS, counted and resuspended at a concentration of 2×10^5 cells per ml. Lymphocytes were prepared from peripheral venous blood by centrifugation over a Ficoll-uropoline density gradient at $450 \times g$ for 25 min at room temperature. The interface gradient was removed and the cells therein washed 3 times with Parker medium and resuspended in Parker's medium containing antibiotics and 5% FCS. After counting, the number of lymphocytes was adjusted to give a concentration of 4×10^6 per milliliter. The test was performed in roundbottomed microtiter plates (Falcon). Each well contained a volume of 200 μl consisting of 100 μl of target cell suspension (2×10^4 cells) and 100 μl of effector cell suspension (4×10^5 cells) of fresh, cell free medium (Parker + 2 mM glutamine + antibiotics + 5% FCS) with or without SSPE serum fractions diluted from 10^{-1} to 10^{-3} . Plates were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air for a period of 18 hours. The radioactivity released into the supernatans was measured with an automatic type counter (Beckman 9000). Cytotoxicity was expressed as specific ^{51}Cr release calculated as a percentage from the formula:

$$\text{Specific } ^{51}\text{Cr release (\%)} = \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100$$

where maximum release was that amount of radioactivity released from target cells frozen and thawed in the presence of Triton-100. The results for each of set of 3 replicate microcultures were expressed as the mean \pm SD.

Cytotoxicity of sera from SSPE patients was determined by a modification of the eosin micromethod (Ferrone et al. 1971).

Immune complexes in sera. The SSPE sera and sera from the two healthy donors were fractionated on a Pharmacia column with Sephadex G-200. Eluted fractions were checked for the presence of antimeasles antibody in IgG and IgM by indirect IF on HeLa cells infected with L-16 strain of measles virus. Serum positive fractions in the IF test were also checked in CmC for their cytotoxicity blocking properties. Immune complexes were detected in eluates from the Sephadex G-200 column on Raji cells according to the procedure given by (Theofilopoulos et al. 1976).

RESULTS

Localization of immune complexes in SSPE brains

The SSPE virus antigen(s) was localized in all tissue blocks taken from the CNS of 3 SSPE patients. The greatest number of cells infected with SSPE virus found in the frontal, parietal, temporal and occipital lobes. A smaller number of infected cells was found in other checked parts of the CNS: basal nuclei, *pons Varoli*, *medulla oblongata* and spinal cord.

The SSPE virus antigen was predominantly present in nuclei of glial and neuronal cells (Figs 1, 2), but was also seen in the cytoplasm and/or in the cell membrane (Figs 3, 4). The amount of viral material varied from case to case and from one tissue block to another. The localization and the character of immunofluorescence of SSPE virus antigen(s) was similar after staining with anti-SSPE or anti-measles reagents labelled with FITC.

IgG was found on the cell membrane and in the cytoplasm and nucleus of infected cells, after staining with FITC-antihuman IgG. The localization of IgG paralleled closely the SSPE virus antigen distribution although cell membrane localization predominated (Figs 5, 6, 7).

The IgG bound to the glial and neuronal cells with SSPE virus could not be washed out in normal solution. However, it was washed out after treatment of tissue sections with glycine-HCl buffer, pH 2.8, which is

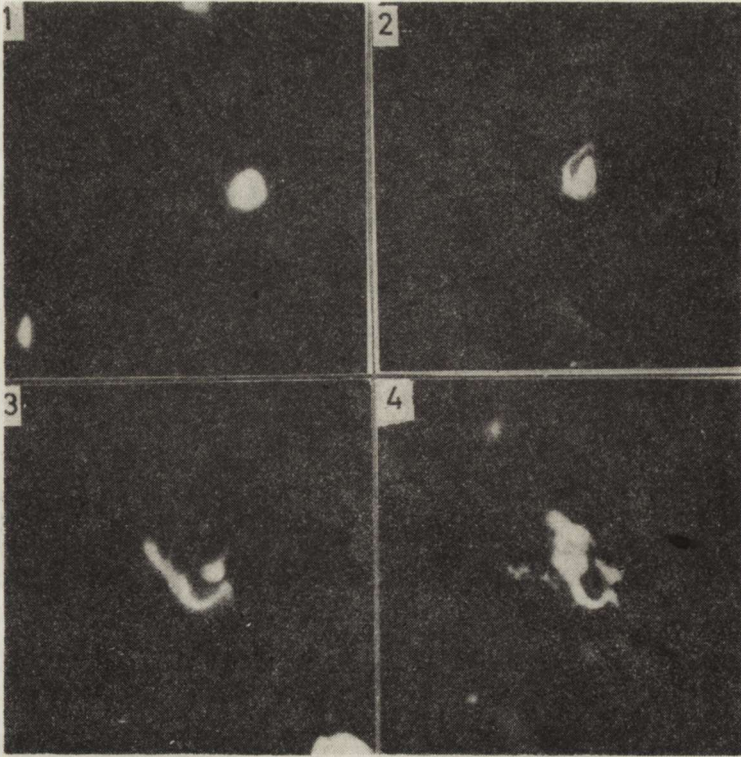


Fig. 1. SSPE virus antigen(s) in nucleus. Staining: human anti-SSPE FITC reagent. $\times 400$

Ryc. 1. Antygen(y) wirusa SSPE w jądrze. Barwienie: odczynnik — ludzkie anty-SSPE przeciwciała FITC. Pow. $400 \times$

Fig. 2. SSPE virus antigen(s) in nucleus, cytoplasm and cell membrane of glial cells. Staining: human anti-SSPE FITC reagent. $\times 400$

Ryc. 2. Antygen(y) wirusa SSPE w jądrze, cytoplazmie i błonie komórek glejowych. Barwienie: odczynnik — ludzkie anty-SSPE przeciwciała FITC. Pow. $\times 400$

Fig. 3. SSPE virus antigen(s) in cell membrane, cytoplasm and nucleus. Staining: human anti-measles FITC reagent. $\times 400$

Ryc. 3. Antygen(y) wirusa SSPE w błonie, cytoplazmie i jądrze komórki. Barwienie: odczynnik — ludzkie anty-odrowe przeciwciała FITC. Pow. $400 \times$

Fig. 4. SSPE virus antigen(s) in cell membrane, cytoplasm and nucleus of neurons. Staining: human anti-measles FITC reagent. $\times 400$

Ryc. 4. Antygen(y) wirusa SSPE w błonie, cytoplazmie, jądrze i neuronach komórki. Barwienie: odczynnik — ludzkie anty-odrowe przeciwciała FITC. Pow. $400 \times$

known as an effective immune complex dissociator (Brzosko et al. 1971; Nowosławski et al. 1972). Almost complete dissociation of IgG from infected cells was observed after 6 to 8 hours of treatment of sections at low pH. The specificity of IgG dissociated from tissue was checked on HeLa cells infected with L-16 measles virus by indirect IF and was found positive.

SSPE virus-infected cells of the CNS with immunologically bound IgG vigorously reacted with exogenous homologous and heterologous

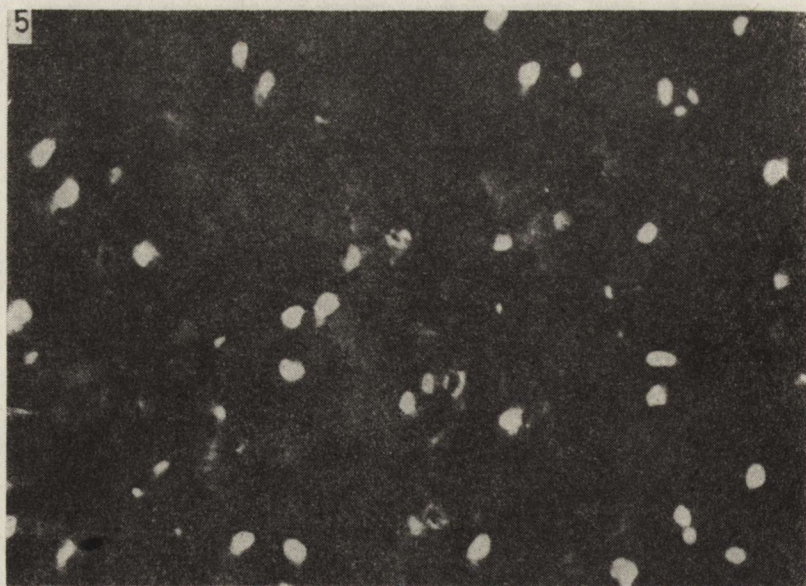


Fig. 5. IgG in SSPE brain. Numerous cells with IgG localized predominantly in nuclei. Staining: goat anti-human IgG FITC. $\times 200$

Ryc. 5. IgG anty-SSPE w mózgu. Liczne komórki z IgG zlokalizowanymi głównie w jądrze. Barwienie: kozie anty-ludzkie IgG FITC. Pow. $200 \times$

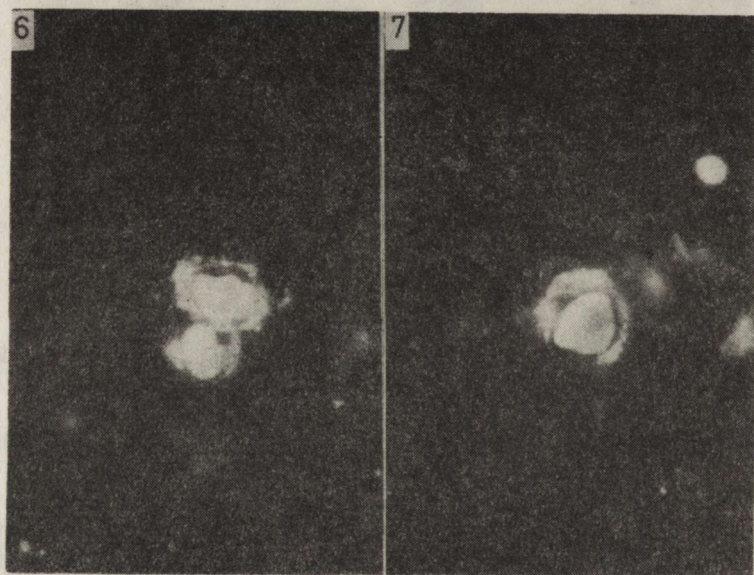


Fig. 6. Glial cells coated with IgG. Antibody present on cells membrane, in cytoplasm and nucleus of the cells. Staining: goat anti-human IgG FITC. $\times 600$

Ryc. 6. Komórki glejowe opłaszczone IgG. Przeciwciała obecne w błonie, cytoplazmie i jądrze komórek. Barwienie: kozie anty-ludzkie IgG FITC. Pow. $600 \times$

Fig. 7. Glial cells coated with IgG. Antibody present on cells membrane, in cytoplasm and nucleus of the cells. Staining: goat anti-human IgG FITC. $\times 600$

Ryc. 7. Komórki glejowe opłaszczone IgG. Przeciwciała obecne w błonie, cytoplazmie i jądrze komórek. Barwienie: kozie anty-ludzkie IgG FITC. Pow. $600 \times$

C_3' supplied with SSPE serum and guinea pig serum in the IF test (Figs 8, 9). The activity of IC was very high, as was judged by the brightness of the fluorescence.

Besides its presence in glial and neuronal cells, SSPE virus antigen(s) was localized in the walls of small and larger brain vessels. IgG paralleled closely the localization of SSPE viral antigen(s) in the walls of brain vessels. Vigorous binding of the homologous and heterologous C_3' (Fig. 9) was also noted.

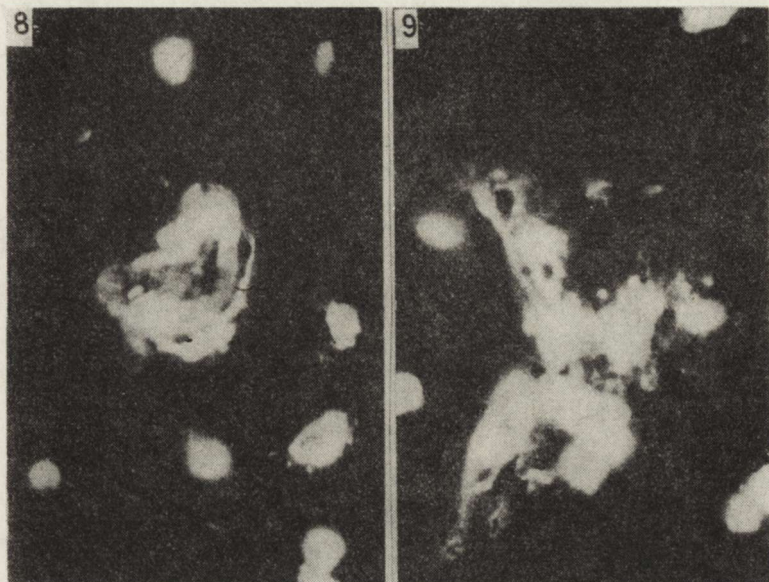


Fig. 8. Binding of exogenous human C_3' by SSPE virus antigen(s). Immune complex localized in cells and within walls of brain blood vessels. Staining: human serum / anti-guinea pig C_3' FITC. $\times 600$

Ryc. 8. Wiązanie egzogenego ludzkiego C_3' przez antygen(y) wirusa SSPE. Kompleksy immunologiczne zlokalizowane w komórkach i naczyniach krwionośnych mózgu. Barwienie: surowica świnki morskiej anti-ludzkie C_3' FITC. Pow. $600 \times$

Fig. 9. Binding of exogenous guinea pig C_3' by SSPE virus antigen(s). Immune complex localized in cells and within walls of brain blood vessels. Staining: human serum / anti-guinea pig C_3' FITC. $\times 600$

Ryc. 9. Wiązanie egzogenego C_3' świnki morskiej przez antygeny(y) wirusa SSPE. Kompleksy immunologiczne zlokalizowane w komórkach i naczyniach krwionośnych mózgu. Barwienie: surowica ludzka anti C_3' świnki morskiej FITC. Pow. $600 \times$

IF staining for the IgG, IgM and IgA producing cells disclosed a small number of IgG producers randomly distributed throughout the brain sections. Most of the cells infiltrating perivascular spaces were found negative when stained for the presence of the IgG, IgM and IgA. No IgM, IgA, $C_1'q$, C_3' or C_4' was found in the area of SSPE brain lesions tested by immunofluorescence.

IF staining of tissue sections taken from the control brain for the presence of SSPE virus antigen(s) was performed. There was no SSPE

virus antigen(s) present in the normal brain cells stained with either anti-SSPE reagent or anti-measles reagent conjugated with FITC. Small amount of IgG, IgM and IgA were found in the blood vessel system only. No binding of exogenous, homologous or heterologous C_3' was found in control tissue of the central nervous system.

Immunoelectronmicroscopy

The presence of IgG on the cell membrane, cytoplasm and nucleus of glial cells was confirmed by IEM. As shown in Figure 10 IgG was found to be bound to the SSPE viral nucleocapsid abundantly localized in the nucleus and dispersed sparsely on the cell membrane.

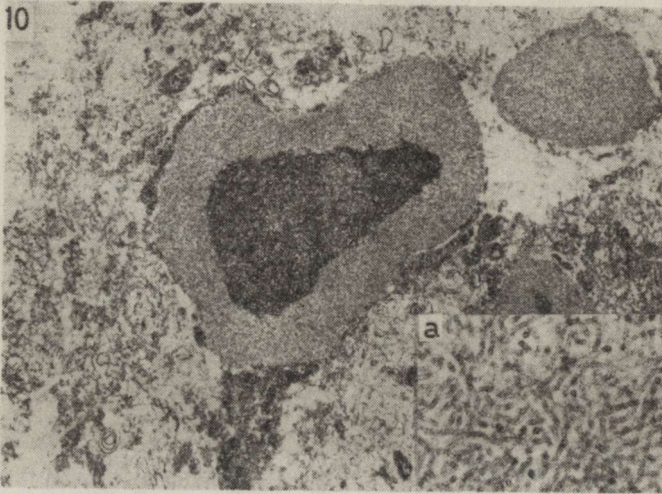


Fig. 10. IgG on the nucleus and on the cell membrane of the glial cell. $\times 2600$. a — Fragment of the nucleus of the glial cell from Fig. 10 disclosing the structure of SSPE virus nucleocapsid. Staining: goat anti-human IgG Px. $\times 45\,000$.

Ryc. 10. IgG w jądrze i błonie komórek glejowych. Pow. $2\,600\times$. a — Fragment jądra komórki glejowej z ryc. 10 uwidaczniający nukleokapsydy wirusa SSPE. Barwienie: odczynnik — kozie przeciwciała anty-ludzkie IgG Px. Pow. $45\,000\times$

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay for evaluation CMC of PBL to measles-virus-infected cells revealed that PBL from SSPE patients exhibited higher cytotoxicity than those from healthy blood donors did. As seen in table 1, PBL from 3 SSPE patients in the presence of 10% of FCS as well as 10% of normal human serum released about twice more ^{51}Cr from target cells during overnight incubation than PBL from healthy blood donors did.

Addition of 10% of SSPE serum with anti-measles antibody (titer 1:1000 or higher), inhibited the CMC cytotoxic reaction caused by PBL from SSPE patients and in a lower degree CMC caused by PBL of

Tabela 1. Spontaniczna i zależna od przeciwciał liza komórek Lu-106 zakażonych wirusem z krwi limfocyty z SSPE i zdrowych dawców z SSPE i zdrowych dawców

Medium supplemented with Medium z dodatkiem		Cytotoxicity: specific ^{51}Cr release (%) (mean \pm SD) in 18 h Cytotoksyczność: uwalnianie specyficzne (%) ^{51}Cr (średnia \pm SD) po 18 godz.			
		Case 1 Przypadek 1	Case 2 Przypadek 2	Case 3 Przypadek 3	Healthy donors Zdrowi dawcy
10% FCS		29.3 \pm 1.2	25.2 \pm 1.2	2.0 \pm 1.1	10
10% cielęcej surowicy płodowej					19–5.8
10% Normal serum		30.5 \pm 1.2	27.2 \pm 1.5	21.9 \pm 0.9	15
10% surowicy zdrowego dawcy					20.0–9.0
Autologous SSPE serum	10%	5.9 \pm 0.8	0.6 \pm 0.3	11.9 \pm 0.1	8.9
					9.8–5.2
	1%	7.9 \pm 2.0	14.8 \pm 3.9	12.9 \pm 0.6	11.4
					12.4–11.3
Autologiczna surowica SSPE	0.1%	14.7 \pm 1.9	20.0 \pm 2.3	18.8 \pm 2.1	13.1
					14.0–11.4
Column fractions of SSPE serum 0.2%	void fraction	0.3 \pm 0.1	14.0 \pm 0.6	17.7 \pm 1.8	4.2
	frakcja ciężka				2.2–6.3
Rozdział kolumnowy surowicy SSPE 0,2%	IgG fraction	76.6 \pm 15.3	62.4 \pm 3.2	24.8 \pm 0.6	29.6
	frakcja IgG				59.1–11.0
Column fractions of normal serum 0.2%	void fraction	25.1 \pm 1.2	25.1 \pm 2.5	20.0 \pm 2.8	15.0
	frakcja ciężka				20.0–9,9
Rozdział kolumnowy surowicy zdrowego dawcy 0.2%	IgG fraction	29.9 \pm 1.2	35.0 \pm 1.2	31.2 \pm 2.3	21.5
	frakcja IgG				28.0–15.0

1. Spontaneous ^{51}Cr release in 18 h for all experiments was 28.2 \pm 1.5%
Spontaniczne uwalnianie ^{51}Cr po 18 godz. inkubacji we wszystkich eksperymentach wynosiło 28.2 \pm 1.5%

2. Specific ^{51}Cr release in six experiments expressed as mean value and range (the lowest and the highest value). For ADCC lysis of Lu-106 by PBL from healthy donors SSPE serum from case 1 has been used

Swoiste uwalnianie ^{51}Cr w 6 eksperymentach wyrażone było wartością średnią oraz zakresem najwyższych i najniższych wartości. W efekcie cytotoksycznym ADCC liza komórek Lu-106 przez limfocyty obwodowe zdrowych dawców wywoływana była przy użyciu surowicy z pierwszego przypadku SSPE.

healthy donors. The blocking effect of SSPE serum was observed in a serum concentration ranged from 10 to 0.1%.

Under similar experimental conditions a serum from healthy blood donors did not inhibit CMC mediated by PBL from SSPE patients.

In separate experiments with IgM and IgG-containing fractions prepared from SSPE serum, the high molecular weight fraction collected from Sephadex G-200 column in a void volume, highly inhibited CMC of PBL from healthy blood donors. In contrast, the IgG fraction in the same protein concentration as the void fraction (0.2%), enhanced the cytotoxicity of PBL derived from SSPE patients or normal subjects. Anti-measles activity examined by indirect IF on HeLa cells infected with measles virus was found in the IgG fraction in a 1 : 640 titers.

The void fraction run on Sephadex G-200 column prepared from normal serum had no blocking effect in the CMC system. IgG fraction with an anti-measles antibody titer 1 : 100 showed no significant enhancing effect on PBL-mediated cytotoxicity.

The high molecular void fraction prepared from SSPE serum examined by immunofluorescence on the HeLa cells infected with measles virus was found to be negative when stained for anti-measles activity in the IgM class, and positive when stained in the IgG class. Analysis of the fraction for the presence of immune complexes on Raji cells revealed positive IF staining with anti-IgG reagent.

The void fraction obtained from the two control sera derived from healthy blood donors, was negative in respect to anti-measles activity when stained in IF with FITC-anti-SSPE serum and FITC-anti-measles reagents. This fraction was also negative when analyzed for the immune complexes on the Raji cell system.

DISCUSSION

The results presented here from immunofluorescence and immunoelectronmicroscopic studies on material from 3 SSPE brains revealed that IgG with anti-measles specificity was attached to the majority of brain cells. IgG was localized on the cell surface as well as intracellularly: in the cytoplasm and nuclei of infected cells.

The present observations support the hypothesis that, in SSPE, chronic infection of brain cells with measles-like virus is mainly due to the antibody-induced antigenic modulation process which has been demonstrated *in vitro* by Barry et al. (1974; 1975). According to these experiments, the removal of measles virus antigens from the surface of infected cells occurs *in vitro* in the presence of specific antibodies and in the absence of functional complement. Furthermore, measles virus-infected cells, grown in the presence of anti-measles antibodies, maintain the virus infection. However, there was full reexpression of

antigenic sites on the cell membrane once antibodies had been removed from the culture medium.

In our observations, measles virus-specific IgG antibodies were found immunologically attached to the surface viral antigens on infected brain cells. These antibodies were also detectable extracellularly in the perivascular space as well as in the walls of blood brain vessels, complexed with SSPE virus antigen. These observations support the view that the antigen modulation event may occur *in vivo*.

Too little is known about the mechanisms of antibody-induced antigen modulation to tell whether the additional intracellular occurrence of the immune complexes consisting of SSPE virus and specific IgG, is a part of the process. It seems reasonable to consider that the abnormal occurrence of immune complexes inside the living brain cells, could have some pathogenic consequences. These are questions which should be tackled with *in vitro* model.

Conceivably, antigen modulation *in vivo* might actually be responsible for the establishment of viral persistence in SSPE brain tissue because the measles-infected cells, by progressive loss of surface measles antigenicity, may become unsusceptible to an immune attack and escape immune surveillance. Furthermore, antigen modulation could help to promote a continuous formation of free soluble immune complexes of SSPE virus with specific IgG. Our immunofluorescent findings of localization of such immune complexes in the walls of blood vessels in SSPE brains and in perivascular area, strongly suggest that immune complexes may inhibit immune cell penetration into the brain tissue and protect the infected cells from the cytotoxic activity of immune cells.

The finding of the presence of immune complexes in CNS of SSPE patients prompted us that immune complexes should also be present in serum of SSPE patients and could interfere with the immune reactivity of SSPE PBL.

In order to test that such activity of immune complexes could change the cytotoxic activity of PBL against measles infected target cells we have investigated the effect of SSPE sera on lymphocyte-mediated cytotoxicity using a microculture system with ⁵¹Cr-labelled persistently measles-infected cells as target cells. We have found that lymphocytes from peripheral blood of SSPE caused a specific cytotoxicity in the absence of measles antibodies and complement. There have been conflicting reports on whether lymphocytes from SSPE patients are immunologically defective and whether they are able to respond to measles antigen (Ahmed et al. 1974; Kreth et al. 1975; Kreth, Wiegant 1977). Our findings indicated that cell-mediated immunity against measles virus does exist in SSPE patients.

In separate experiments when SSPE lymphocytes interacted with target cells in the presence of measles IgG antibodies prepared from

SSPE serum by column separation, enhancement of cytotoxicity has been noted. The effect was dependent on measles antibody concentration and can be demonstrated with lymphocytes from SSPE and normal individuals. These results show that the antibody-dependent cytotoxicity of "K-cells" is intact in patients with SSPE. Normal antibody-dependent cytotoxicity of lymphocytes from SSPE patients has also been found by others (Kreth, Wiegand 1977).

SSPE serum added into our cytotoxicity system in a concentration ranging from 10 to 0.1%, had a significant blocking effect on specific cell-mediated cytotoxicity of lymphocytes from SSPE patients and control donors as well. Under similar conditions serum from normal donors as well as normal serum fractions prepared by Sephadex G-200 column preparation, had effect on cell-mediated cytotoxicity.

Testing SSPE fractions from Sephadex G-200 we found that blocking activity was mainly observed in the high molecular weight void fraction. By immunofluorescence staining we discovered that this inhibitory fraction had no anti-measles activity in the IgM class but it was present in the IgG class. This fraction also showed positive staining for immune complexes with anti-IgG reagent on the Raji cell system.

As regards the presence of anti-measles IgG in the high molecular weight fraction and the positive staining of this fraction for immune complexes, it seems reasonable to consider that the blocking factor present in SSPE serum is an immune complex consisting of measles virus antigen and specific antibodies.

Similar results have been reported previously by Ahmed et al. (1974) indicating an inhibitory activity of SSPE plasma and spinal fluid on cellular immunity *in vitro* against measles and SSPE virus antigens. This blocking factor was characterized as an immune complex consisting of SSPE virus antigen, specific antibodies and complement.

To sum up, our data from cytotoxic studies indicate a highly efficient lymphocyte "killer" function in patients with SSPE, but also present evidence for the serum blocking factor which seems to be an immune complex with specificity to measles antigen.

It is conceivable that the blocking factor as well as antigen modulation might be responsible for the failure of the immune system to eliminate the persistent virus infection of the central nervous system. However, the presence of brain cells infected with SSPE virus coated with immunologically attached antibodies suggests that persistence of SSPE virus infection is a much more complicated process than that limited to the antigen modulation only.

As shown by the present results, no $C_1'q$, C_3' or C_4' was found to be attached to the cell membrane immune complex, but exogenous homologous or heterologous complement components were readily bound. This indicates clearly, that infected cells may bind complement through anti-

viral antibodies, what is a prerequisite for immunocytolysis of measles virus-infected cells. On the other hand sera for SSPE patients were found to be highly effective in complement-dependent lysis (unpublished data). This paradoxical effect may be partially attributable to the fact that the target organ for SSPE infection — the central nervous system — is separated from the direct influence of the immune system by the blood-brain barrier which itself not being damaged by SSPE virus replication sustains partially its biological activity. The immune pattern which was found by immunofluorescence in SSPE brains, at least 1—2 years after initiation of SSPE infection, indicates that even at this stage of the disease, the blood-brain barrier was not permeable for complement constituents such as $C_1'q$, C_3' or C_4' . This may explain the fact why the C-mediated lysis may be defective in SSPE patients at the brain level despite the normal C value in the serum. However, the presence of anti-measles antibodies in SSPE brain tissue seems to be contradictory to the unchanged structure of the blood-brain barrier. The possibility can not be excluded that specific anti-measles IgG antibodies which have been found in the SSPE brains, were apparently produced there by plasma cells abundantly present in the infected central nervous system.

It is also possible that in the perivascular area complement constituents could be highly consumed both by immune complexes and lymphocytes bearing receptors for $C_1'q$ and C_3' . This explanation receives strong support for the observed localization of immune complexes in the walls of the brain blood vessels, the presence of immune complexes in serum and lymphatic tissue (Ahmed et al. 1974; Steele et al. 1975) and also from the morphology of perivascular infiltrates so typical for SSPE.

It may be speculated that IC deposited inside the cell may exert some cytotoxic effect through disturbance of cell metabolism. This type of cell injury may be operational and effective on the cells with a long life span. A similar phenomenon has been observed in chronic aggressive hepatitis B where anti-HBc may be visualized inside the hepatic cell nucleus complexed with HBc Ag.

Considering the different factors relevant to the pathogenesis of SSPE, special attention should be devoted to the nature of SSPE virus as the main pathogen in this disease. Although, the SSPE virus and measles virus have common antigens, they are not identical. Data already collected indicate that there are differences in the cell susceptibility towards these viruses in their growth kinetics (Ter Meulen et al. 1972, Hamilton et al. 1973), immunogenicity (Salmi et al. 1972), and biochemical and biophysical characteristics (Yeh 1973; Miller, Field 1976). Replication of SSPE virus in man is restricted to glial and nerve cells and lymphocytes (Wrzos et al. 1979). No replication of SSPE virus was found in the cells of the blood-brain barrier. According to our and other

authors' immunofluorescent observations (Hamilton et al. 1973) SSPE virus may exert a low cytopathogenic effect on cells in which they are replicated. Thus, the elimination of cells infected with SSPE virus should rather be mediated by immune cells and immune mechanisms than by a direct viral cytopathic effect.

*

Lu-106 cell line was obtained from Dr. Norrby, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Material for IEM was prepared by Dr. T. Michalak from Laboratory of Electron Microscopy, State Institute of Hygiene, Warszawa, Poland.

BADANIA NAD PATOGENEZĄ PODOSTREGO STWARDNIAJĄCEGO ZAPALENIA MÓZGU

Streszczenie

Metodą immunofluorescencji (IF) i badaniami immunoelektronomikroskopowymi wykazano, że komórki zakażone wirusem SSPE są pokryte IgG. Stwierdzono, że jest to gamma globulina o swoistości anty-odrowej, tworząca kompleks immunologiczny (IC) z antygenami wirusowymi. Za pomocą odczynu IF zlokalizowano IgG na powierzchni komórek zakażonych wirusem SSPE. Obserwacja ta została potwierdzona immunoelektronomikroskopią, dzięki której stwierdzono ponadto, że cząsteczka IgG jest związana z antygenem (antygenami) nukleokapsydu wirusa SSPE.

C₁q, C₃ ani C₄ nie były związane z cząsteczkami przeciwciał przyłączonych do komórki, chociaż wykazano, że ten kompleks immunologiczny (IC) może intensywnie wiązać homologiczny i/lub heterologiczny C₃. Zarówno odporność humoralna, jak i komórkowa u chorych z SSPE była w pełni zachowana wobec komórek zakażonych wirusem odry, nawet jeśli w surowicach pacjentów były obecne kompleksy immunologiczne. Stwierdzono, że kompleksy te były utworzone z antygeny (antygenów) wirusa SSPE i cząsteczki przeciwciała klasy IgG.

ИССЛЕДОВАНИЯ ПАТОГЕНЕЗА ПОДОСТРОГО СКЛЕРОЗИРУЮЩЕГО ВОСПАЛЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

При помощи метода иммунофлюоресценции (IF) и иммуноэлектронно-микроскопических исследований доказано, что клетки зараженные вирусом подострого склерозирующего воспаления головного мозга (ПСВГМ) покрыты IgG. Констатировано, что это гамма глобулины с анти-коровой специфичностью, образующие иммунологический комплекс (IC) с вирусными антигенами. При помощи реакции IF локализовано IgG на поверхности клеток зараженных вирусом ПСВГМ. Это наблюдение было подтверждено посредством иммуноэлектронно-микроскопии, благодаря которой констатировано сверх того, что молекула IgG связана с антигеном (антигенами) нуклеокапсида вируса ПСВГМ.

C₁q, C₃ ни C₄ не были связаны с молекулой антитела присоединенной к клетке, хотя доказано, что этот иммунологический комплекс (IC) может интенсивно связывать гомологичный и/или гетерологичный C₃. Как гуморальный, так и клеточный иммунитет у больных

с ПСВГМ был функционально эффективен по отношению к клеткам зараженным вирусом кори, даже если в сыворотках пациентов присутствовали иммунологические комплексы. Констатировано, что эти комплексы были образованы из антигена (антигенов) вируса ПСВГМ и молекулы антитела класса IgG.

REFERENCES

1. Ahmed A., Strong D. M., Sell K. W., Thurman G. B., Knudssten R. C., Wistar R. Jr., Gray W. R.: Demonstration of blocking factor in the plasma and spinal fluid of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J. Exp. Med.*, 1974, 139, 902—924.
2. Barry J. S., Oldstone M. B. A.: Antibody-induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. *J. Immunol.*, 1974, 113, 1205—1209.
3. Barry J. S., Oldstone M. B. A.: Immunologic injury in measles virus infection. II. Suppression of immune injury through antigenic modulation. *J. Exp. Med.*, 1975, 142, 864—876.
4. Barry J. S., Cooper N. R., Oldstone M. B. A.: Immunologic injury of cultured cells infected with measles virus. I. Role of IgG antibody and the alternative complement pathway. *J. Exp. Med.*, 1975a, 141, 761—774.
5. Barry J. S., Lampert P. W., Oldstone M. B. A.: Replication and persistence of measles virus in defined subpopulations of human leukocytes. *J. Virol.*, 1975b, 16, 1638—1649.
6. Brunner K. T., Manel J., Cerottini C., Chapuis B.: Quantitative assay of the lytic action of immune blastoid cells on ^{51}Cr -labelled allogenic target cells *in vitro*, inhibition by isoantibodies and drugs. *Immunology*, 1968, 14, 181—187.
7. Brzosko W. J., Madaliński K., Krawczyński K., Nowosiłowski A.: Immunohistochemistry in studies on the pathogenesis of pneumocystis pneumonia in infants. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1971, 177, 156—162.
8. Connolly J. H., Allen L., Hurvitz L. J., Miller J. H. D.: Measles virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet*, 1967, 1, 542—544.
9. Ferrone S., Pellegrino M., Reisfeld R. A.: A rapid method for direct HLA typing of cultured lymphoid cells. *J. Immunol.*, 1971, 107, 613—625.
10. Hamilton R., Barbosa L., Dubois M.: Subacute sclerosing panencephalitis viruses; study of biological markers. *J. Virol.*, 1973, 12, 632—642.
11. Horta-Barbosa L., Fuccillo A. A., Sever J. L., Zeman W.: Subacute sclerosing panencephalitis: isolation of measles virus from brain biopsy. *Nature (London)*, 1969, 221, 974.
12. Kreth H. W., Käckel M. Y., Ter Meulen V.: Demonstration of *in vitro* lymphocyte-mediated cytotoxicity against measles virus in SSPE. *J. Immunol.*, 1975, 114, 1042—1048.
13. Kreth H. W., Wiegand G.: Cell-mediated cytotoxicity against measles virus in SSPE. II. Analysis of cytotoxic effector cells. *J. Immunol.*, 1977, 118, 291—295.
14. Miller C. A., Field B. N.: Measles and subacute sclerosing panencephalitis viruses; comparative characterisation of purified particles. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1976, 35, 93—97.
15. Meulen Ter, V., Katz M., Käckell Y. M., Barbanti-Brodano G., Koprowski H.: Subacute sclerosing panencephalitis: *in vivo* characterisation of viruses isolated from brain cells in culture. *J. Infect. Dis.*, 1972, 126, 11—17.

16. Nowosławski A., Krawczyński K., Brzosko W. J., Madaliński K.: Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Am. J. Pathol.*, 1972, 68, 31—47.
17. Salmi A. A., Norrby E., Panelius M.: Identification of different measles virus-specific antibodies in the serum and cerebrospinal fluid from patients with subacute sclerosing panencephalitis and multiple sclerosis. *Infect. Immun.*, 1972, 6, 248—254.
18. Steele R. W., Fucillo D. A., Hensen S. A., Vincent M. M., Bellanti J. A.: Specific inhibitory factors of cellular immunity in patients with SSPE. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 501—503.
19. Theofilopoulos A. N., Wilson C., Dixon F. J.: Replication of dengue-2 virus in cultured human lymphoblastoid cells and subpopulations of human peripheral leukocytes. *J. Clin. Invest.*, 1976, 57, 169—175.
20. Wrzos H., Kulczycki J., Laskowski Z. K., Matacz D., Brzosko W. J.: Detection of measles virus antigen(s) in peripheral lymphocytes from patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Arch. Virol.*, 1979, 60, 291—297.
21. Yeh J.: Characterisation of virus-specific RNAs from subacute sclerosing panencephalitis virus-infected CV-1 cells. *J. Virol.*, 1973, 12, 962—968.

Authors' address: Department of Immunopathology I.I.P.D., Medical Academy, 37, Wolska Str., 01—201 Warszawa

ANDRZEJ LOESCH

ZIO-IMPREGNOWANE KOLBKI SYNAPTYCZNE W NEUROPILU JĄDRA NADWZROKOWEGO I PRZYKOMOROWEGO SZCZURA POZBAWIONEGO WODY DO PICIA

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa

Na podstawie ultrastrukturalnych i elektrofizjologicznych badań układu nerwowego zwierząt kręgowych Uchizono (1965; 1975) przeprowadził klasyfikację pęcherzyków synaptycznych oraz zakończeń nerwowych i jednocześnie z Bodianem (1966) podał hipotezę, według której kolbka presynaptyczna zawierająca okrągłe pęcherzyki synaptyczne (elektronowo-przezierny) związana jest z pobudzeniową czynnością synaptyczną. Natomiast obecność pęcherzyków synaptycznych spłaszczonych (elektronowo-przeziernych) związana jest z hamulcową czynnością synaptyczną. W obu rodzajach zakończeń synaptycznych, nazwanych odpowiednio typami S i F, występują niekiedy również pęcherzyki z gęstym rdzeniem (Uchizono 1975).

W jądrze nadwzrokowym i przykomorowym szczura występują dwa rodzaje kolbek synaptycznych, które zawierają okrągłe lub spłaszczone pęcherzyki synaptyczne (Loesch 1981a). Przy zastosowaniu cytochemicznego barwienia cynkowo-jodowo-osmowego (ZIO) na poziomie ultrastrukturalnym stwierdzono, że w obrębie tych kolbek produkt reakcji ZIO wybarwia zarówno okrągłe, jak i spłaszczone pęcherzyki synaptyczne. Badania ilościowe ZIO-impregnowanych kolbek synaptycznych, zawierających okrągłe pęcherzyki synaptyczne (u szczura w warunkach prawidłowych) wykazały ponadto cytochemiczne podobieństwo jądra nadwzrokowego i przykomorowego w zakresie wartości względnej liczby (‰) ZIO-reaktywnych pęcherzyków synaptycznych.

W pracy przeprowadzono ocenę ultrastrukturalnej organizacji kolbek synaptycznych jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczurów pozbawionych wody do picia (odwodnienie prowadzące do pobudzenia neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego). Szczególną uwagę zwrócono na zachowanie się kolbek synaptycznych typu S, zawierających

okrągłe pęcherzyki synaptyczne. W badaniach nad dynamiką zmian ultrastrukturalnych w obrębie tych kolbek wykorzystano zjawisko występowania produktu reakcji ZIO w pęcherzykach synaptycznych. Celem dokładniejszego oszacowania tej dynamiki ocenę opisową uzupełniono oceną ilościową.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 40 szczurach szczepu Wistar, trzymiesięcznych nieciążarnych samicach. Doświadczenie przeprowadzono na przełomie marca i kwietnia w następujących grupach:

- I — szczury pobierające pokarm i wodę do picia *ad libitum* — 14 zwierząt (warunki prawidłowe — kontrola);
- II — szczury pozbawione wody do picia (odwodnione) przez 4 dni — 14 zwierząt;
- III — szczury pozbawione wody do picia (odwodnione) przez 12 dni — 12 zwierząt.

Do badań w mikroskopie elektronowym jądro nadwzrokowe (SON) i przykomorowe (PVN) pobierano po dekapitacji zwierząt.

Zastosowano dwie metody utrwalania. 1) Konwencjonalne utrwalanie glutałdehydem. Wycinki utrwalano przez 2 godz. w 2% aldehydzie glutałowym w 0,05 M buforze fosforanowym (pH 7,4), a następnie przez 1 godz. w 1% OsO₄ w 0,05 M buforze fosforanowym (pH 7,4), w temperaturze 4°C. Po utrwaleniu wycinki odwadniano w etanolu i zatapiano w Eponie. 2) Utrwalanie do impregnacji cynkowo-jodowo-osmowej (ZIO). Wycinki utrwalano przez 20 min w 4% roztworze paraformaldehydu w 0,05 M buforze fosforanowym. Następnie przepłukiwano je w tym samym buforze fosforanowym i utrwalano w 6,2% aldehydzie glutałowym w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,4) przez 2 godz. Podwójne utrwalanie przeprowadzano w temperaturze 4°C. Po utrwaleniu wycinki płukano 3 razy po 5 min w buforze Tris, zawierającym: 3,3 g NaCl, 0,06 g CaCl₂, 0,03 g MgCl₂ · 6 H₂O, 0,605 g „Trizma-Base” (tris/hydroxymethyl/aminomethane, Sigma) i 100 ml wody destylowanej. Następnie wycinki inkubowano przez 16 godz. w temperaturze 4°C, w mieszaninie ZIO przygotowanej według Kawany i wsp. (1969). Po inkubacji wycinki przepłukiwano buforem Tris, odwadniano w etanolu i zatapiano w Eponie.

W obu metodach skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

Analiza ilościowa

Badania ilościowe przeprowadzono na ZIO-impregnowanych kolbkach synaptycznych typu S z okrągłymi pęcherzykami synaptycznymi

(z uwzględnieniem tych kolbek, które dodatkowo zawierały pęcherzyki z gęstym rdzeniem) pochodzących z neuropilu jądra SON i PVN. W tym celu wymienione kolbki synaptyczne fotografowano w mikroskopie elektronowym stosując powiększenie 18 000 \times . Następnie przy użyciu planimetru obliczano pole ich profilu z odbitek fotograficznych powiększonych trzykrotnie. Równocześnie w kolbkach synaptycznych określano liczbę pęcherzyków synaptycznych okrągłych (typu S) oraz liczbę pęcherzyków wybarwionych produktem reakcji ZIO. Z powyższych danych otrzymano ostatecznie zmienne w postaci:

- pola profilu poszczególnych kolbek,
- liczby pęcherzyków synaptycznych typu S w polu profilu kolbek,
- względnej liczby (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków typu S w polu profilu kolbek. Porównanie pod względem tych zmiennych przeprowadzono pomiędzy następującymi grupami:

I SON — II SON	I PVN — II PVN	I SON — I PVN
II SON — III SON	II PVN — III PVN	II SON — II PVN
I SON — III SON	I PVN — III PVN	III SON — III PVN

Do oszacowania istotności stosowano test mediany z użyciem statystyki Chi^2 . Przyjęto, że obserwowane różnice są znamienne, jeżeli wartość p odpowiadająca danej wartości Chi^2 będzie mniejsza od 0,05.

WYNIKI

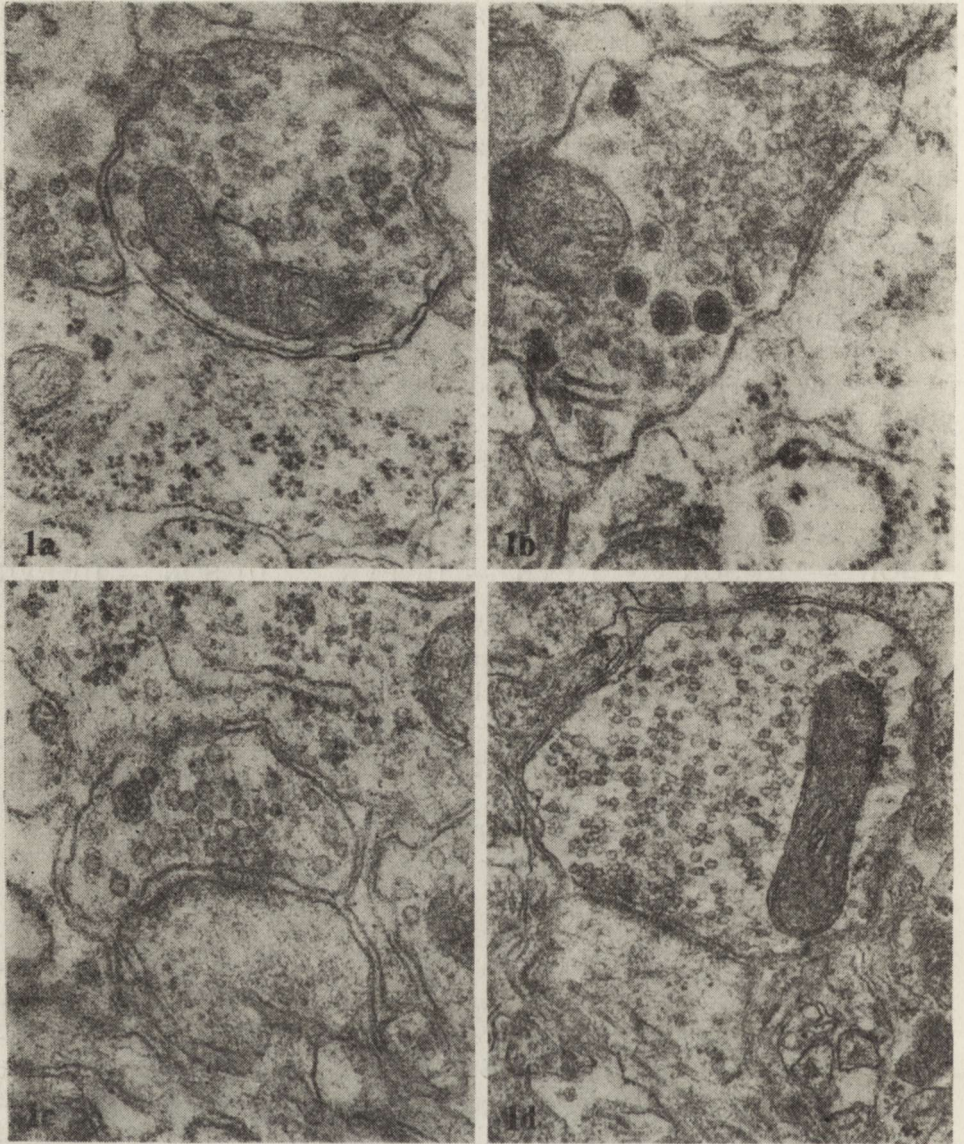
Obraz mikroskopowo-elektronowy

Szczury kontrolne (grupa I)

Kolbki synaptyczne z okrągłymi pęcherzykami synaptycznymi występowały zarówno w jądrze SON, jak i PVN. Większość z nich kontaktowała się z perykarionami neuronów sekrecyjnych (ryc. 1a,b) i dendrytami (ryc. 1c,d). Zastosowanie impregnacji ZIO umożliwiło lepszą identyfikację kolbek synaptycznych. Stwierdzono mianowicie, że produkt reakcji ZIO zabarwiał wybiórczo pęcherzyki synaptyczne okrągłe i spłaszczone w odpowiednich typach kolbek synaptycznych (ryc. 2a,b,c). Niektóre cechy ultrastrukturalne ZIO-impregnowanych kolbek synaptycznych w jądrze SON i PVN szczura w warunkach prawidłowych były także omówione we wcześniejszej publikacji (Loesch 1981a).

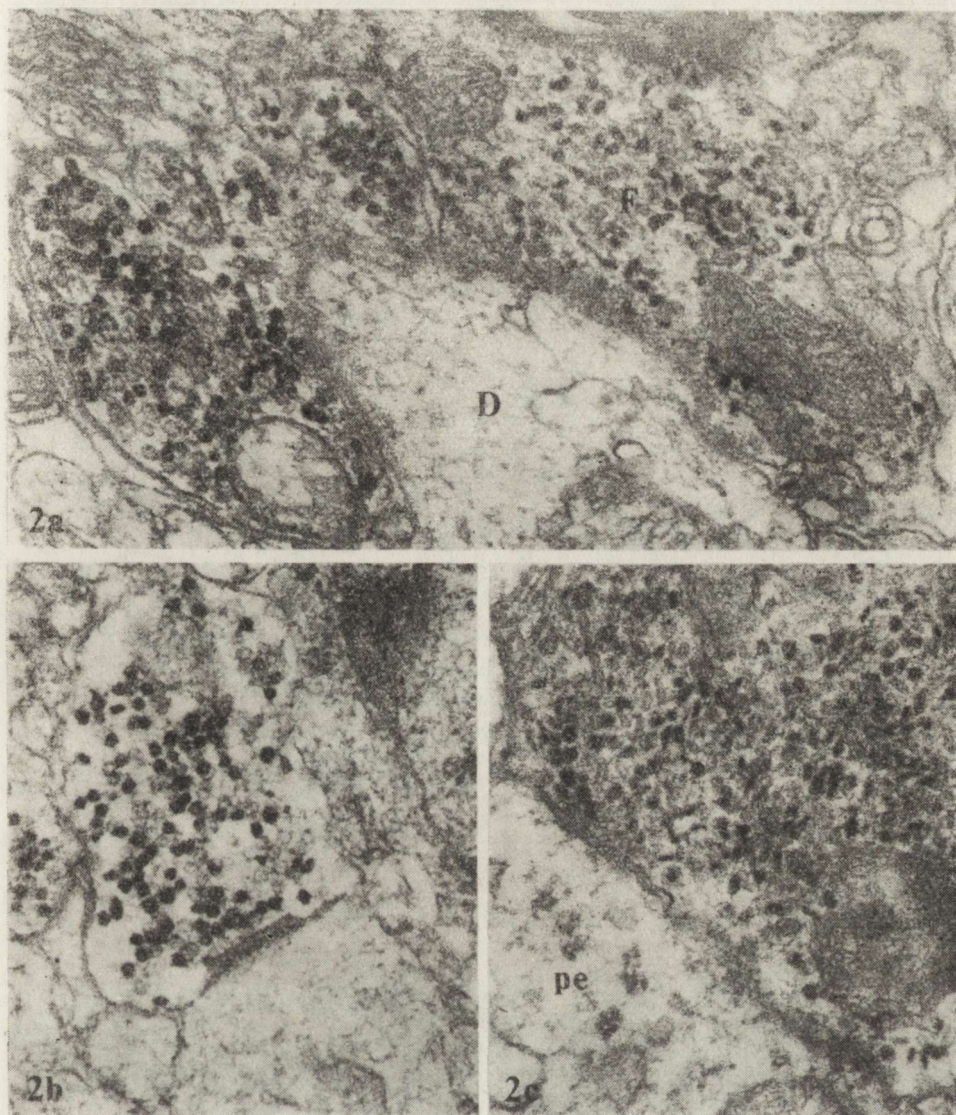
Szczury odwadniane przez 4 dni (grupa II)

Większość kolbek synaptycznych obserwowanych w jądrze SON i PVN wykazywała prawidłowe cechy ultrastrukturalne oraz nie różniła się od grupy kontrolnej. Jedynie nieliczne kolbki w obu jądrach podwzgórza były zmienione. Zmiany te widoczne były w postaci przejaśnionej lub zagęszczonej aksoplazmy, wakuolizacji obszaru presynaptycznego, sku-



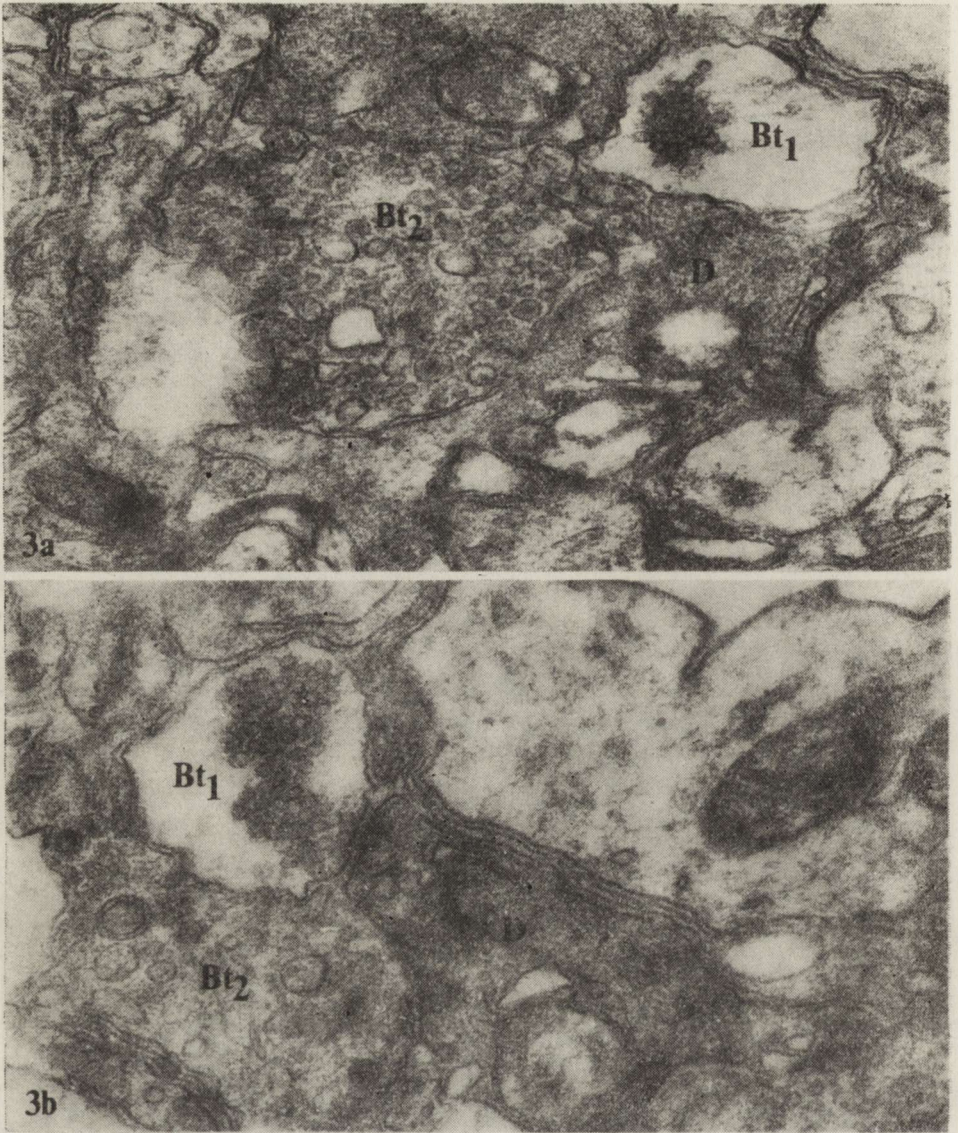
Ryc. 1a-d. Szczur kontrolny. *1a.* SON. Kolbka typu S w kontakcie z neuronem sekrecyjnym. Pow. 44 000 \times . *1b.* PVN. Kolbka typu S w kontakcie z neuronem sekrecyjnym; obok pęcherzyków jasnych widoczne pęcherzyki z gęstym rdzeniem. Pow. 62 000 \times . *1c.* SON. Kolbka typu S w kontakcie z dendrytem; obok pęcherzyków jasnych jeden pęcherzyk z gęstym rdzeniem. Pow. 72 000 \times . *1d.* PVN. Kolbka typu S w kontakcie z dendrytem; widoczne liczne pęcherzyki okrągłe. Pow. 35 000 \times

Fig. 1a-d. Rat in normal conditions. *1a.* SON. S-type bouton synapsing on secretory neuron. \times 44 000. *1b.* PVN. S-type bouton synapsing on secretory neuron; the bouton contains electron-lucent and dense-cored vesicles. \times 62 000. *1c.* SON. S-type bouton synapsing on dendrite; the bouton contains one dense-cored vesicle and a few electron-lucent vesicles. \times 72 000. *1d.* PVN. S-type bouton synapsing on dendrite; numerous spheroid vesicles are seen. \times 35 000



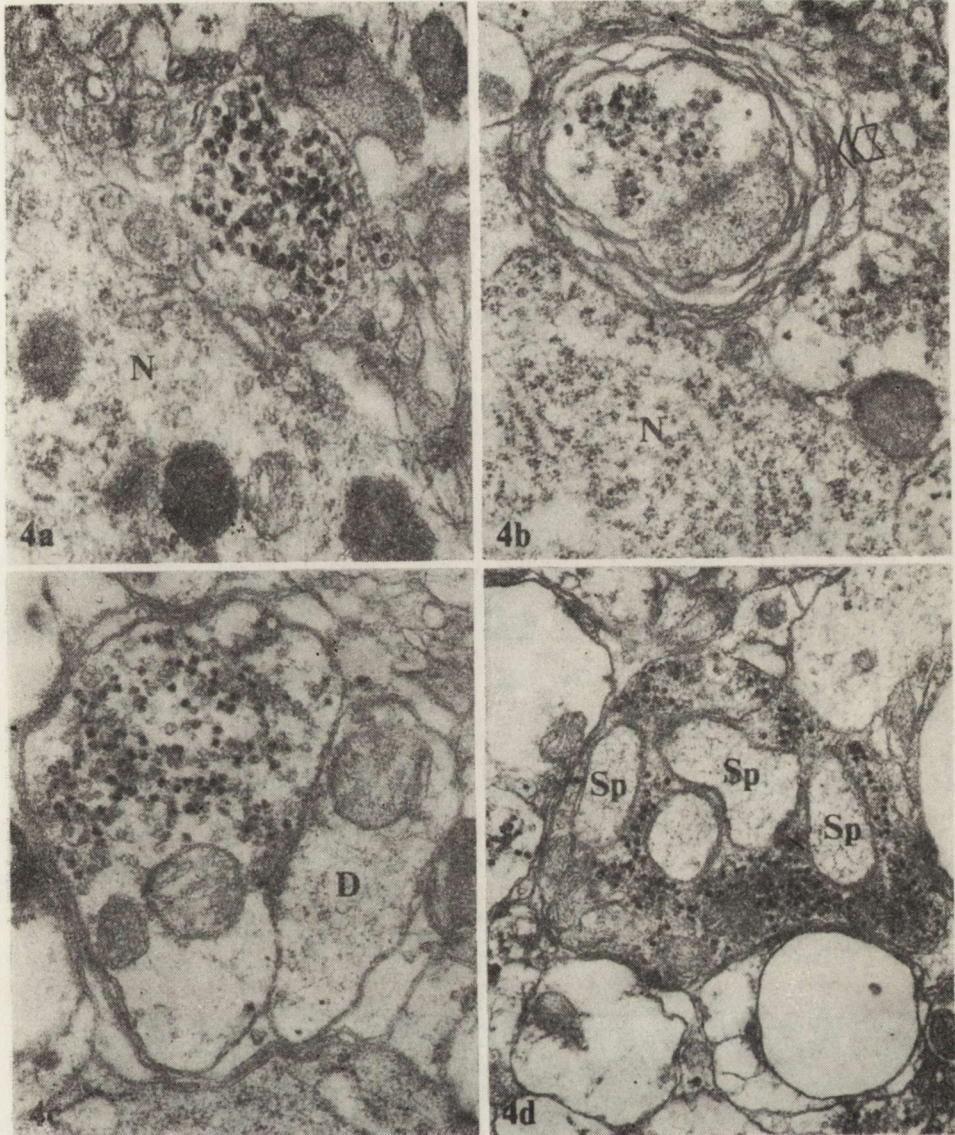
Ryc. 2a-c. Szczur kontrolny. 2a. SON. ZIO-dodatnie pęcherzyki okrągłe i spłaszczone w kolbkach typu S (S) i typu F (F) kontaktujących się z dendrytem (D). Pow. 54 000 \times . 2b. PVN. ZIO-dodatnie okrągłe pęcherzyki w kolbce typu S, kontaktującej się z dendrytem. Pow. 46 000 \times . 2c. PVN. Kolbka typu F ze spłaszczonymi ZIO-dodatnimi pęcherzykami; pe — element postsynaptyczny. Pow. 52 000 \times

Fig. 2a-c. Rat in normal conditions. 2a. SON. ZIO-positive spheroid and flattened vesicles within the S-type (S) and F-type (F) boutons on dendrite (D). \times 54 000. 2b. PVN. S-type bouton contacting dendrite contains ZIO-positive spheroid vesicles. \times 46 000. 2c. PVN. Within the F-type bouton ZIO-positive flattened vesicles; pe — postsynaptic element. \times 52 000



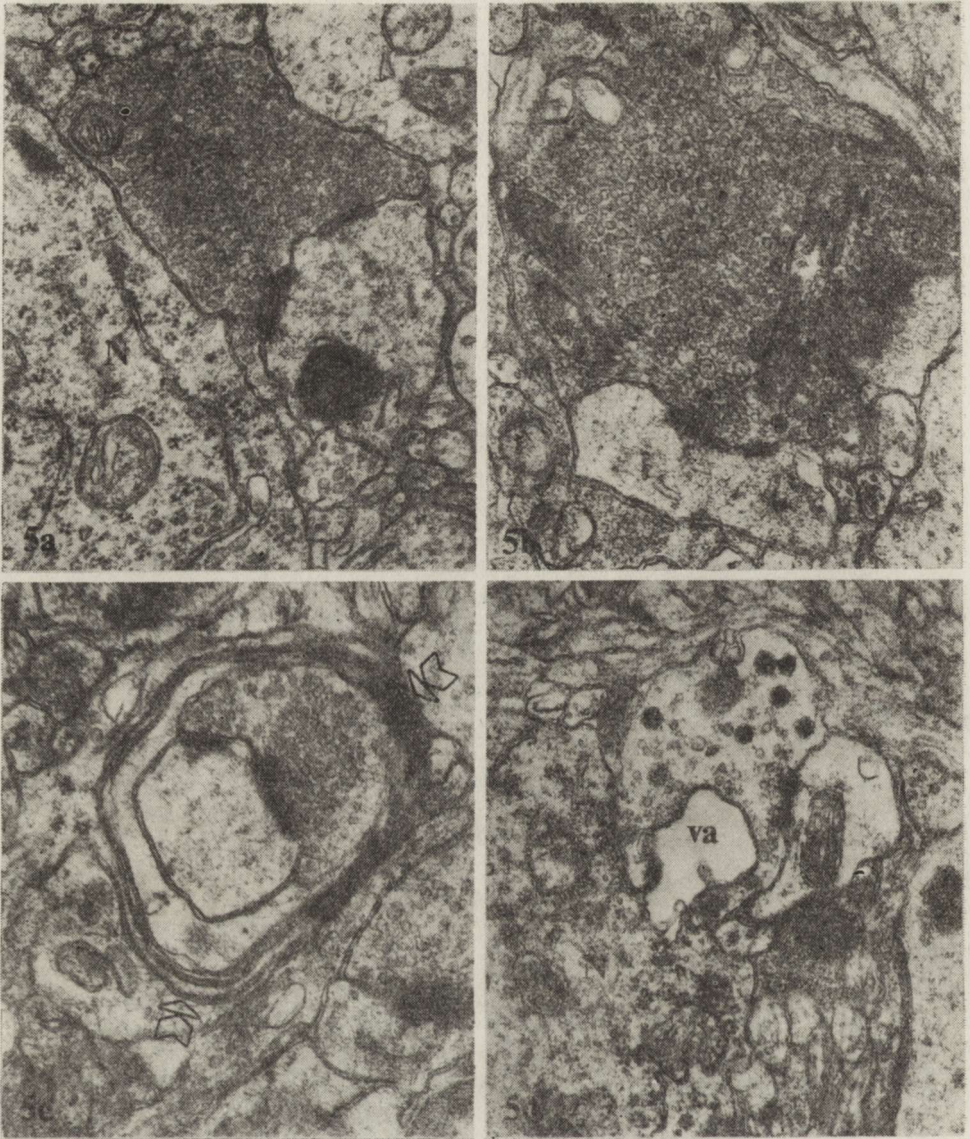
Ryc. 3a-b. Szczur odwadniany przez 4 dni. *3a.* SON. Fragment neuropilu przedstawia zmienione kolbki; w kolbce Bt₁ skupienie pęcherzyków i przejaśnienie aksoplazmy, w kolbce Bt₂ polimorfizm pęcherzyków i wakuolizacja obszaru presynaptycznego; D — dendryt z gęstą macierzą. Pow. 42 000 ×. *3b.* PVN. Fragment neuropilu przedstawia zmienione kolbki; w kolbce Bt₁ skupienie pęcherzyków i przejaśnienie aksoplazmy, w kolbce Bt₂ pleomorficzne pęcherzyki; D — dendryt z gęstą macierzą. Pow. 49 000 ×

Fig. 3a-b. Rat dehydrated for 4 days. *3a.* SON. Fragment of neuropile demonstrating some altered boutons; in Bt₁ bouton electron-lucent axoplasmic ground and clustered vesicles, in Bt₂ bouton pleomorphic vesicles and vacuolization of presynaptic area; D — dendrite with dense matrix. ×42 000. *3b.* PVN. Fragment of neuropile demonstrating some altered boutons; in Bt₁ bouton clustered vesicles, in Bt₂ bouton pleomorphic vesicles; D — dendrite with dense matrix. ×49 000



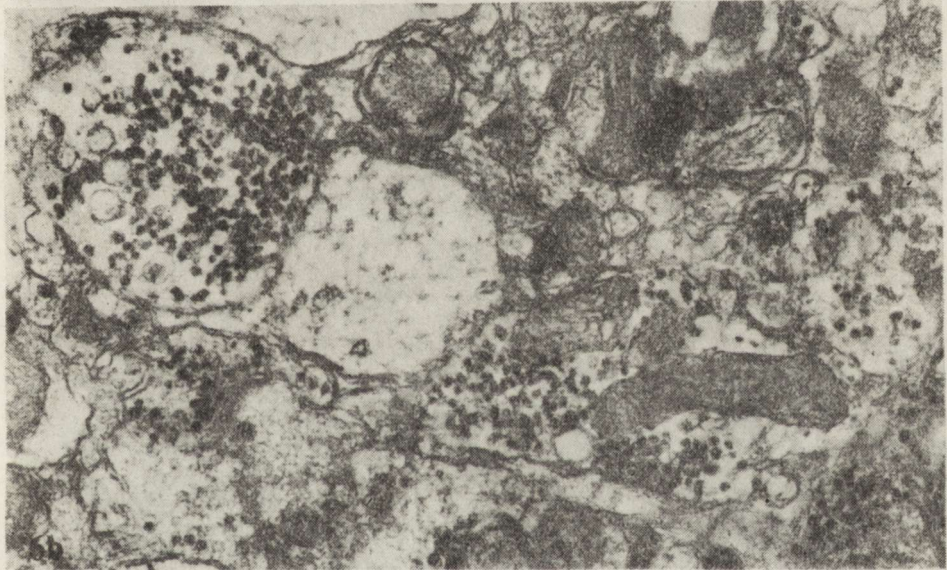
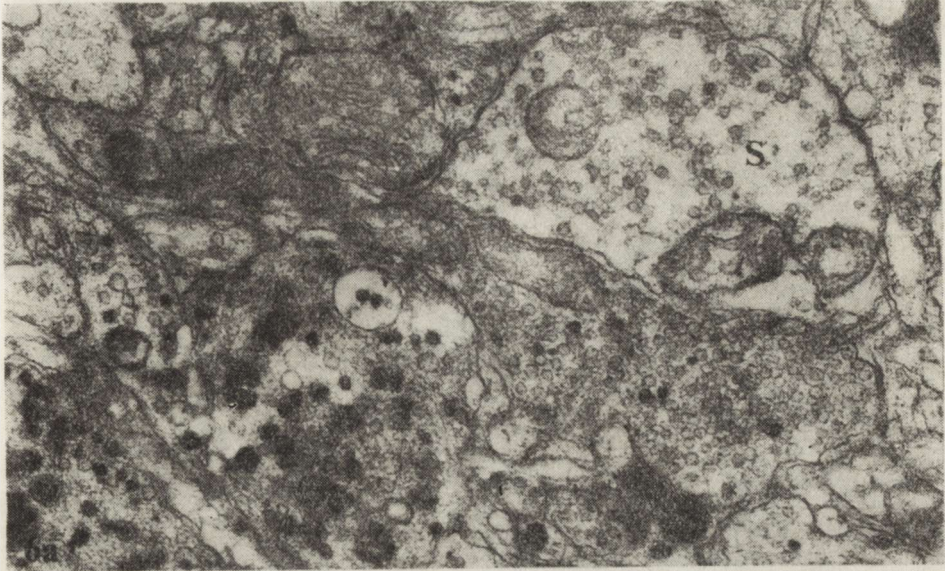
Ryc. 4a-d. Szczur odwadniany przez 4 dni. 4a. SON. ZIO-impregnowana kolbka typu S; N — neuron sekrecyjny. Pow. 42 000 \times . 4b. SON. Błazkowate pierścienie (strzałka) wokół ZIO-impregnowanego kompleksu aksodendrytycznego; N — neuron sekrecyjny. Pow. 27 000 \times . 4c. PVN. ZIO-impregnowana kolbka typu S w kontakcie z dendrytem (D). Pow. 33 000 \times . 4d. PVN. ZIO-impregnowana kolbka typu S w kontakcie z kolcami dendrytów (Sp); widoczne również zmienione włókna nerwowe, prawdopodobnie dendryty. Pow. 22 000 \times

Fig. 4a-d. Rat dehydrated for 4 days. 4a. SON. ZIO-stained S-type bouton; N — secretory neuron. \times 42 000. 4b. SON. Lamellar whorls (arrow) around ZIO-stained axo-dendritic complex; N — secretory neuron. \times 27 000. 4c. PVN. ZIO-stained S-type bouton synapsing on dendrite (D). \times 33 000. 4d. PVN. ZIO-stained S-type bouton contacting spine dendrites (Sp); altered nerve fibers, probably dendrites are also seen. \times 22 000



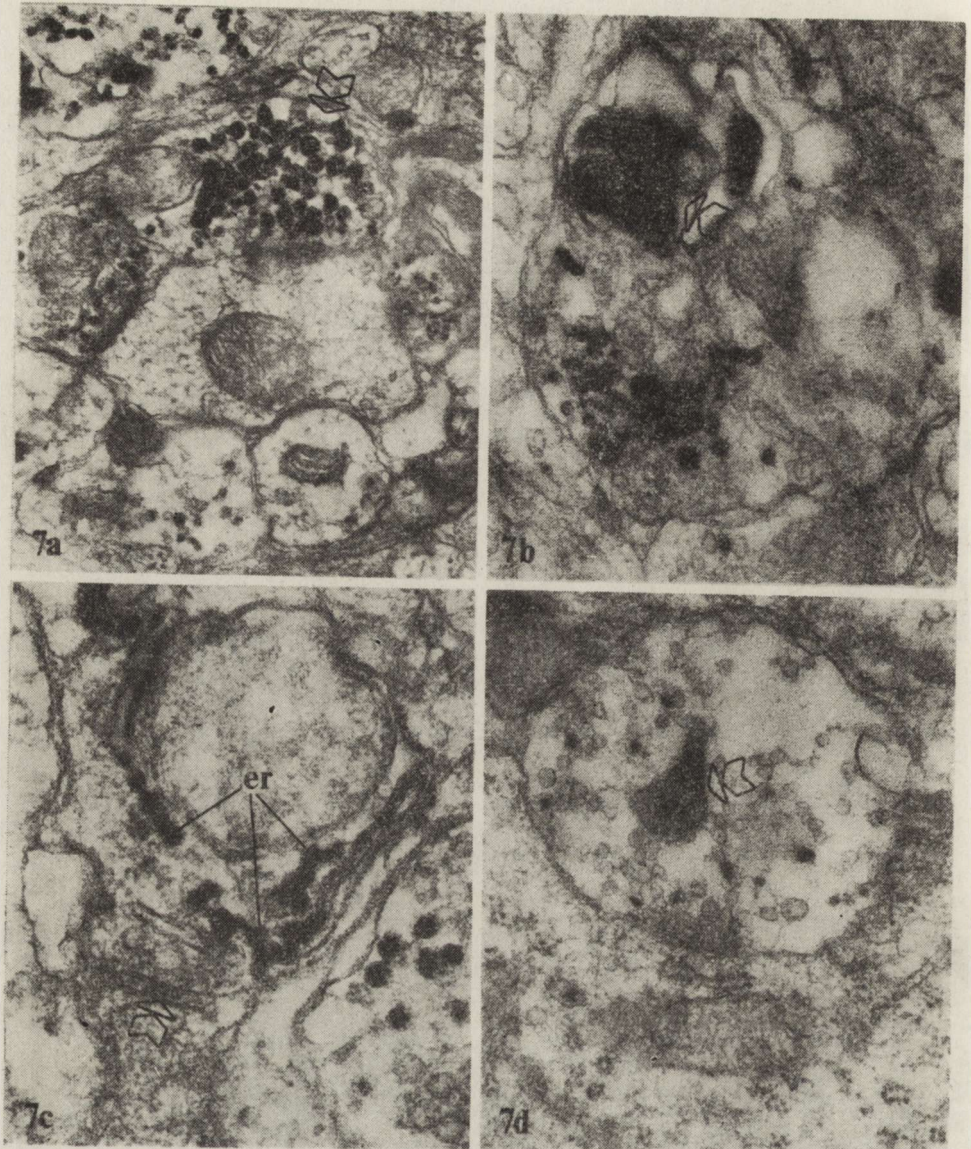
Ryc. 5a-d. Szczur odwadniany przez 12 dni. *5a.* SON. Obfitość pęcherzyków w kolbce typu S kontaktującej się z dendrytem; N — neuron sekrecyjny. Pow. 40 000 \times . *5b.* PVN. Obfitość pęcherzyków w kolbce typu S kontaktującej się z dendrytem. Pow. 39 000 \times . *5c.* SON. Blaszkowate pierścienie (strzałki) wokół akso-dendrytycznego kompleksu synaptycznego. Pow. 41 000 \times . *5d.* SON. We fragmencie neuronu sekrecyjnego (N) wakuola (va) wpukłona w kolbkę kontaktującą się z dendrytem. Pow. 40 000 \times

Fig. 5a-d. Rat dehydrated for 12 days. *5a.* SON. Abundance of vesicles in S-type bouton synapsing on dendrite; N — secretory neuron. $\times 40\,000$. *5b.* PVN. Abundance of vesicles in S-type bouton synapsing on dendrite. $\times 39\,000$. *5c.* SON. Lamellar whorls (arrows) around an axo-dendritic synaptic complex. $\times 41\,000$. *5d.* SON. Fragment of secretory neuron (N) exhibits vacuole (va) admitted into the bouton synapsing on dendrite. $\times 40\,000$



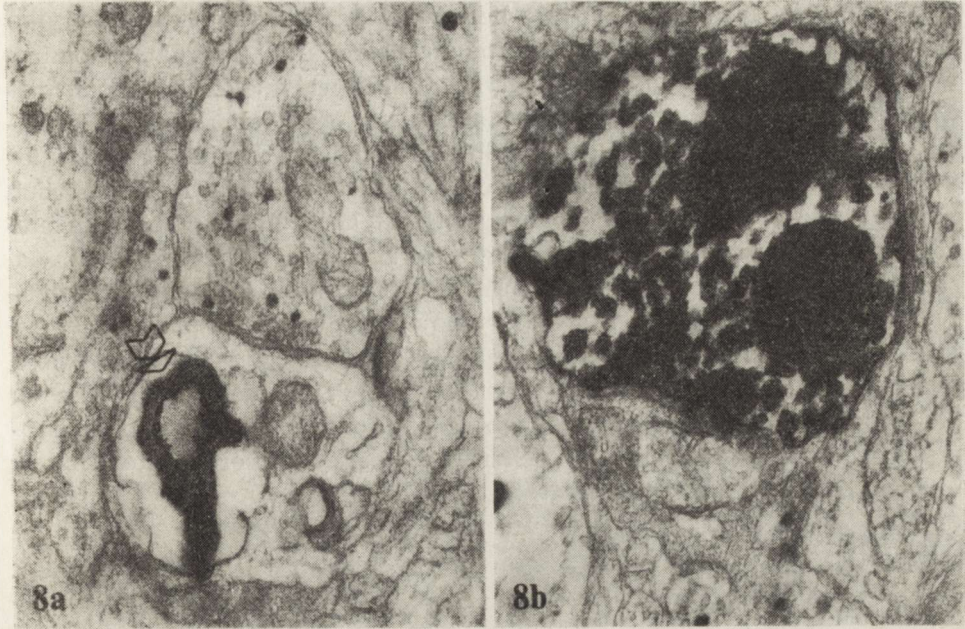
Ryc. 6a-b. Szczur odwadniany przez 12 dni. *6a.* SON. W kolbkach typu S (S) tylko nieliczne pęcherzyki ZIO-dodatnie; niektóre zmienione kolbki zawierają ZIO-reaktywne pleomorficzne pęcherzyki. Pow. 37 000 \times . *6b.* PVN. W kolbkach typu S liczne ZIO-dodatnie pęcherzyki. Pow. 36 000 \times .

Fig. 6a-b. Rat dehydrated for 12 days. *6a.* SON. In S-type boutons (S) only few vesicles contain ZIO-precipitate; some altered boutons exhibit ZIO-reactive pleomorphic vesicles. $\times 37\,000$. *6b.* PVN. In S-type boutons numerous ZIO-positive vesicles. $\times 36\,000$



Ryc. 7a-d. Szczur odwadniany przez 12 dni. 7a. PVN. Kilka kolbek w kontakcie z dendrytem; jedna z nich zawiera „balonowate” ZIO-dodatnie pęcherzyki (strzałka). Pow. 32 000 \times . 7b. SON. Zmieniona kolbka z ZIO-dodatnimi strukturami pęcherzykowymi i tubularnymi oraz z ZIO-reaktywnymi figurami mielinowymi (strzałka). Pow. 58 000 \times . 7c. PVN. Kolbka synaptyczna z ZIO-reaktywnymi elementami siateczki plazmatycznej (er); sc — szczelina międzysynaptyczna. Pow. 93 000 \times . 7d. SON. W kolbce typu S kontaktującej się z neuronem sekrecyjnym ZIO-reaktywna figura mielinowa (strzałka). Pow. 54 000 \times

Fig. 7a-d. Rat dehydrated for 12 days. 7a. PVN. A few boutons synapsing on dendrite; one of them contains ZIO-positive “balooning” vesicles (arrow). \times 32 000. 7b. SON. An altered bouton exhibits ZIO-positive vesicular and tubular structures, as well as the ZIO-reactive myelin-like figures (arrow). \times 58 000. 7c. PVN. Within synaptic bouton ZIO-reactive elements of axoplasmic reticulum (er); sc — subsynaptic cleft. \times 93 000. 7d. SON. ZIO-reactive myelin-like figures (arrow) within S-type bouton synapsing on secretory neuron. \times 54 000



Ryc. 8a-b. Szczur odwadniany przez 12 dni. 8a. SON. ZIO-reaktywna figura mielinowa (strzałka) w postsynaptycznym dendrycie. Pow. 40 000 \times . 8b. PVN. Intensywna ZIO-reaktywność wszystkich elementów cytoplazmatycznych stanowiących kolbkę synaptyczną typu S. Pow. 42 000 \times

Fig. 8a-b. Rat dehydrated for 12 days. 8a. SON. ZIO-reactive myelin-like figure (arrow) within postsynaptic dendrite. $\times 40\ 000$. 8b. PVN. Note intensive ZIO-reactivity of all elements constituting the S-type bouton. $\times 42\ 000$

pienia się pęcherzyków synaptycznych oraz ich polimorfizmu (ryc. 3a,b). Po zastosowaniu impregnacji ZIO niektóre pęcherzyki synaptyczne były ZIO-dodatnie. Jednakże zaobserwowano tu większą niż u szczurów kontrolnych zmienność pod względem liczby wybarwionych pęcherzyków synaptycznych w obrębie poszczególnych kolbek. Zjawisko to dotyczyło zarówno jądra SON, jak i PVN (ryc. 4a,b,c,d).

Szczury odwadniane przez 12 dni (grupa III)

W obu badanych jądrach kolbki synaptyczne często obfitowały w pęcherzyki synaptyczne. Obserwacje te dotyczyły przede wszystkim kolbek, które miały kontakt z dendrytami (ryc. 5a,b). Jednocześnie w obrębie jądra SON, obok synaps dobrze zachowanych, często obserwowano kompleksy synaptyczne, które charakteryzowały się nieprawidłowościami organizacji ultrastrukturalnej. Nieprawidłowości te to zewnętrznie umiejscowione i luźno ułożone blaszkowate pierścienie wokół akso-dendrytycznych kompleksów synaptycznych (ryc. 5c) lub wakuole związane z kolbkami synaptycznymi (ryc. 5d). Po zastosowaniu impregnacji ZIO stwierdzono niejednakową ZIO-reaktywność pęcherzyków synaptycznych typu S w jądrze SON i PVN. Pomimo że większość kolbek synap-

tycznych w jądrze SON zawierała liczne pęcherzyki synaptyczne, to tylko pojedyncze pęcherzyki wykazały produkt reakcji ZIO (ryc. 6a). Natomiast w jądrze PVN liczne kolbki synaptyczne obfitowały w ZIO-dodatnie pęcherzyki i pod tym względem podobne były do tych, które obserwowano u zwierząt kontrolnych (ryc. 6b). W obu jądrach niektóre zmienione kolbki synaptyczne charakteryzowały się obecnością ZIO-dodatnich struktur, których nie stwierdzono u zwierząt kontrolnych. Obserwowano mianowicie ZIO-dodatnie pleomorficzne struktury pęcherzykowe (ryc. 6a, 7a), ZIO-dodatnie struktury tubularne (ryc. 7b,c) oraz ZIO-dodatnie figury mielinowe (ryc. 7b,d), które występowały również w postsynaptycznych dendrytach (ryc. 8a). W jądrze PVN stwierdzono ponadto kolbki synaptyczne silnie reagujące z mieszaniną ZIO. W tych sporadycznych przypadkach cały element presynaptyczny, to znaczy: błona presynaptyczna i pozostała aksolemma, pęcherzyki synaptyczne oraz mitochondria były wybarwione (ryc. 8b).

Analiza ilościowa

Dane z badań morfometrycznych zostały przedstawione w formie graficznej (ryc. 9, 10, 11), natomiast większość wyników analizy statystycznej zestawiono w tabeli 1.

Pole profilu kolbki

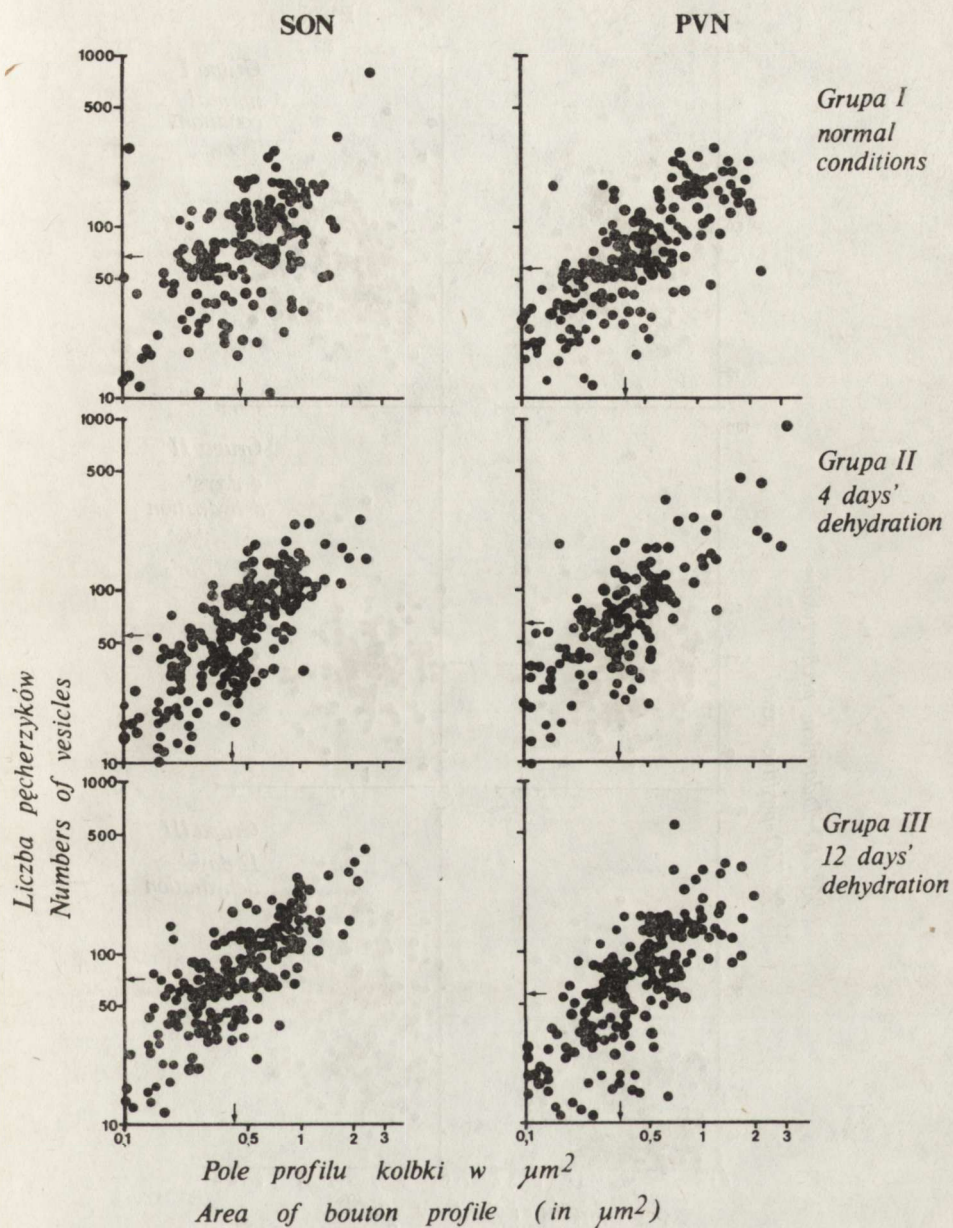
Dla jądra SON porównanie pod względem tej zmiennej wykazało, że różnice pomiędzy wszystkimi grupami, tzn. I i II ($p > 0,25$), II i III ($p > 0,975$) oraz I i III ($p > 0,1$), nie były znamienne. W przypadku jądra PVN porównanie pod względem tej zmiennej wykazało istotną różnicę pomiędzy grupą I i II ($p < 0,025$), natomiast nieistotną między grupami II i III ($p > 0,9$) oraz I i III ($p > 0,1$).

Z analizy statystycznej wynika również, że istotne różnice pomiędzy jądrem SON i PVN pod względem wielkości pola profilu kolbek synaptycznych typu S wystąpiły u szczurów odwadnianych przez 4 i 12 dni (grupa II i III), natomiast u szczurów kontrolnych (grupa I) jądra te nie różniły się pod względem tej cechy (Tab. 1).

Liczba pęcherzyków typu S w profilu kolbki

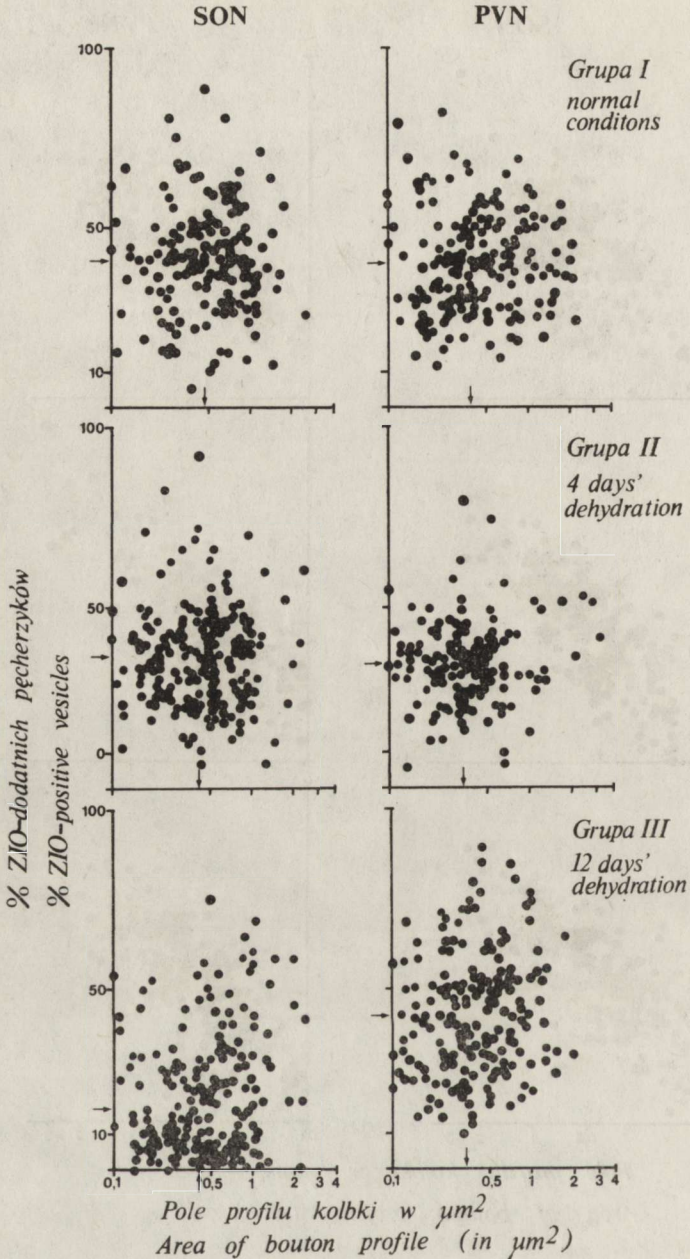
Dla jądra SON porównanie pod względem tej zmiennej wykazało istotne różnice pomiędzy grupami I i II ($p < 0,025$) oraz II i III ($p < 0,001$), natomiast pomiędzy grupą I i III ($p > 0,5$) różnice te nie były znamienne. W przypadku jądra PVN porównanie pod względem tej zmiennej wykazało, że różnice pomiędzy wszystkimi grupami tzn. I i II ($p > 0,25$), II i III ($p > 0,1$) oraz I i III ($p > 0,9$) nie były znamienne.

Z analizy statystycznej wynika również, że istotne różnice pomiędzy jądrem SON i PVN pod względem liczby pęcherzyków typu S wystąpiły



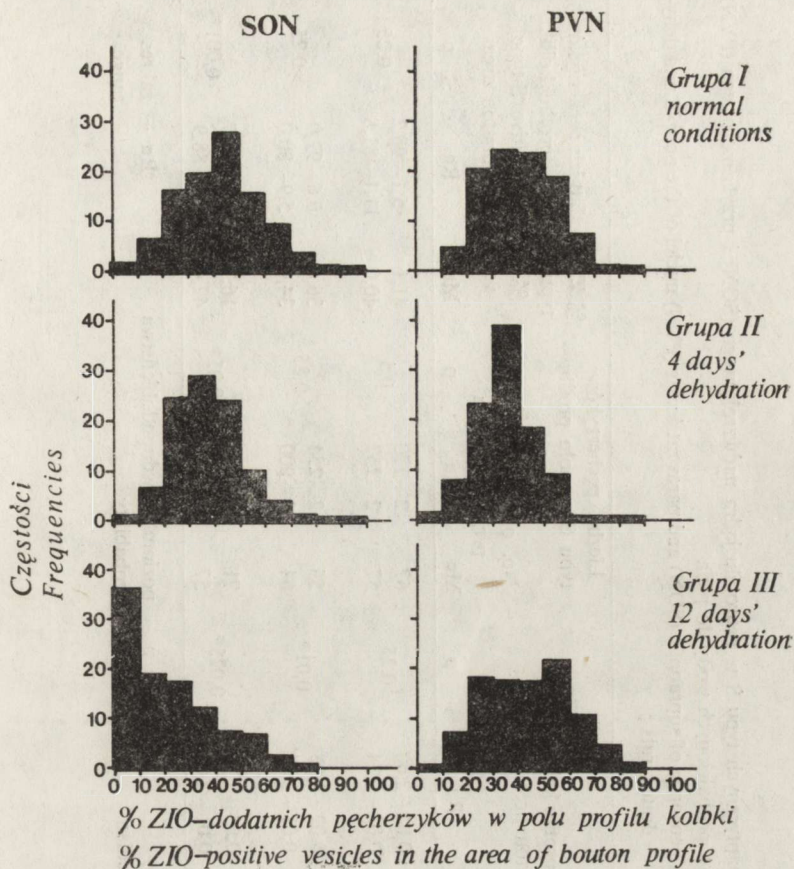
Ryc. 9. Rozkład punktów w diagramach wskazuje na związek pomiędzy polem profilu kolbki typu S i ogólną liczbą okrągłych pęcherzyków synaptycznych (suma ZIO-dodatnich i ZIO-ujemnych), w warunkach prawidłowych (grupa I), po 4 dniach odwodnienia (grupa II) i po 12 dniach odwodnienia (grupa III). Strzałki wskazują na odpowiednie wartości mediany omawianych zmiennych

Fig. 9. Scatter of the points in the diagrams indicates association between the area of the S-type bouton profiles and the total number of spheroid synaptic vesicles (amount ZIO-positive and ZIO-negative), in normal rats and rats dehydrated for 4 and 12 days. Arrows point to the positions of the median



Ryc. 10. Rozkład punktów w diagramach wskazuje brak wyraźnej współzależności pomiędzy polem profilu kolbki i względną liczbą (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych typu S, w warunkach prawidłowych (grupa I), po 4 dniach odwodnienia (grupa II) i po 12 dniach odwodnienia (grupa III). Strzałki wskazują na odpowiednie wartości mediany omawianych zmiennych

Fig. 10. Scatter of the points in the diagrams indicates that there is no relationship between the area of the bouton profiles and the relative number (%) of ZIO-positive S-type synaptic vesicles, in normal rats and rats dehydrated for 4 and 12 days. Arrows point to the positions of the median



Ryc. 11. Histogram częstości występowania kolbek typu S w zależności od względnej liczby (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych, w warunkach prawidłowych (grupa I), po 4 dniach odwodnienia (grupa II) i po 12 dniach odwodnienia (grupa III)

Fig. 11. Frequency distributions of the occurrence of S-type boutons in relation to percentages of ZIO-positive synaptic vesicles, in normal rats and rats dehydrated for 4 and 12 days

tylko u szczurów odwadnianych przez 12 dni (grupa III), natomiast u szczurów kontrolnych (grupa I) i odwadnianych przez 4 dni (grupa II) jądra te nie różniły się pod względem tej cechy (Tab. 1).

Względna liczba (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków typu S w profilu kolbki

Dla jądra SON porównanie pod względem tej zmiennej wykazało, że różnice pomiędzy wszystkimi grupami, tzn. I i II ($p < 0,01$), II i III ($p < 0,001$) oraz I i III ($p < 0,001$), były wysoce znamienne. Wynikało to z postępującego w przebiegu eksperymentu zmniejszania się liczby ZIO-reaktywnych pęcherzyków synaptycznych. W przypadku jądra PVN istotne różnice pod względem tej zmiennej stwierdzono pomiędzy gru-

Tabela 1. Porównawcza ocena ZIO-impregnowanych kolbek synaptycznych typu S w neuropilu jądra nadwzrokowego (SON) i przykomorowego (PVN) szczurów pozbawionych wody do picia

Table 1. Comparative evaluation of ZIO-stained S-type boutons in neuropile of supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei of the normal and dehydrated rats

Warunki Conditions	Jądro Nucleus	Pole profilu kolbki w μm^2 Bouton area in μm^2				Liczba pęcherzyków typu S w polu profilu kolbki No. of S-type vesicles per bouton area			% ZIO-dodatnich pęcherzyków typu S w polu profilu kolbki % of ZIO-positive S-type vesicles per bouton area		
		n	Me	Ra	p	Me	Ra	p	Me	Ra	p
Warunki prawidłowe Normal conditions	SON	176	0,47	0,02–2,60	0,25	67	2–770	0,5	41,1	5,1–98,2	0,25
	PVN	194	0,39	0,03–2,34		57	2–257		40,0	11,1–81,8	
Odwodnienie 4-dniowe 4 days' dehydration	SON	214	0,42	0,02–1,98	0,01*	55	2–254	0,25	36,6	6,6–92,0	0,25
	PVN	159	0,34	0,01–2,88		64	2–900		34,0	5,9–80,0	
Odwodnienie 12-dniowe 12 days' dehydration	SON	193	0,42	0,03–2,39	0,025*	71	3–401	0,05*	16,7	0,6–74,7	0,001*
	PVN	210	0,34	0,01–2,01		57	2–321		42,4	9,6–88,9	

n – liczba obserwacji
number of observations

Me – wartość mediany
value of the median

p – poziom prawdopodobieństwa
probability

Ra – zakres
range

* – istotnie różne, $p < 0,05$ (test Chi^2)
significantly different, $p < 0,05$ (Chi^2 test)

pami I i II ($p < 0,001$) oraz II i III ($p < 0,001$), natomiast różnice pomiędzy grupą I i III ($p > 0,2$) były nieistotne.

Z analizy statystycznej wynika również, że istotne różnice pomiędzy jądrem SON i PVN w zakresie wartości względnej liczby pęcherzyków ZIO-dodatnich wystąpiły tylko u szczurów odwadnianych przez 12 dni (grupa III), natomiast u szczurów kontrolnych (grupa I) i odwadnianych przez 4 dni (grupa II) jądra te nie różniły się pod względem tej cechy (Tab. 1).

Współzależność pomiędzy polem profilu kolbki i liczbą pęcherzyków synaptycznych typu S przedstawia rycina 9. Przy porównywaniu wszystkich badanych grup nie stwierdza się wyraźnej różnicy pod względem stopnia współzależności pomiędzy tymi zmiennymi, odnosi się nawet wrażenie, że współzależność ta jest w obrębie jądra SON wyraźniejsza w grupie II i III w porównaniu z kontrolą.

Na rycinie 10 przedstawiono związek pomiędzy polem profilu kolbki i względną liczbą (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych typu S. Rozkład punktów wskazuje, że we wszystkich badanych grupach (I, II i III) brak jest wyraźnej współzależności pomiędzy tymi zmiennymi.

Współzależność pomiędzy częstością występowania kolbek synaptycznych typu S i względną liczbą ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych w jądrze SON i PVN przedstawiono graficznie na rycinie 11. Obserwuje się różnice w rozkładach częstości pomiędzy grupami I, II i III zarówno w jądrze SON, jak i PVN. Dla zwierząt kontrolnych rozkład częstości zbliżony jest do normalnego, podczas gdy po 12 dniach odwodnienia w przypadku jądra SON rozkład ten staje się wyraźnie jednostronnie skośny; skośność rozkładu związana jest ze zwiększeniem względnej liczby kolbek synaptycznych, ubogich w ZIO-dodatnie pęcherzyki synaptyczne.

OMÓWIENIE

Wiadomo, że pozbawienie ssaków wody do picia (odwodnienie) pobudza ich neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy do zwiększonego wydzielania hormonów części nerwowej przysadki, a szczególnie wazopresyny. Komórki neurosekrecyjne tego układu zgrupowane w jądrze SON i PVN kontrolowane są nie tylko przez substancje chemiczne, które poprzez układ naczyniowy oddziałują na nie drogą sprzężenia zwrotnego, ale również poprzez ośrodki neuronalne znajdujące się w ośrodkowym układzie nerwowym (Schadé 1970; Ariëns Kappers 1972). Neurotransmitery uwalniane z presynaptycznych zakończeń nerwowych, podobnie jak i substancje chemiczne krążące we krwi, mogą oddziaływać hamująco lub pobudzająco na te komórki. Oshima i Gorbman (1969) uważają, że zakończenia synaptyczne w jądrze SON i PVN w większym

stopniu kontrolują procesy związane z uwalnianiem neurohormonów przysadkowych niż z ich syntezą. Według Findlay'a (1972) problem pośrednictwa neuronalnego w zjawisku neurosekrecji można rozpatrywać w odniesieniu do neurotransmiterów działających w tych obszarach podwzgórza lub też w stosunku do miejsc, od których biorą początek dochodzące do nich zakończenia synaptyczne.

Badania ultrastrukturalne kolbek synaptycznych w neuropilu jądra SON i PVN szczura wskazują na udział włókien monoaminoergicznych oraz cholinergicznycch w regulacji neuronów sekrecyjnych (Rechardt 1969; Morris 1974). Jak wykazały wyniki własnych badań, w obrębie obu jąder podwzgórza występują podobne pod względem budowy kolbki synaptyczne, które tworzą przede wszystkim synapsy akso-dendrytyczne i akso-somatyczne. Zwrócili już na to uwagę Enerström (1967), Rechardt (1969), Clementi i Ceccarelli (1970), Szentágothai i wsp. (1972) oraz Morris (1974). Chociaż szczegóły dotyczące połączeń pomiędzy wstępującymi i zstępującymi szlakami nerwowymi w obszarze jądra SON, a szczególnie PVN nie są dobrze poznane (Hayward 1972), badania Woodsa i wsp. (1966) wskazują jednakże, że u ssaków połączenia te uczestniczą w kontroli uwalniania wazopresyny. Według Dreifussa i Kelly'ego (1972a,b) zakończenia synaptyczne regulują częstotliwość wyładowań potencjałów czynnościowych neuronów sekrecyjnych, odpowiedzialnych za uwalnianie hormonów części nerwowej przysadki.

Według licznych autorów (Akert i wsp. 1971; Awood, Lang 1972; Birks 1974; Uchizono 1975; Reinecke, Walther 1978), charakterystycznymi objawami potwierdzającymi pobudzenie zakończeń synaptycznych są takie zjawiska morfologiczne, jak zmniejszenie liczby pęcherzyków synaptycznych oraz ich agregacja. Objawy takie zaobserwowano w badaniach własnych u szczurów pozbawionych wody do picia przez 4 dni szczególnie w neuropilu jądra SON, gdzie w sposób istotny zmniejszyła się w tym okresie liczba pęcherzyków typu S, jak też ich ZIO-reaktywność. Jednakże u szczurów pozbawionych wody do picia przez 12 dni liczba pęcherzyków typu S w kolbkach jądra SON nie różniła się od obserwowanej u zwierząt kontrolnych, podczas gdy ich ZIO-reaktywność uległa zmniejszeniu w jeszcze większym stopniu. Zjawisko to wydaje się wskazywać, że w tym okresie synapsy jądra SON są już mniej aktywne. Zmniejszenie się względnej liczby ZIO-dodatnich pęcherzyków nasuwa równocześnie przypuszczenie, że określone wartości stosunku liczby pęcherzyków wybarwionych do całkowitej liczby pęcherzyków synaptycznych typu S mogą odpowiadać określonym stanom aktywności zakończenia synaptycznego. Przy założeniu takiej hipotezy stwierdzono między innymi związek ilościowy pomiędzy ziarnistościami neurosekrecyjnymi i ZIO-dodatnimi mikropecherzykami w pobudzonych aksonach sekrecyjnych części nerwowej przysadki szczura (Loesch 1983).

W badaniach własnych zaobserwowano ponadto, że w stanie odwodnienia zwierząt występują w obrębie zakończeń synaptycznych zmiany o charakterze zwyrodnieniowym, w postaci zwiększonego polimorfizmu pęcherzyków synaptycznych, agregacji pęcherzyków, przejaśnienia lub wakuolizacji części aksoplazmy. Zmiany takie obserwowano również w zwyrodnieniu typu Wallera i po chemicznym uszkodzeniu zakończeń nerwowych (Akert, Sandri 1975), po przecięciu nerwu (Uchizono 1975) i w padacze audiogennej u myszy (Dymecki i wsp. 1977). Według Akerta i Sandri (1975) występowanie „balonowatych” ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych jest charakterystyczne dla procesów zwyrodnienia zakończenia nerwowego. W obecnej pracy stwierdzenie licznych zmieniowanych włókien nerwowych w obu jądrach podwzgórza może zatem wskazywać na zakłócenie kontroli synaptycznej tych obszarów podwzgórza i zakłócenie czynnościowe neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego szczurów pozbawionych wody do picia przez 12 dni.

Przeprowadzone w tej pracy badania ilościowe na ZIO-impregnowanych kolbkach synaptycznych typu S wykazały, że oba jądra podwzgórza zachowują się podobnie w zakresie ZIO-reaktywności pęcherzyków synaptycznych zarówno u zwierząt kontrolnych (grupa I), jak i zwierząt pozbawionych wody do picia przez 4 dni (grupa II). Natomiast u zwierząt pozbawionych wody do picia przez 12 dni (grupa III) jądra SON i PVN różnią się istotnie przy ocenie tego zjawiska. Zróznicowanie cytochemiczne (reakcja ZIO) zakończeń synaptycznych typu S w grupie III, czemu towarzyszy również zróznicowanie morfologiczne neuronów sekrecyjnych (Loesch 1981b), może nasuwać przypuszczenie, że w procesie odwadniania organizmu oba jądra podwzgórza kontrolowane są centralnie w niejednakowy sposób. W tym kontekście interesujące są spostrzeżenia Shute (1970), zgodnie z którymi u szczura, a także u kota i małpy acetylocholinoesteraza występuje w większych ilościach w obszarze jądra PVN niż SON. Niższa koncentracja enzymu w neuronach jądra SON stanowiła podstawę do wnioskowania, że te komórki sekrecyjne są bardziej wrażliwe na acetylocholinę (Lederis, Livingston 1969). Mogłoby to też wskazywać, że acetylocholina kontroluje uwalnianie wazopresyny w większym stopniu na poziomie podwzgórza niż części nerwowej przysadki (Shute 1970). W rzeczywistości jednak kontrola synaptyczna jądra SON i PVN wydaje się bardziej złożona poprzez fakt, że te obszary podwzgórza charakteryzują się różnorodnością występujących tam neurotransmiterów. Zagadnienie to było poruszane w poprzedniej publikacji (Loesch 1981a).

Stwierdzony w badaniach własnych spadek liczby ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych w jądrze SON szczurów po 12 dniach odwadniania jest być może związany z przebyłą fazą zwiększonej aktywności zakończeń synaptycznych typu S, wskazując przy tym na ich uczestnic-

two w procesie pobudzenia neuronów sekrecyjnych. W tym miejscu można postawić pytanie, czy ZIO-dodatnie pęcherzyki są włączane w proces przekąźnictwa synaptycznego i czy uwalniają specyficzny komponent chemiczny? Niestety, na podstawie przeprowadzonych badań odpowiedź na to pytanie nie jest możliwa. Co prawda Dymecki i wsp. (1977) oraz Walski (1977) przypuszczają, że zmniejszenie liczby ZIO-dodatnich pęcherzyków w obrębie kolbki synaptycznej związane jest ze zjawiskiem opróżniania pęcherzyków z substancji przekąźnikowej, z drugiej jednak strony, pomimo że produkt reakcji ZIO występuje w obrębie pęcherzyków synaptycznych, nie ma oczywistych dowodów na to, że jest on specyficznym markerem neurotransmitera (Akert, Sandri 1975).

Przedstawione powyżej badania ilościowe wykazały również, że we wszystkich grupach doświadczalnych (I, II i III) istnieje współzależność (korelacja dodatnia) pomiędzy polem profilu kolbek i liczbą pęcherzyków typu S. Jest zrozumiałe, że kolbki o większym profilu mogą pomieścić więcej pęcherzyków synaptycznych niż te o profilu mniejszym. Natomiast nie wiadomo, dlaczego brak jest takiej współzależności w odniesieniu do liczby ZIO-dodatnich pęcherzyków. Być może zróżnicowana w poszczególnych kolbkach ZIO-reaktywność pęcherzyków wiąże się — jak już wspomniano — ze stopniem aktywności danego zakończenia synaptycznego. W przypadku potwierdzenia tej tezy, brak ujednocnionej reakcji ZIO pęcherzyków synaptycznych również należałoby łączyć z faktem, że badane profile kolbek stanowiły niejednorodną grupę ze względu na rodzaj powiązania z elementem postsynaptycznym. Wydaje się zatem, że bardziej precyzyjne określenie możliwej korelacji pomiędzy ZIO-reaktywnością pęcherzyków synaptycznych a aktywnością danego zakończenia synaptycznego, można uzyskać poprzez wzajemne porównanie połączeń akso-dendrytycznych i akso-somatycznych, występujących powszechnie w jądrze SON i PVN szczura.

Podkreślenia wymaga fakt, że pomimo potraktowania w obecnej pracy zakończeń synaptycznych typu S jako grupy jednolitej (bez uwzględnienia typu powiązania z elementem postsynaptycznym), analiza ilościowa wykazała istotne różnice pomiędzy jądrem SON i PVN szczura odwodnionego. Należy również dodać, że analiza ta nie obejmowała zakończeń synaptycznych typu F (ze spłaszczonymi pęcherzykami synaptycznymi), celowo pominiętych ze względu na ich prawdopodobnie odmienny charakter czynnościowy (Uchizono 1965). Na marginesie wskazać należy, że ten typ zakończeń synaptycznych zgodnie z własnymi obserwacjami (dane nieopublikowane) wydaje się w przebiegu tego eksperymentu być bardziej stabilny w zakresie ZIO-reaktywności pęcherzyków synaptycznych. Obserwacje te są zgodne ze spostrzeżeniami Walskiego (informacja ustna) poczynionymi podczas badań innych obszarów ośrodkowego układu nerwowego myszy i szczura w odmiennym modelu doświadczalnym.

Barwienie ZIO pozwoliło lepiej uwidocznić przebieg zmian morfologicznych w kolbkach synaptycznych, w warunkach postępującego odwodnienia organizmu. Ponadto stwierdzono różnorodność struktur cytoplazmatycznych wybarwionych produktem reakcji ZIO, co było szczególnie wyraźne w okresie zaburzeń wywołanych stanem przewlekłego odwodnienia (grupa III). Fakt ten potwierdza pogląd, że produkt tej reakcji nie jest swoistym markerem jednej określonej organelli komórkowej (Akert, Sandri 1975). Jedną z najnowszych hipotez dotycząca swoistości reakcji ZIO zakłada, że powstanie precypitatu ZIO związane jest z miejscami obfitującymi w dwuwartościowe jony wapnia (Gilloteaux, Naud 1979). W odniesieniu do układu nerwowego hipoteza ta jest szczególnie interesująca, gdyż odpowiednie stężenie jonów Ca^{2+} w tkance nerwowej jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania przekaźnictwa synaptycznego.

WNIOSKI

Podczas doświadczalnego odwodnienia szczurów (wywołanego pozbawieniem zwierząt wody do picia) zastosowanie metody ZIO do badań kolbek synaptycznych typu S w jądrze SON i PVN pozwoliło na przeprowadzenie porównania pomiędzy ilością pęcherzyków synaptycznych o różnym powinowactwie do cynku, jodu i osmu oraz różnymi stanami aktywności neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo przysadkowego. Jednocześnie, znamienne zróżnicowanie cytochemiczne (reakcja ZIO) kolbek synaptycznych typu S w jądrze SON może wskazywać, że w przedstawionym modelu doświadczalnym to właśnie jądro podwzgórza odgrywa istotną rolę związaną z czynnością układu neurosekrecyjnego. Ponadto, zastosowanie metody ZIO umożliwiło lepszą obserwację zmian ultrastrukturalnych, szczególnie o charakterze zwyrodnieniowym, w obu badanych jądrach podwzgórza.

ZIO-ИМПРЕГНИРОВАННЫЕ СИНАПТИЧЕСКИЕ КОЛБОЧКИ В НЕВРОПИЛЕ НАДЗРИТЕЛЬНОГО И ОКОЛОЖЕЛУДОЧКОВОГО ЯДРА КРЫСЫ ЛИШЕННОЙ ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ

Резюме

Были исследованы синаптические окончания типа-S в надзрительном (SON) и околожелудочковом ядре (PVN) крыс лишенных питьевой воды в течение 4 и 12 дней. В исследованиях динамики изменений в синаптических колбочках был применен метод ZIO. Результаты количественных исследований показали, что в условиях дегидратации организма такие величины как поле профиля колбочки, число синаптических пузырьков в поле профиля колбочки, а также относительное число (%) ZIO-положительных пузырьков типа-S в поле профиля колбочки подвергаются изменению и дифференцируют оба ядра гипоталамуса. Импрегнация ZIO сделала возможным кроме того лучшее обнаружение некоторых цитоплазматических элементов в дегенерированных синаптических колбочках, которые констатировано

в обоих ядрах гипоталамуса по истечении 12 дней дегидратации. Как результаты описательных, так и количественных исследований указывают на активное участие синаптических окончаний типа-S, особенно в ядре SON, в процессах сопутствующих усиленной нейросекреторной функции гипоталамо-гипофизарной системы в условиях дегидратации организма.

ZIO-STAINED SYNAPTIC BOUTONS IN NEUROPILE OF SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI OF NORMAL AND DEHYDRATED RATS

Summary

Ultrastructural studies of S-type synaptic boutons in supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei were carried out on samples of normal and dehydrated rats (after 4 and 12 days of drinking water deprivation). Observation of the dynamics of changes in the boutons was facilitated by introducing the ZIO-staining technique. It was found that the ZIO reaction product stains synaptic vesicles (normal rats) and pleomorphic ones including "ballooning" vesicles, tubular elements of axoplasmic reticulum and myelin-like structures (dehydrated rats). Quantitative data are also presented. They indicate that in normal conditions there was no difference between SON and PVN nuclei as regards the relative number (%) of ZIO-reactive S-type vesicles per area of sectioned profiles of the boutons. While, in rats dehydrated for 4 days, in both these nuclei a decrease in the relative number of ZIO-reactive vesicles was noticeable, the decrease in the total number of S-type vesicles was confined to the SON nucleus. On the other hand, in rats dehydrated for 12 days, in the SON nucleus a further considerable decrease of the ZIO-positive vesicles was noted with the total number of S-type vesicles within normal limits. At the same time, in the PVN nucleus the values of these two variables were within normal limits. Thus, a possible relationship between the relative number of ZIO-positive vesicles and the state of functional activity of the S-type synaptic boutons is suggested. Moreover, in normal rats and rats dehydrated for 4 and 12 days the relationship between the surface area of the sectioned profiles of the boutons and the total number of S-type vesicles indicates a correlation between these two variables, while there is no close relationship between the bouton area and the relative number of ZIO-reactive S-type vesicles.

By the fact that this paper did not concern the problem of different relationships of S-type boutons within the nuclei, therefore the obtained results dealing with this topic ought to be completed in the future.

PIŚMIENICTWO

1. Akert K., Sandri C.: Significance of the Maillet method for cytochemical studies of synapses. W: Golgi Centennial Symposium, Proceedings. Red. M. Santini, Raven Press, New York 1975, 387—399.
2. Akert K., Kawana E., Sandri C.: ZIO-positive and ZIO-negative vesicles in nerve terminals. *Progr. Brain Res.*, 1971, 34, 305—317.
3. Ariëns Kappers J.: Introduction. *Progr. Brain Res.*, 1972, 38, 1—16.
4. Awood H. L., Lang F.: Synaptic vesicles; selective depletion in crayfish excitatory and inhibitory axons. *Science*, 1972, 176, 1353—1355.
5. Birks R. I.: The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J. Neurocytol.*, 1974, 3, 133—160.

6. Bodian D.: Electron microscopy: two major synaptic types of spinal motoneurons. *Science*, 1966, 152, 1093—1094.
7. Clementi F., Ceccarelli B.: The fine structure of rat hypothalamic nuclei. W: *The Hypothalamus*. Red. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini, Academic Press, New York 1970, 17—44.
8. Dreifuss J. J., Kelly J. S.: Recurrent inhibition of antidromically identified rat supraoptic neurones. *J. Physiol. (London)*, 1972a, 220, 87—103.
9. Dreifuss J. J., Kelly J. S.: The activity of identified supraoptic neurones and their response to acetylcholine applied by iontophoresis. *J. Physiol. (London)*, 1972b, 220, 105—118.
10. Dymecki J., Karwacka H., Walski M.: Dynamics of synaptic changes in experimental audiogenic epilepsy. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1977, 27, 81—88.
11. Eneström S.: Nucleus supraopticus. A morphological and experimental study in the rat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Suppl.* 1967, 186, 1—99.
12. Findlay A. L. R.: Hypothalamic inputs: methods and five examples. *Progr. Brain Res.*, 1972, 38, 163—191.
13. Gilloteaux J., Naud J.: The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of Maillet. Nature of the precipitate studied by X-ray microanalysis and detection of Ca^{2+} -affinity subcellular sites in a tonic smooth muscle. *Histochemistry*, 1979, 63, 227—243.
14. Hayward J. N.: Hypothalamic input to supraoptic neurones. *Progr. Brain Res.*, 1972, 38, 145—161.
15. Kawana E., Akert K., Sandri C.: Zinc iodide-osmium tetroxide impregnation of nerve terminals in the spinal cord. *Brain Res.*, 1969, 16, 325—331.
16. Lederis K., Livingston A.: Acetylcholine and related enzymes in the neural lobe and anterior hypothalamus of the rabbit. *J. Physiol. (London)*, 1969, 201, 695—709.
17. Loesch A.: ZIO-impregnated boutons in neuropile of supraoptic and paraventricular nuclei of the rat. *Neuropat. Pol.*, 1981a, 19, 157—174.
18. Loesch A.: An electron-microscopic study of the secretory neurones of the supraoptic and paraventricular nuclei in water deprived rats. *Neuropat. Pol.*, 1981b, 19, 487—510.
19. Loesch A.: The neurohypophysial axons in normal and dehydrated rats: an electron microscopic study including ZIO-staining method. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983, 61, 321—338.
20. Morris J. F.: A quantitative analysis of synaptic terminals in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *J. Anat. Proc.*, 1974, 117, 213.
21. Oshima K., Gorbman A.: Pars intermedia: unitary electrical activity regulated by light. *Science*, 1969, 163, 195—197.
22. Rechartdt L.: Electron microscopic and histochemical observations of the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Acta Physiol. Scand., Suppl.*, 1969, 329, 1—79.
23. Reinecke M., Walther C.: Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. *J. Cell Biol.*, 1978, 78, 839—855.
24. Schadé J. P.: A system analysis of some hypothalamic function. W: *The Hypothalamus*. Red. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini, Academic Press, New York 1970, 69—82.
25. Shute C. C. D.: Distribution of cholinesterase and cholinergic pathways. W: *The Hypothalamus*. Red. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini, Academic Press, New York 1970, 167—179.
26. Szentágothai J., Flerkó B., Mess B., Halász B.: Hypothalamic control of the

- anterior pituitary: An experimental-morphological study. Akadémiai Kiadó, Budapest 1972.
27. Uchizono K.: Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 1965, 207, 642—643.
 28. Uchizono K.: Excitation and inhibition: synaptic morphology. Igaku Shoin, Tokyo 1975.
 29. Walski M.: Electron microscopic investigations on the synapses of the hippocampal region of the rats with audiogenic epileptic seizures by the zinc iodide-osmium method. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 193—207.
 30. Woods J. W., Bard P., Bleier R.: Functional capacity of the deafferented hypothalamus: water balance and response to osmotic stimuli in the decerebrate cat and rat. *J. Neurophysiol.*, 1966, 29, 751—767.

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

JERZY DYMECKI, ELŻBIETA MEDYŃSKA, MICHAŁ WALSKI

INFLUENCE OF THE METHOD OF SACRIFICING EXPERIMENTAL
ANIMALS ON THE MOTOR CORTEX SYNAPSES PATTERN.
MORPHOMETRIC EVALUATION *

Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, Warszawa,
Institute of Biostructure, School of Medicine, Warszawa

In the course of studies on the dynamic changes occurring in the synapses as the result of epileptic seizures in mice, it became necessary to find such a way of sacrificing the experimental animals which, on the one hand, would reveal the current functional state of the synapse at any chosen moment of the experiment, and on the other, would ensure possibly best fixation of the material. The number of synaptic vesicles in the axon terminals is the morphological exponent of the state of excitation of the neuron. Under the influence of neuron excitation their number diminishes significantly (Birks 1974). It is known that the transmitter substance contained in the synaptic vesicles is released at the moment of neuron excitation into the synaptic cleft (Heuser, Reese 1973; Uchizono 1975). Visualisation of the transmitter substance in the synaptic vesicles is possible, owing to application of the zinc-iodide-osmium tetroxide (ZIO) method (Kawana et al. 1969). At the moment of excitation of the neuron due to an epileptic seizure the number of synaptic vesicles impregnated with zinc-iodide (ZIO-positive), that is containing the neurotransmitter, decreases considerably (Dymecki et al. 1981).

Synaptic transmission is a very rapid process. Investigation of its particular phases and of the dynamics of changes requires an extremely quick and efficient technique of animals killing as well as immediate fixation of the material, in order to arrest the rapidly progressing functional changes in the synapse.

* Paper presented at the Polish-Scandinavian Neuropathological Symposium, Szczecin, 14—16 May, 1981

Therefore, the aim of the present study was the comparison of various methods of sacrificing animals, in order to evaluate their suitability for investigations of the dynamics of changes in the CNS synapses.

MATERIAL AND METHODS

The material comprised 10 mice of the Swiss Albino Rb strain. They were divided into experimental groups according to the applied method of killing.

Group A — the animals were anaesthetised with Nembutal injected intraperitoneally in a dose of 20 mg/kg body weight, and after opening the chest, the fixative was introduced into the left heart ventricle (Karnovsky 1965) under constant pressure of 80 mm Hg. After 10 min the brain was removed from the skull and fixation by immersion in the same fixative was continued for about 2 h.

Group B — the animals were anaesthetised with Nembutal in the same dose as in group A, then they were rapidly decapitated with shears, the brain was removed and fixed by immersion in Karnovsky's fixative for 2 h.

Group C — the animals were kept in the laboratory room for two weeks before the experiment to become familiar with the surroundings, personnel and the instruments used. They were sacrificed by rapid decapitation and the procedure was the same as in group B.

Group D — the animals were not anaesthetised or made familiar with the premises and they were rapidly decapitated. The further procedure was the same as in groups B and C.

The fifth group consisted of animals killed by sudden throwing into liquid nitrogen. The frozen brain was removed from the skull and fixed by immersion in Karnovsky's fixative at 4°C. This material, however, owing to the destruction of the brain tissue could not be used for obtaining technically correct electronmicrographs and for morphometric analyses.

For electron-microscopic examination material was taken from the motor cortex, impregnated according to the ZIO-technique (Kawana et al. 1969) and routinely processed before embedding in Epon 812. It was examined in a JEM 7A electron microscope.

For each group about 60 electronmicrographs of cholinergic synapses were prepared in a final magnification of 123 000. The results were statistically elaborated by Student's *t* test.

Morphometric analysis comprised: calculation of the total number of synaptic vesicles per 1 μm^2 of bouton cross section surface area with particular attention to the number of ZIO-positive and ZIO-negative synaptic vesicles.

Before undertaking the calculations, the surface area of the particular synapses was evaluated by the planimetric method.

RESULTS

Ultrastructural evaluation

The method of fixation by perfusion gave the technically best pictures of the brain tissue. No features of swelling were observed and the membranous structures were well preserved. Material obtained by the method of decapitation with subsequent immersion fixation gave also technically good electronmicrographs. However, in some places widening of the intercellular spaces was noted. The membranes of mitochondria, synaptic boutons and vesicles were well preserved.

Group A. The electronmicrographs of synapses from animals, treated by perfusion under Nembutal anesthesia, showed well preserved synaptic and vesicular membranes. The boutons were filled with numerous synaptic vesicles, containing the product of ZIO-reaction (Fig. 1).

Group B. The ultrastructural picture of the synaptic boutons from animals decapitated under Nembutal anesthesia the brains of which were fixed by immersion showed relatively well, preserved synaptic mitochon-

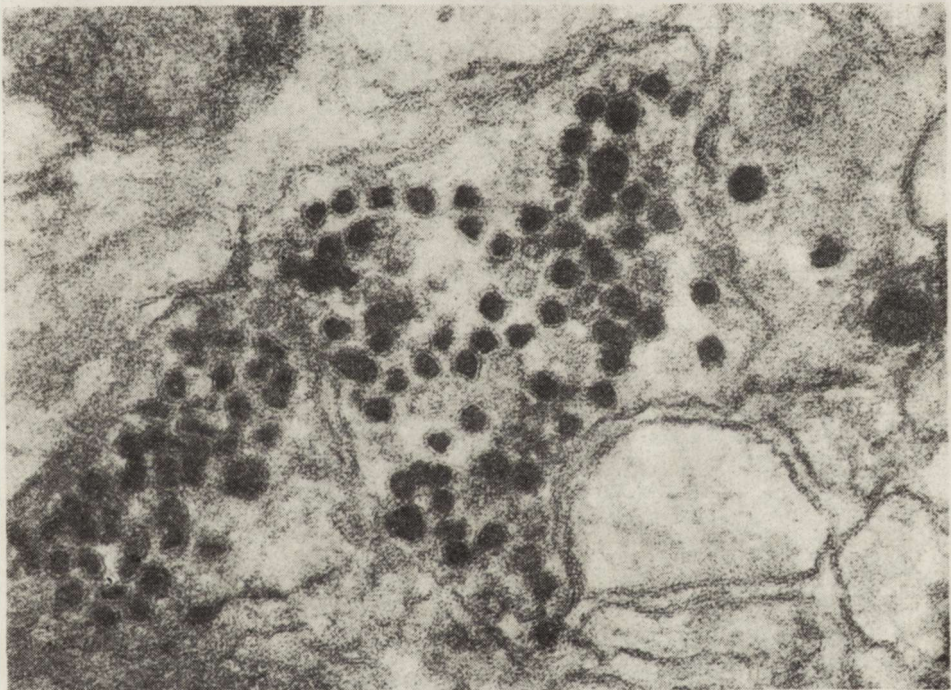
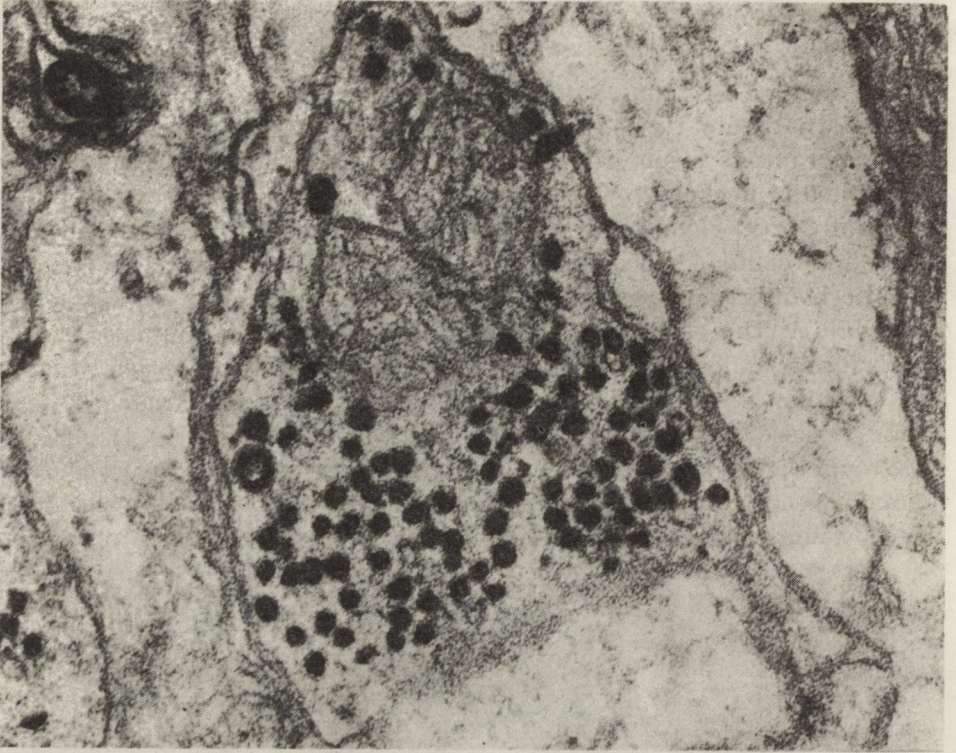
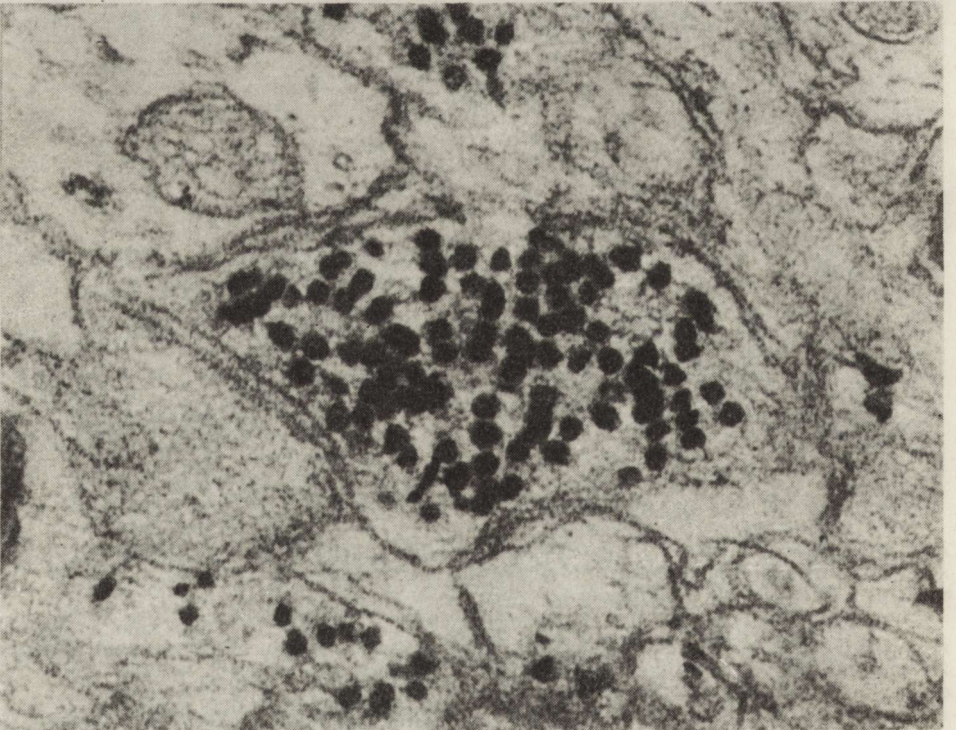


Fig. 1. Group A — animals perfused under Nembutal anesthesia. Well preserved synaptic and vesicular membranes. Bouton filled with synaptic mostly ZIO-positive vesicles. $\times 123\,000$. (All the electronmicrographs represent material from the mouse motor cortex. Impregnation by zinc-iodide-osmium tetroxide — ZIO-method)

Ryc. 1. Grupa A — zwierzęta perfundowane w narkozie nembutalowej. Dobrze zachowane błony synaptyczne i pęcherzykowe. Wnętrze kolbki wypełnione pęcherzykami głównie ZIO-dodatnimi. Pow. $123\,000 \times$. (Wszystkie mikrografie pochodzą z kory ruchowej myszy. Impregnacja cynkowo-jodowo-osmowa — ZIO)



2



3

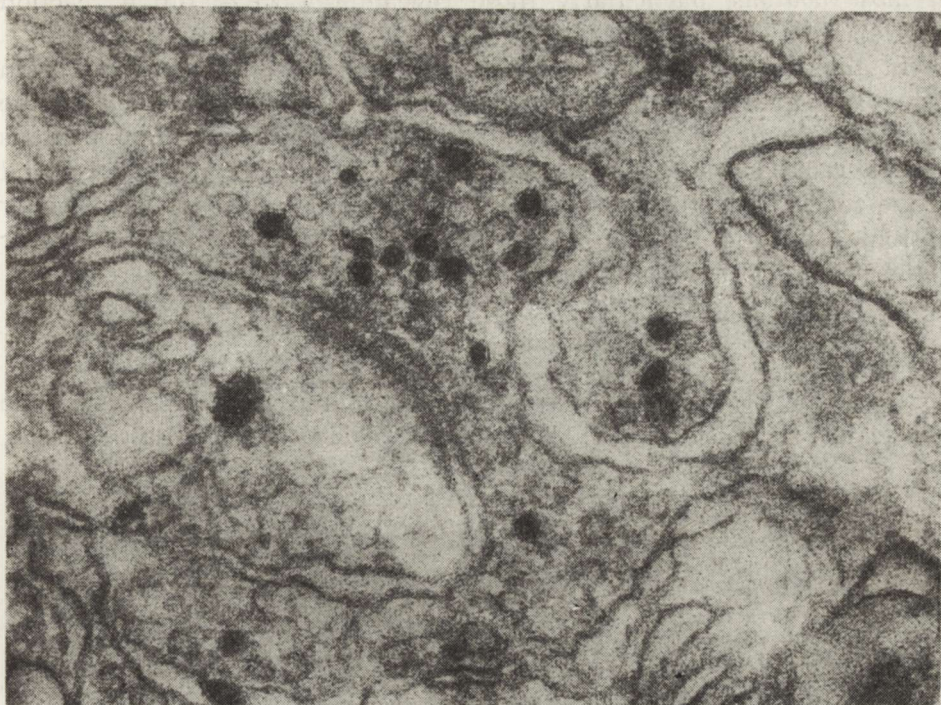


Fig. 4. Group D — animals decapitated without anesthesia or previous taming. In synaptic bouton scarce ZIO-positive vesicles. $\times 120\ 000$

Ryc. 4. Grupa D — zwierzęta dekapitowane bez uprzedniego uśpienia lub oswojenia. W obrębie kolbki synaptycznej bardzo nieliczne pęcherzyki ZIO-dodatnie. Pow. $120\ 000 \times$

drial and vesicular membranes though somewhat worse, than after perfusion. In the boutons a large number of synaptic, mostly ZIO-positive vesicles, could be seen (Fig. 2).

Group C. The electronmicrographs of synapses in the group of animals which became habituated before the experiments, and then decapitated, showed rather well preserved synaptic and vesicular membranes. Within the boutons a large number of synaptic vesicles, mostly ZIO-positive, were visible (Fig. 3).

Group D. In the material of animals decapitated without previous anesthesia or taming a much smaller number of vesicles could be seen

Fig. 2. Group B — animals decapitated under Nembutal anesthesia. Rather well preserved synaptic and mitochondrial membranes. Large number of synaptic vesicles in bouton, particularly of ZIO-positive ones. $\times 120\ 000$

Ryc. 2. Grupa B — zwierzęta dekapitowane w narkozie nembotalowej. Dostyc dobrze zachowane błony synaptyczne i mitochondrialne. W obrębie kolbki duża liczba pęcherzyków synaptycznych, zwłaszcza ZIO-dodatnich. Pow. $120\ 000 \times$

Fig. 3. Group C — animals decapitated after familiarisation with surroundings. Bouton filled with synaptic vesicles containing product of ZIO-reaction. $\times 123\ 000$

Ryc. 3. Grupa C — zwierzęta dekapitowane po oswojeniu z otoczeniem. Kolbka wypełniona pęcherzykami synaptycznymi zawierającymi produkt reakcji z jodkiem cynku. Pow. $123\ 000 \times$

in most boutons, particularly those revealing a ZIO-positive reaction (Fig. 4).

In the material from animals frozen in liquid nitrogen the brain tissue was greatly destroyed; there was considerable widening of the spaces between the membranes and swelling of the synaptic boutons with a relatively well preserved structure of the synaptic clefts and active zones. The products of reaction with zinc-iodide was visible only in some synaptic vesicles with somewhat enlarged dimensions. Clear vesicles were greatly enlarged and sometimes destroyed (Fig. 5).

Morphometric analysis

Morphometric analysis showed that the total number of synaptic vesicles per $1 \mu\text{m}^2$ of bouton cross section surface area in the groups A,

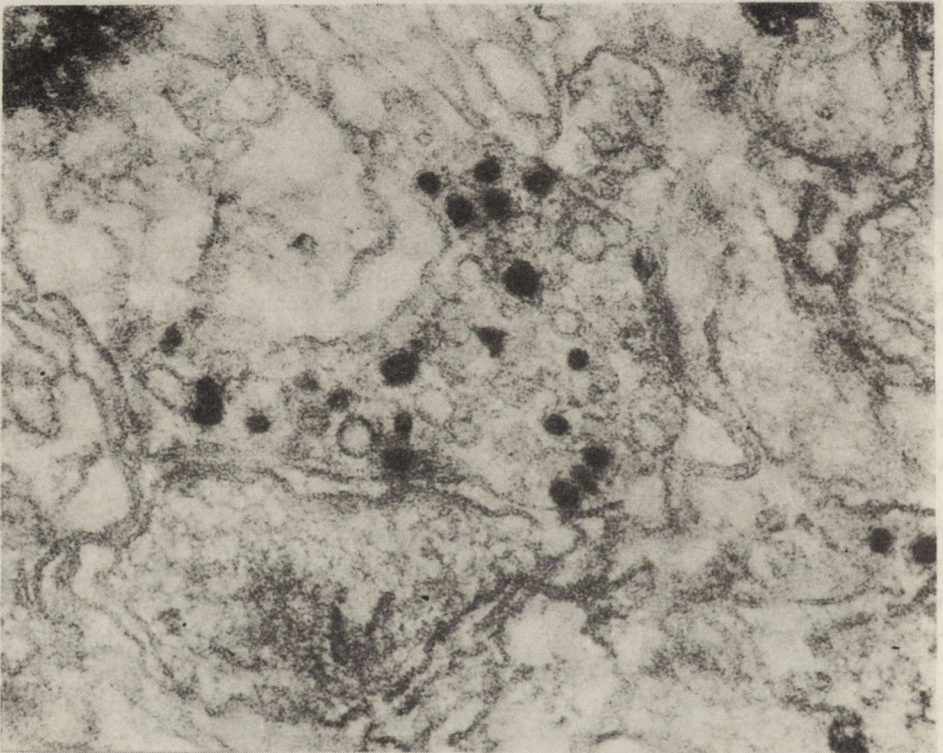


Fig. 5. Synapses of animals frozen in liquid nitrogen. Structure of synaptic bouton relatively well preserved in contrast to surrounding tissue where marked widening of spaces between membranes and their impairment are seen. Destruction of synaptic vesicles and their considerable enlargement should be noted. Small number of ZIO-positive vesicles. $\times 123\ 000$

Ryc. 5. Synapsy zwierząt zamrożonych w ciekłym azocie. Struktura kolbki synaptycznej stosunkowo dobrze zachowana, w przeciwieństwie do tkanki otaczającej, gdzie widać znaczne poszerzenie przestrzeni między błonami i uszkodzenie błon. Widoczna destrukcja pęcherzyków synaptycznych i znaczne powiększenie ich rozmiarów. Niewielka liczba pęcherzyków ZIO-dodatnich. Pow. $123\ 000 \times$

TOTAL NUMBER OF SYNAPTIC VESICLES PER $1\mu\text{m}^2$ OF SYNAPTIC SECTION AREA (\pm SEM)

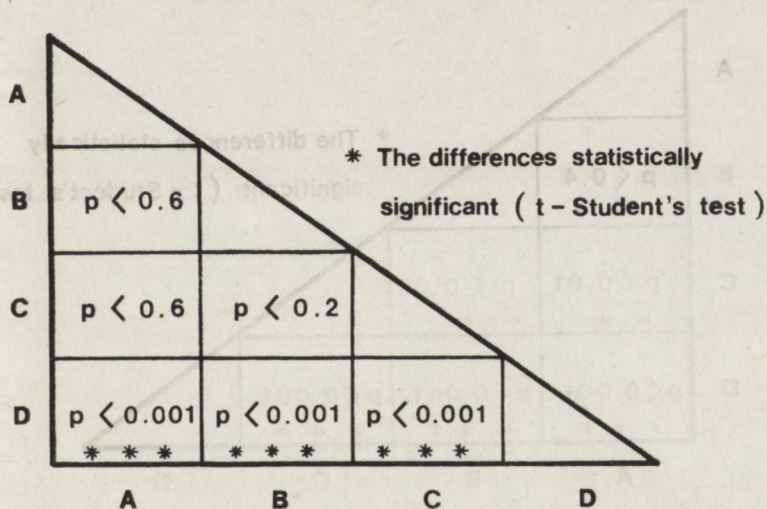
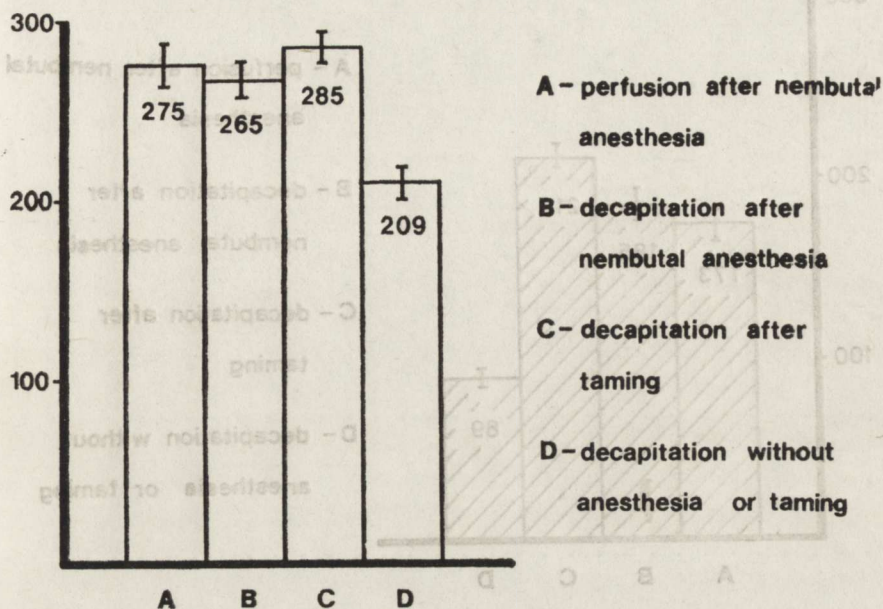


Fig. 6. Histogram of total number of synaptic vesicles per $1\mu\text{m}^2$ of synaptic cross section area in the four experimental groups

Ryc. 6. Histogram całkowitej liczby pęcherzyków synaptycznych na $1\mu\text{m}^2$ pola powierzchni przekroju w czterech grupach doświadczalnych

NUMBER OF ZIO-POSITIVE SYNAPTIC VESICLES PER $1\mu\text{m}^2$
OF SYNAPTIC SECTION AREA (\pm SEM)

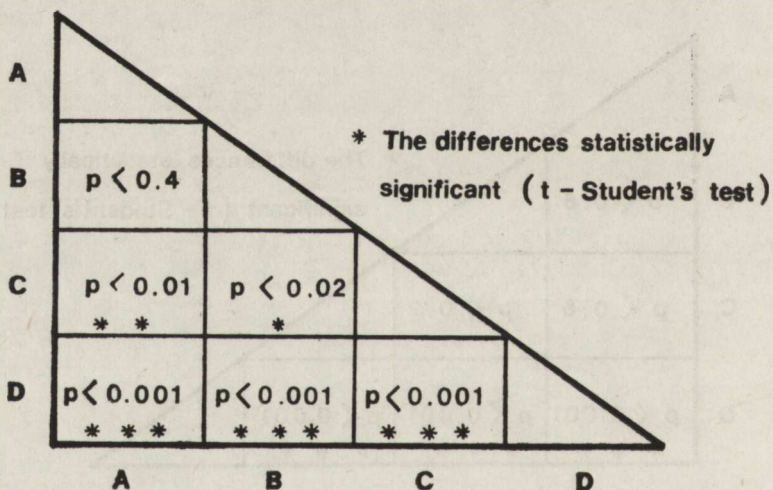
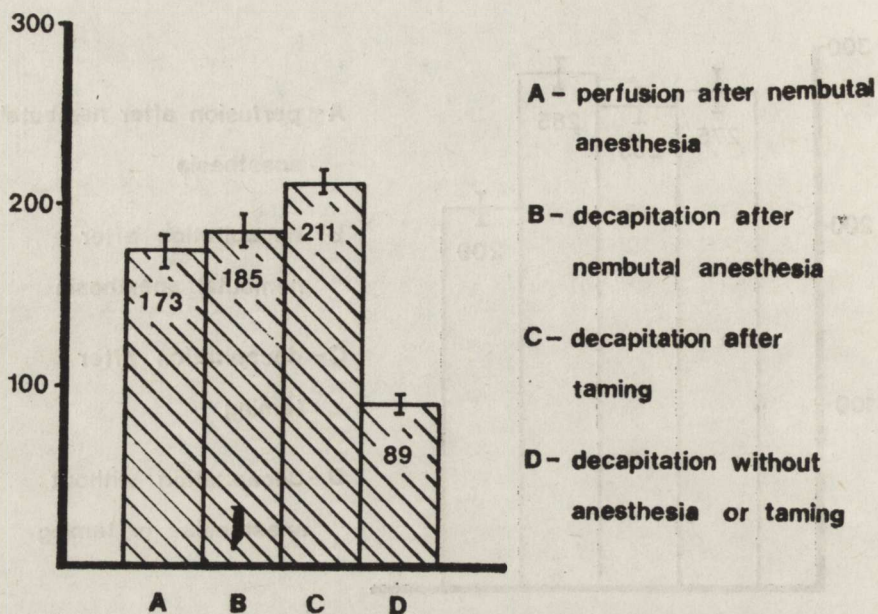


Fig. 7. Histogram showing the number of synaptic ZIO-positive vesicles per $1\mu\text{m}^2$ of synaptic cross section area in the four experimental groups

Ryc. 7. Histogram przedstawiający liczbę pęcherzyków synaptycznych ZIO-dodatnich na $1\mu\text{m}^2$ pola powierzchni przekroju kółki synaptycznej w czterech grupach doświadczalnych

B and C (perfusion under Nembutal anesthesia, decapitation under Nembutal anesthesia, decapitation after taming) was high and their content did not show significant differences between the groups, this indicating a low degree of neuron excitation. In group D (decapitation without anesthesia or taming) the number of vesicles was significantly lower as compared with that in the remaining groups, this being evidence of a high degree of neuronal excitation (Fig. 6).

The number of synaptic ZIO-positive vesicles, that is those containing transmitter substance was high and remains at a similar level in groups A, B and C, being highest in the latter, comprising animals decapitated after taming, whereas in group D (animals decapitated without anesthesia or taming) this number was much lower, indicating a high degree of excitation of the neurons (Fig. 7).

DISCUSSION

The choice of an appropriate method of sacrificing the animals plays an important role in the correct performance of the experiment and thus in correct evaluation of the results.

Investigations on the dynamics of the changes in synapses in the course of experimental epileptic seizures are a particularly hard task for experimenters. Recording of the functional state of the synapse at strictly defined phase requires killing of the animals in a flash and good fixation of the material as fast as possible.

These conditions are fulfilled by rapid decapitation and immediate collection of material. The circumstances associated with decapitation, however, evoke a strong psychomotor excitation of the animals, and this cannot remain without influence on the functional state of the axon terminals. Owing to this, it is impossible to distinguish the effect of synapse excitation caused by epileptic seizure in the group of experimental animals from excitation due to the psychomotor reaction associated with the decapitation procedure in the group of control animals.

This excitation can be avoided by anesthetising the animals and fixing the material by perfusion. This method gives very good effects as far as the technical quality of the fixed material is concerned, however, anesthesia causes extinction of the neuron excitation evoked by the epileptic seizure, which is the object of our interest. It also protracts in time the moment of fixation of the material. This makes impossible recording of the current functional state of the synapse at a definite phase of the epileptic seizure.

In search for the best way of sacrificing animals a trial was made to modify decapitation so as to, as far as possible, avoid the psychomotor excitation of the animals. For this purpose two additional variants of decapitation were introduced: it was performed under Nembutal anesthesia and after two weeks familiarisation of the animals with the laboratory room, where decapitation was to take place, with the instruments and the experimenter.

The axon terminals were additionally examined after sudden inhibition of synaptic transmission by throwing the animals into liquid nitrogen. The method of freezing in liquid nitrogen could not be used for morphometric studies in view of the severe destruction of brain tissue, occurring probably in the course of defrosting of the material.

Our earlier investigations (Dymecki et al. 1977; Walski 1977; Dymecki et al. 1981) showed that excitation of neurons under the influence of an epileptic seizure is accompanied by a considerable decrease of the number of synaptic vesicles and that this occurs at the cost of the ZIO-positive ones, that is those containing transmitter substance. This was confirmed by the investigations of Reinecke and Walther (1978) who demonstrated that after electric stimulation of the neuron a significant decrease of the number of synaptic ZIO-positive vesicles takes place, whereas the number of the ZIO-negative ones remains unchanged. According to these authors the ZIO-negative vesicles are a form of maturation of synaptic vesicles in the process of their reconstruction.

It results from morphometric analysis of the number of synaptic vesicles in the two variants of decapitation (under anesthesia and after taming) that both these ways give similar results, that is there are no significant differences in the number of vesicles per $1 \mu\text{m}^2$ of surface area of the synapse cross section between the animals decapitated according to the two variants.

It should be noted that the experiments with two these ways of killing the animals give results which do not differ significantly from those obtained in the group anesthetised with Nembutal and subjected to perfusion. This is evidence that earlier familiarisation of the animals with the surroundings eliminates the excessive excitation of neurons as efficiently as Nembutal anesthesia.

Comparison of the results in the three groups of decapitated animals, under Nembutal anesthesia, after habituation with the surroundings and without earlier taming or anesthesia seems to indicate that it is not the decapitation procedure, but the situation stress associated with it, that evokes the strong psychomotor excitation of the animals decapitated without anesthesia or taming. This is manifested by a significantly lower number of synaptic vesicles in the latter group as compared with the other ones.

CONCLUSIONS

1. In investigations on various methods of sacrificing experimental animals for the evaluation of the dynamics of changes in the synapses, the most suitable proved itself the method of decapitation after previous familiarisation of the animals with the surroundings.

2. Owing to rapid killing of the animal it makes possible recording of the current functional state of the synapse at a definite phase of the experiment.

3. It also eliminates the stress reaction of the animal, owing to which it is difficult to differentiate the changes due to epileptic seizure from those caused by psychomotor excitation, associated with the decapitation procedure.

Acknowledgement. We wish to express our appreciation to Prof. Jerzy Borowicz, Head of the Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa, for his valuable critical remarks and advice.

WPLYW SPOSOBU UŚMIERCANIA ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH
NA OBRAZ SYNAPS KORY RUCHOWEJ (OCENA MORFOMETRYCZNA)

Streszczenie

Celem pracy było porównanie różnych sposobów uśmiercania zwierząt dla oceny ich przydatności w badaniach nad dynamiką zmian w synapsach u myszy. Zastosowano dwie rutynowe metody, tzn. perfuzję i dekapitację, tę ostatnią w trzech wariantach. Badania przeprowadzono na 10 myszach, podzielonych na następujące grupy doświadczalne: a) po perfuzji w narkozie nembutalowej; b) po dekapitacji w narkozie nembutalowej; c) po dekapitacji, z wcześniejszym, 2-tygodniowym oswojeniem zwierząt z pomieszczeniem, narzędziami i personelem; d) po dekapitacji bez uprzedniego uspiania lub oswojenia. Ostatnią grupę stanowiły zwierzęta uśmiercone przez wrzucenie do ciekłego azotu, jednakże z uwagi na dużą destrukcję tkanki wywołaną zamrożeniem materiał nie nadawał się do analizy morfometrycznej. Materiał do badań w mikroskopie elektronowym pobrano z kory ruchowej i impregnowano metodą cynkowo-jodowo-osmową. Dla każdej z badanych grup wykonano po około 60 mikrofotografii synaps przy ostatecznym powiększeniu $123\,000\times$.

Analiza morfometryczna obejmowała obliczenie liczby pęcherzyków synaptycznych na $1\ \mu\text{m}^2$ powierzchni przekroju kolbki synaptycznej mierzonej planimetrycznie, z uwzględnieniem liczby pęcherzyków synaptycznych, zawierających substancję przekaźnikową (ZIO-dodatnich) i nie zawierających jej (ZIO-ujemnych).

Z uzyskanych wartości wynika, że liczba pęcherzyków synaptycznych w zakończeniach aksonalnych zwierząt po perfuzji w narkozie nembutalowej, dekapitacji w narkozie nembutalowej oraz dekapitacji po uprzednim oswojeniu jest wysoka i nie wykazuje istotnych różnic, co świadczy o niewielkim stopniu pobudzenia neuronów. Liczba pęcherzyków synaptycznych u zwierząt po dekapitacji

bez uprzedniego uspienia lub oswojenia jest istotnie niższa w porównaniu z pozostałymi trzema grupami, co jest wyrazem znacznego pobudzenia neuronów.

Wyniki pracy wskazują na to, że nie sama procedura dekapitacji, lecz towarzyszące jej reakcje psychoruchowe zwierzęcia związane ze stresem, są przyczyną dużego pobudzenia neuronów w grupie zwierząt dekapitowanych bez uspienia lub oswojenia. Oswojenie zwierząt przed dekapitacją pozwala na wyeliminowanie reakcji psychoruchowych, uniemożliwiających odróżnienie zmian wywołanych przez napady padaczkowe od zmian spowodowanych pobudzeniem psychoruchowym. Metoda ta wydaje się najbardziej przydatna w badaniach nad dynamiką zmian w zakończeniach aksonalnych oun.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА УМЕРЩВЛЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ НА КАРТИНУ СИНАПСОВ ДВИГАТЕЛЬНОЙ КОРЫ (МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА)

Резюме

В электронно-микроскопических исследованиях динамики изменений в синапсах в течение экспериментальных эпилептических припадков существует необходимость такого способа умерщвления животных, который позволил бы уловить и обнаружить актуальное функциональное состояние синапса в определенной фазе припадка.

Морфологическим показателем состояния возбуждения нейрона является число синаптических пузырьков в аксональном окончании, которое под влиянием возбуждения подвергается значительному уменьшению.

Целью работы было сопоставление разных способов умерщвления животных для оценки их пригодности в исследованиях динамики изменений в синапсах периферической нервной системы у мышей. Авторы применили два основных, рутинных метода т.зн. перфузию и декапитацию, эту последнюю в трех вариантах.

Исследования были проведены с 10 мышами, разделенными на следующие экспериментальные группы:

- А. после перфузии в нембуталовом наркозе,
- Б. после декапитации в нембуталовом наркозе,
- В. после декапитации с более ранним, 2-недельным приручением животных к помещению, инструментам и к персоналу,
- Г. после декапитации без предыдущего наркоза или приручения.

Последнюю группу составляли животные умерщвленные посредством опущения их в жидкий азот, однако ввиду большой деструкции ткани вызванной замораживанием, материал не был пригоден к морфометрическому анализу. Материал для электронно-микроскопических исследований авторы брали из двигательной коры и импрегнировали цинково-йодино-осмиевым методом. Для каждой из исследуемых групп авторы изготовили по ок. 60 электрограмм синапсов при одинаковом, окончательном увеличении 123 000 X.

REFERENCES

1. Birks R. I.: The relationship of transmitter release and storage to fine structure in a sympathetic ganglion. *J. Neurocytol.*, 1974, 3, 133—160.
2. Dymecki J., Karwacka H., Walski M.: Dynamika zmian w synapsach w przebiegu doświadczalnej padaczki audiogennej. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1977, 1, 81—88.
3. Dymecki J., Walski M., Medyńska E.: Ultrastructural and morphometric in-

vestigations on the mechanism of neurotransmitter release from synaptic vesicles. *Acta neuropath. (Berl.) Suppl.*, VII, 1981, 381—385.

4. Heuser J. E., Reese S. T.: Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.*, 1973, 57, 315—344.
5. Karnovsky M. J.: A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1965, 27, 137A.
6. Kawana E., Akert K., Sandri C.: Zinc iodide-osmium tetroxide impregnation of nerve terminals in the spinal cord. *Brain Res.*, 1969, 16, 325—331.
7. Reinecke M., Walther Ch.: Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. *J. Cell Biol.*, 1978, 78, 839—855.
8. Uchizono K.: Excitation and inhibition synaptic morphology. Igaku Shoin., Tokyo 1975.
9. Walski M.: Badania mikroskopowo-elektronowe synaps okolicy hipokampa szczurów obciążonych padaczką audiogenną, przy użyciu metody cynkowo-jodowo-osmowej. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 193—207.

Authors' address: Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, 1/9, Sobieskiego Str., 02—957 Warszawa

KOMUNIKATY

W dniach 14 i 15 czerwca 1984 r. odbędzie się w Łodzi Sympozjum na temat: „Aspekty biochemiczne, immunologiczne i kliniczne stwardnienia rozsianego, SSPE i procesów demielinizacyjnych”, zorganizowane przez Komisję Neurochemii Komitetu Nauk Neurologicznych PAN. Adres Komitetu Organizacyjnego: Prof. dr Mieczysław Wender, Klinika Neurologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

W okresie od 1 do 6 września 1985 r. odbędzie się w Hamburgu XIII Światowy Kongres Neurologii, organizowany przez Światową Federację Neurologów i Niemieckie Towarzystwo Neurologiczne.

Bliższe informacje zostaną przesłane osobom, które zgłoszą chęć uczestnictwa na adres: XIIIth World Congress of Neurology, Congress Manager's Office, Letzter Hasenpfad 61, D-6000 Frankfurt 70, Federal Republic of Germany.

Jerzy Dymecki

TERESA WRZOŁKOWA, TOMASZ COFTA, IRENA ŁUKASZYK

CAPILLARY BLOOD VESSELS OF THE BRAIN *

I. VASCULARISATION DENSITY IN VARIOUS PARTS OF THE CAT AND RAT CEREBRAL CORTEX

Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Medical Biology, Medical School,
Gdańsk

In the latest twenty years interest has been growing in the terminal blood vessels of the brain. In an increasing number of publications attention is called to the distinct, selective and diversely controlled blood-brain barrier which is usually located at the level of the capillary endothelium (Reese, Karnovsky 1967; Rapoport 1976; Bradbury 1979; Bochenek, Reicher 1981; Samuels, Schwartz 1981).

The endothelial cells in brain capillaries have been found to possess distinctive structural features as well as specific biochemical and physiological characteristics (Raichle et al. 1975; Amtrop 1980; Barry et al. 1980; Head et al. 1980; Altura 1981; Betz, Golstein 1981; Edwards, Garlick 1981; Goehlert et al. 1981; Skolasińska et al. 1981; Vorbrodtt et al. 1981; Crone, Olesen 1982).

To date the subject of angioarchitecture of the smallest brain blood vessels has hardly been investigated, whilst that of larger blood vessels is well established. Data concerning the degree and variability of capillary penetration of nerve tissue are rather scarce despite their functional importance. The available information concerns mostly the growing or ageing subjects (Bär 1980; Bell, Ball 1981).

The aim of our studies was to determine the density of terminal vascularisation in functionally distinct areas of the brain, namely, the motor, limbic and visual cortex. To compare the terminal vascular network density two species of mammals — the rat and the cat were chosen.

* Work supported by the Polish Academy of Sciences grant No. 10.4.05.1.4.

MATERIAL AND METHODS

The object of our studies were sections of the motor, limbic and visual cortex of both cat and rat. In the cat, specimens were taken from the posterior sigmoid gyrus — motor cortex, from within the *sulcus cruciatus* on its medial surface — limbic cortex, and from the posterior lateral gyrus — visual cortex (Fig. 1). In the rat, specimens were obtained from the cortex surface of the brain: the frontal area by the

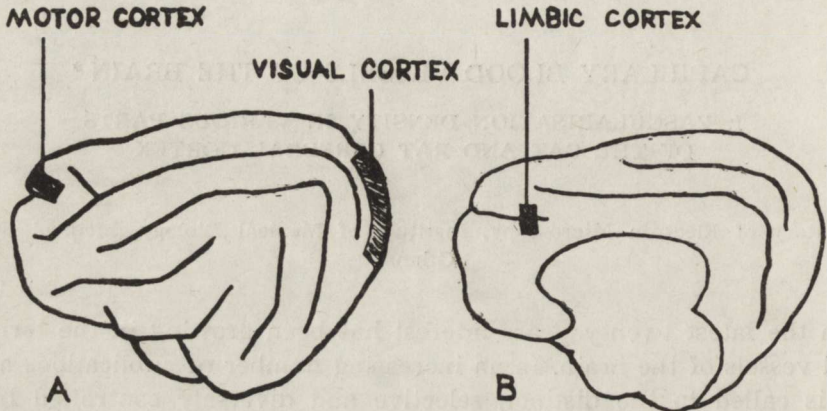


Fig. 1. Localization of sites where sections were obtained from the cerebral cortex of the cat. A. convex surface of the left hemisphere viewed from the left. B. medial surface of the right hemisphere viewed from the left

Ryc. 1. Lokalizacja miejsc, z których pobrano wycinki kory mózgowej kota. A. powierzchnia wypukła lewej półkuli widziana ze strony lewej. B. powierzchnia przyśrodkowa prawej półkuli widziana ze strony lewej

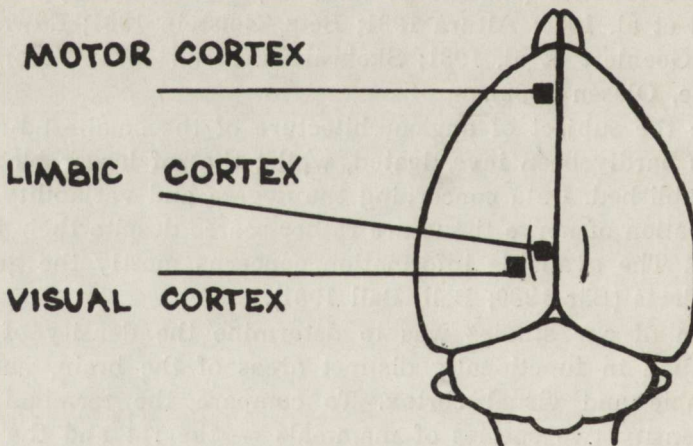


Fig. 2. Localization of sites where sections were taken from the cerebral cortex of the rat. Viewed from above

Ryc. 2. Lokalizacja miejsc, z których pobrano wycinki kory mózgowej szczura. Widok z góry

longitudinal fissure — motor cortex, from the parietal area along the longitudinal fissure — limbic cortex, and slightly posterior to it separated by a *sulcus* — the visual cortex (Fig. 2).

The material from the cerebral cortex of the cat was obtained from 6 healthy animals each weighing 2000—2500 g. Nembutal anesthesia was used. The animals were fixed by perfusion (according to Juraniec et al. 1978) with a 4% solution of paraformaldehyde with 8% saccharose in phosphate buffer, pH 7.4. The fixed brains were sliced and cerebral cortex specimens were taken with a needle. The specimens were fixed in 6.25% glutaraldehyde with 8% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 for the next 24 hours. The material was also obtained from 19 rats of the Wistar breed (each weighing about 200 g). The animals were anesthetised with Nembutal. The tissues were fixed by perfusion according to Peters (1970). The fixed brain was cut into slices 1 mm thick and the required cortical fragments were taken with the use of a needle. The specimens were fixed in a 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4 for 24 hours.

All the sections of cat and rat brains were postfixed for 1 hour in OsO_4 solution, dehydrated in alcohol of increasing concentrations and embedded in Epon 812. The semithin sections were stained with toluidine blue and examined in the light microscope at a magnification of $175\times$. The blood vessels appeared as clear light vascular lumina on a clear blue stained background. Within each sample the terminal vessel cross sections of less than $12.5\ \mu\text{m}$ diameter with a single layer wall made up only of endothelial cells were counted.

The area in which the number of blood vessels was to be determined was delineated by placing a Thom chamber beneath the slide in which each square was $50\ \mu\text{m}$ in diameter. To avoid errors in measurement of the section area, its outline was traced on ruled paper equivalently to that in the Thom chamber.

Once the blood vessels in each section had been counted, their number per square millimeter was established for each section. From the sums obtained arithmetic means and standard deviations of the results were calculated and compared to each other.

RESULTS

The results are presented in Table 1. On comparison of the figures obtained we found a distinct difference in the density of capillary network of the cat cortex. The section of limbic cortex contained a smaller number of terminal blood vessels per unit area than the two remaining cortical areas. The difference is statistically significant — $P < 0.001$.

Table 1. Comparison of the arithmetic means of the number of terminal vessels in various sections of the cerebral cortex in cat and rat

Tabela 1. Porównanie średnich arytmetycznych liczby naczyń terminalnych w różnych okolicach kory mózgowej kota i szczura

Cortex Kora	Cat Kot		Rat Szczur	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
motor ruchowa	35	295,0 ± 77,2	31	308,9 ± 52,7
limbic limbiczna	71	241,4 ± 46,8	28	369,2 ± 69,1
visual wzrokowa	38	335,3 ± 71,9	28	305,9 ± 73,9

n — number of sections examined
liczba zbadanych próbek

\bar{x} — arithmetic mean of the number of blood vessel cross sections per square mm
średnia arytmetyczna liczby przekrojów naczyń włosowatych na mm²

s — standard deviation
odchylenie standardowe

Moreover, there was a difference in the density of capillary vessels between the motor and the visual cortex of the cat ($P < 0.01$).

In the rat, contrary to the previous result we found the limbic cortex to be more densely vascularised than the motor and the visual cortex. The difference in the density of terminal vascularisation between the limbic cortex and the two remaining cerebral cortical areas of the rat was found to be statistically significant ($P < 0.001$). On the other hand, the density of terminal vascularisation of the motor and visual cortex of the rat were found to be similar.

Comparison of the results of these studies in the two examined species showed that the density of terminal vascularisation of the cat limbic cortex is definitely lower than that of the rat and the difference is statistically significant ($P < 0.001$). No differences were however, found between the species in the capillary vascularisation density of the motor and the visual cortex ($P > 0.1$ in both cases).

DISCUSSION

Comparison of the terminal vascularisation density of functionally distinct areas of the cerebral cortex reveals differences and similarities both in the cat and the rat. The motor and visual cortex are within certain limits vascularised similarly within the same species. This uniformity of terminal vascularisation density in the examined fragments

of both cortical areas in two species could suggest that the terminal blood vessels penetrate the entire motor and visual cortex uniformly. The possibility cannot, however, be excluded that the detected correlation exists exclusively at the points which were examined.

As no significant difference was noted in the capillary density of cat and rat in the examined specimens of motor and visual cortex a functional correlation of analogous parts of the brain may be suspected — the motor cortex serving the same function in cat and rat. The same applies to the examined visual cortex samples.

It is noticeable in the material studied that there exists a difference in the limbic cortex vascularisation between the species as opposed to the similarity found between the motor and the visual cortex.

In the rat this fact is of particular significance since the sites from which specimens were obtained in the case of the limbic and the visual cortex differed distinctly in capillary density and yet were only 1 mm apart (Fig. 2). Such a marked difference in capillary density could point to diverse requirements and functional correlations between various parts of the cerebral cortex and the terminal vascular system.

Amongst the three investigated cortical areas the limbic cortex stands out significantly since not only does it differ in terminal vessel density from the two remaining regions, but also a marked difference between the species is observed.

It seems that the difference in capillary density of the limbic cortex between the cat and the rat could be caused by collecting specimens from anatomically different points of the limbic system. It is quite likely that the specimens examined were from functionally different points of the limbic system, and hence differently vascularised as regards capillary vessels. As the knowledge about this system increases an anatomical and functional diversity and even areas performing opposed functions are found within it (Fonberg 1965; 1967; 1969; 1974; Juraniec et al. 1974; 1978; Bochenek, Reicher 1981).

It cannot of course be excluded that the difference observed was influenced by the variability in the genetic background between the cat and rat which after all are very distantly related mammalian species. The biological difference between the two species could influence the functional differentiation of structures of the nervous system, including its microvascularisation.

Further studies of the terminal vascularisation density of the brain should bring us a step closer to explaining the reasons for its diversity. Study of various parts of the limbic system regarding capillary vascularisation density may throw some light on the cause of the differences observed and may reveal the rules regulating the diversities within the system itself.

NACZYNIJA WŁOSOWATE MÓZGU

I. Gęstość unaczynienia terminalnego różnych części kory mózgowej kota i szczura

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie gęstości unaczynienia terminalnego w różnych czynnościowo odcinkach kory mózgowej — w korze ruchowej, limbicznej i wzrokowej szczura i kota. Wycinki pobrano od 19 szczurów i 6 kotów. Badania przeprowadzono w mikroskopie świetlnym na skrawkach eponowych półcienkich. Stwierdzono, że u obu gatunków gęstość unaczynienia jest różna w zbadanych wycinkach kory mózgowej.

КАПИЛЛЯРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

I. Густота терминальной васкуляризации разных частей мозговой коры кошки и крысы

Резюме

Целью работы было исследование густоты терминальной васкуляризации в разных в функциональном отношении отрезках мозговой коры — в двигательной, лимбической и зрительной коре крысы и кошки. Сегменты взяли от 19 крыс и от 6 кошек. Исследования были проведены в световом микроскопе на полутонких срезах погруженных в эпоне. Констатировано, что у обоих исследованных видов густота васкуляризации в вышеуказанных сегментах мозговой коры неодинакова.

REFERENCES

1. Altura M. B.: Pharmacology of microcirculation. In: Microcirculation. Academic Press, New York 1981, 51—105.
2. Amtrop O.: Estimation of capillary permeability of inulin, sucrose and mannitol in rat brain cortex. *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 110, 337—342.
3. Barry D. I., Paulson O. B., Hertz M. M.: The blood-brain barrier: an overview with special reference to insulin effects on glucose transport. *Acta Neurol. Scand.*, 1980, 78, Suppl. 62, 147—156.
4. Bär T.: The vascular system of the cerebral cortex. *Adv. Anat. Embriol. Cell Biol.*, 1980, 59, 1—62.
5. Bell M. A., Ball M. J.: Morphometric comparison of hippocampal microvasculature in ageing and demented people: diameters and densities. *Acta neuropathol. (Berlin)*, 1981, 53, 229—318.
6. Betz A. L., Goldstein G. W.: Development changes in metabolism and transport properties of capillaries isolated from rat brain. *J. Physiol.*, 1981, 312, 365—376.
7. Bochenek A., Reicher M.: Anatomia człowieka. T. 4. PZWL, Warszawa 1981.
8. Bradbury M.: The concept of a blood-brain barrier. Wiley and Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto 1979.
9. Crone C., Olesen S. P.: Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.*, 1982, 241, 49—55.
10. Edwards D. A., Garlick D.: An ultrastructural study of the blood-brain barrier in the rat. In: *Progress in microcirculation research*. Ed. D. Garlick. Committee in Postgraduate Med. U.N.S.W. Sydney 1981, s. 51—54.

11. Fonberg E.: Effect of partial destruction of the amygdaloid complex on the emotional-defensive behavior in dogs. *Bull. Acad. Pol. Sci., Cl. II*, 1965, 13, 429—432.
12. Fonberg E.: The role of the amygdaloid nucleus in animal behaviour. *Progr. Brain Res.*, 1967, 22, 273—281.
13. Fonberg E.: The role of hypothalamus and amygdala in the intake alimentary motivation and emotional reactions. *Acta Biol. Exp.*, 1969, 29, 355—358.
14. Fonberg E.: Amygdala function within the alimentary system. *Acta Neurobiol. Exp.*, 1974, 34, 435—466.
15. Goehlert U. G., Ng Ying Kin N. M. K., Wolfe L. S.: Biosynthesis of prostacyclin in rat cerebral microvessels and choroid plexus. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 1192—1201.
16. Head R. J., Hjelle J. T., Jarrott B., Berkowitz B., Cardinale G., Spector S.: Isolated brain microvessels: preparation, morphology, histamine and catecholamine contents. *Blood Vess.*, 1980, 17, 173—186.
17. Juraniec J., Wrzółkowa T., Narkiewicz O.: Synaptic organization of some nuclei in the amygdaloid complex. *Ann. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, 1974, 19, 115—116.
18. Juraniec J., Narkiewicz O., Wrzółkowa T.: The distribution of axon terminals with flattened vesicles in the nuclei of the amygdaloid body of the cat. *J. Hirnforsch.*, 1978, 19, 133—143.
19. Lossinsky A. S., Vorbrodt A. W., Wiśniewski H. M., Iwanowski L.: Ultra-cytochemical evidence for endothelial channel-lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1981, 53, 197—202.
20. Peters A.: The fixation of central nervous tissue and the analysis of electron micrographs of the neuropil with special reference to the cerebral cortex. In: *Contemporary research methods in neuroanatomy*. Ed. W. J. H. Nauta, S. O. E. Ebbensson. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970, 56—76.
21. Pfeifer R. A.: *Die Angioarchitektonik der Grosshirnrinde*. Springer, Berlin 1928.
22. Raichle M. E., Hartman B. K., Eichling J. O., Sharpel G.: Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 75, 3726—3730.
23. Rapoport S. I.: *Blood-brain barrier in physiology and medicine*. Raven Press, New York 1976.
24. Reese T. S., Karnovsky M. J.: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 207—217.
25. Samuels S., Schwartz S.: Compartmentation in aminoacid transport across the blood-brain barrier. *Neurochem. Res.*, 1981, 6, 755—765.
26. Skolasińska K., Kostrzewska M., Ostenda M., Ruczyński M.: Cerebral blood flow and ultrastructural studies of the brain capillaries in early state of hypertension in SHR. *Clin. Exp. Hypertens.*, 1981, 3, 319—329.
27. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Iwanowski L.: Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scrapie infected mice. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1981, 53, 203—211.

Authors' address: Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Medical Biology, Medical School, 1, Dębinki Str., 80—210 Gdańsk

IRENA ŁUKASZYK, TERESA WRZOŁKOWA, TOMASZ COFTA

CAPILLARY BLOOD VESSELS OF THE BRAIN *

II. AXON TERMINALS OF CAPILLARY VESSELS IN DIFFERENT PARTS OF THE CAT AND RAT CEREBRAL CORTEX

Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Medical Biology,
Medical School, Gdańsk

The terminal vascular network of the central nervous system has been studied by various methods (Amtrop 1980; Jokelainen et al. 1980; De Bault et al. 1981; Edwards, Garlick 1981; Goehler et al. 1981; Stefanovich, Gojowczyk 1981; Crone, Olesen 1982). The relation of nerve endings to terminal vessels is a subject of many studies with the use of the fluorescence technique and electron microscopy (Rennels, Nelson 1975; Itakura et al. 1977; Ando 1981; Lossinsky et al. 1981; Madison et al. 1981; Vorbrodtt et al. 1981). However, the results of the investigations are not equivocal.

It is generally accepted that the axon terminals of the autonomic nervous system reach the arterial and venous branches, that is the vessels which do not form the blood-brain barrier. At this level there is a perivascular space with connective tissue elements penetrating from the pia mater (Owman, Edvinsson 1978; Kobayashi et al. 1981).

Fluorescence studies show that there exist in the vicinity of small arterioles and veins, axon terminals containing biogenic amines (Kobayashi et al. 1981; Madison et al. 1981). Using fluorescence microscopy, nerve terminals have been also found in the blood vessels forming the blood-brain barrier in some cases of central nervous system damage (Kobayashi et al. 1981). Immunofluorescent studies also revealed the presence of contractive elements in the endothelium of brain capillaries and they suggest the ability of these to contract, hence the purposefulness of their innervation (Owman et al. 1977).

The first electron microscope studies suggesting the presence of nerve terminals in the vicinity of the capillaries in the central nervous system

* Work supported by the Polish Academy of Sciences grant No. 10.4.05.1.4.

were published by Dragiev (1967). Rennels and Nelson (1975) demonstrated the existence of an immediate contact of the nerve endings with the capillary walls in the rat hypothalamus.

The aim of the present work was a study of the relation of nerve terminals to the capillary walls within the motor, limbic and visual cortex of the cat and rat brain.

MATERIAL AND METHODS

The subject of our studies was the motor, limbic and visual cortex of 10 rats and 3 cats. The procedure of preparation for electron microscopy has been described earlier (Wrzółkowska et al. 1984).

In the electron micrographs, the relation of terminal boutons to capillary walls was determined with acceptance of the following criteria: 1) The nerve terminal is considered "close" if it is separated from the vascular basement membrane by a cell process not wider than 40 nm, or if it adheres immediately to the basement membrane along a small segment; 2) while judging the distance of the terminal boutons the distribution of synaptic vesicles within the axon terminal or the localisation of the presynaptic thickening were not taken into consideration.

In each of the ultrathin sections the number of capillaries was determined in the electron microscope and then photographs of these were taken at a magnification of 14 000. On the electron micrographs from each sample the number of "close" axon terminals was counted. The results were compared with the total number of capillary vessels in the same sample, and the number of axon terminals per capillary vessel in each sample was determined. The results were analysed by Student's *t* test.

RESULTS

In each of the areas of the brain cortex investigated, in both cat and rat, nerve terminals termed as "close" were found to be present. The average number of "close" terminal boutons per capillary blood vessel in the three cortex areas of both species is shown in Table 1. In the rat this type of adherence was found to be least frequent in the limbic cortex — on the average 0.47 per capillary examined, more so in the motor (1.16) and in the visual cortex (1.04). The difference between the number of nerve endings per capillary in the limbic as opposed to the motor and visual cortex is statistically significant ($P < 0.001$).

In the cat the highest number of axonal endings per blood vessel was found in the limbic cortex (1.82). The difference between this and the number of terminal boutons in the motor cortex is statistically significant ($P < 0.001$). In the cat the smallest number of endings per vessel

Table 1. Comparison of the arithmetic means of the number of axon terminals of capillary vessels in various sections of the cerebral cortex of rat and cat

Tabela 1. Porównanie średniej arytmetycznej liczby zakończeń nerwowych przypadających na jedno naczynie włosowate w różnych okolicach kory mózgowej szczura i kota

Cortex area Kora	Cat Kot		Rat Szczur	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
motor ruchowa	173	1,22±0,33	134	1,16±0,28
limbic limbiczna	346	1,82±0,50	146	0,47±0,19
visual wzrokowa	264	1,64±0,37	124	1,04±0,44

n — number of capillaries examined

liczba zbadanych naczyń włosowatych

\bar{x} — average number of axon terminals per capillary

średnia liczba zakończeń nerwowych przypadających na jedno naczynie włosowate

s — standard deviation

odchylenie standardowe

(1.22) was noted in the motor cortex. There is a statistically significant difference between this and the number in the limbic cortex ($P < 0.001$) and the visual cortex ($P < 0.01$). The visual cortex has an intermediate number of nerve endings, on the average 1.64 per terminal vessel.

In both cat and rat various ways of contact of "close" synaptic terminals with the basement membrane of the vessel were observed. In the majority of cases the axon terminal was separated from the basement membrane by a very narrow process consisting of two glial cell membranes which formed a distinct barrier between the terminal bouton and the basement membrane. The system of three membranes — the cell membrane of the axon terminal and the two membranes of the glial cell process were in close adherence to one another and to the basement membrane (Fig. 1). Occasionally the processes of two glial cells formed a junction between the bouton and the basement membrane (Fig. 2).

At the same time cases were observed where two glial processes separating the axonal endings from the basement membrane were separated from each other and the bouton's cell membrane slipped in between them (Fig. 3).

In some places the bouton was separated from the basement membrane by two layers of thin glial processes. One of these layers was made up of two processes which, as they did not adhere, formed a gap where the bouton's cell membrane squeezed in, followed by synaptic



Fig. 1. Terminal vessel of the cat cerebral cortex. A synaptic bouton with spherical vesicles is separated from the basement membrane by two cell membranes of a thin glial process and by its own cell membrane. The bouton forms a synaptic contact with a dendrite (arrow). $\times 80\ 000$

Ryc. 1. Naczynie włosowate kory mózgowej kota. Kolbka synaptyczna z pęcherzykami kulistymi oddzielona jest od błony podstawnej dwiema błonami komórkowymi cienkiej wypustki gwałowej oraz własną błoną komórkową. Kolbka ta tworzy styk z dendrytem (strzałka). Pow. $80\ 000 \times$

vesicles (Fig. 4). Quite often the structure of the cell membrane became blurred at the point where the bouton adhered to the capillary wall (Fig. 5). Even so, it must be stressed that in the electron micrographs examined some of the "close" axon terminals formed synapses with the dendritic process (Figs. 1, 5, 6) right next to the capillary wall (Fig. 6). In both the studied species close adherence of the terminal bouton to



Fig. 2. Two glial processes form a junction (O←) which separates the "close" axon terminal from the basement membrane of the terminal vessel. $\times 60\ 000$
Ryc. 2. Dwie wypustki glejowe tworzą styk (O←) w miejscu „bliskiego” przylegania zakończenia nerwowego do błony podstawnej naczynia włosowatego. Pow. $60\ 000 \times$

the vessel wall often occurred at the junction point of two endothelial cells (Fig. 6). Among the "close" axon terminals there was a prevalence of terminals with the small spherical vesicles. In the cat we also found boutons containing single or occasionally several granular vesicles (Fig. 3b) as well as single flattened ones. In the studied specimens the synaptic bouton was not found to penetrate the vessel wall beyond the basement membrane.

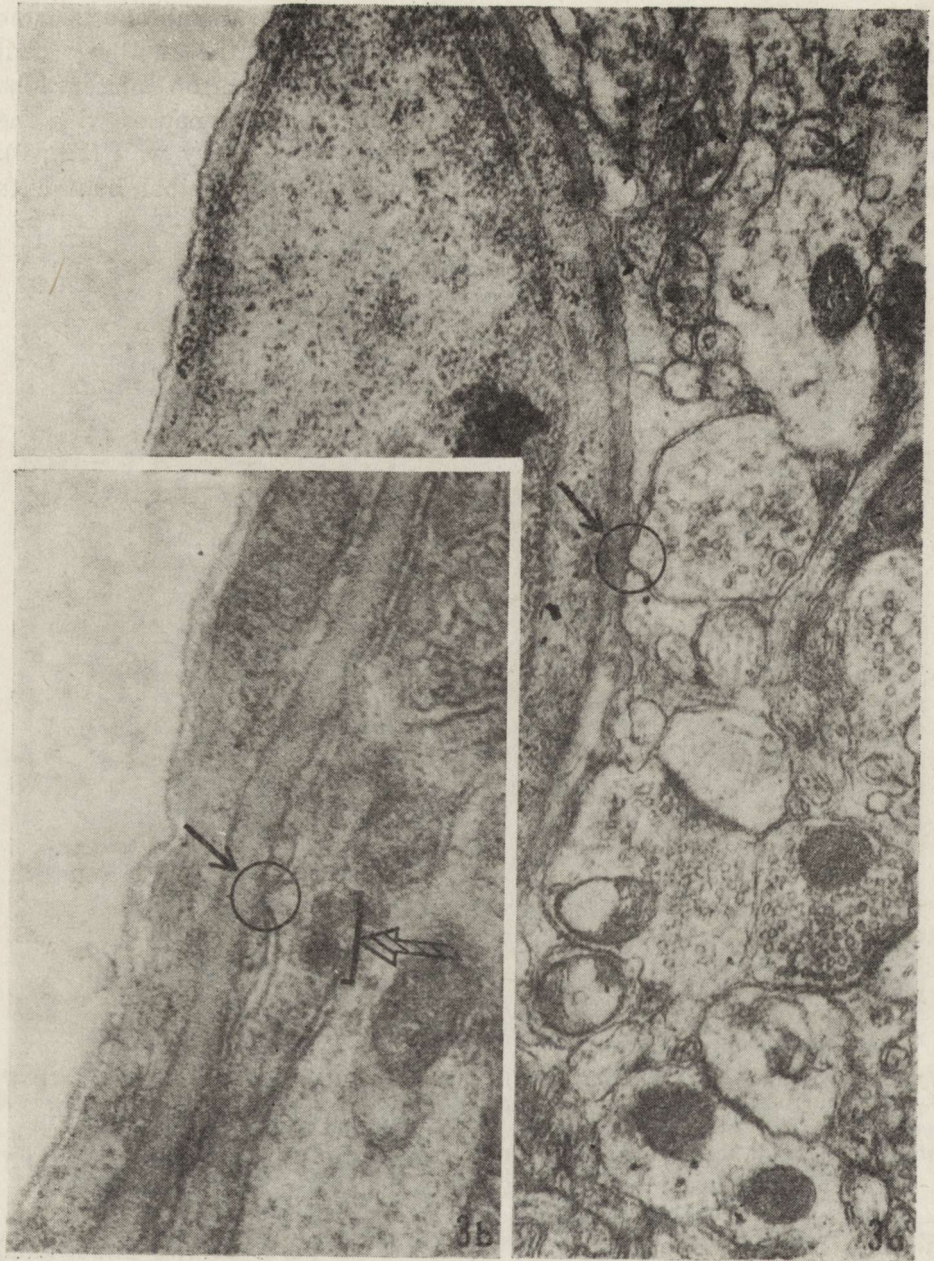


Fig. 3. Two glial processes are separated from each other allowing the membrane of the synaptic bouton to adhere directly to the basement membrane of the vessel (arrow). *3a.* The synaptic bouton contains spherical vesicles. $\times 40\ 000$. *3b.* The synaptic bouton contains granular vesicles (double arrow). $\times 70\ 000$

Ryc. 3. Rozsunięte wypustki glejowe ograniczają przestrzeń, w której błona kolbki synaptycznej z pęcherzykami kulistymi i pęcherzykami ziarnistymi przylega bezpośrednio do błony podstawnej naczynia (strzałka). *3a.* Kolbka synaptyczna zawierająca pęcherzyki kuliste. Pow. $40\ 000 \times$. *3b.* Kolbka synaptyczna zawierająca pęcherzyki ziarniste (podwójna strzałka). Pow. $70\ 000 \times$

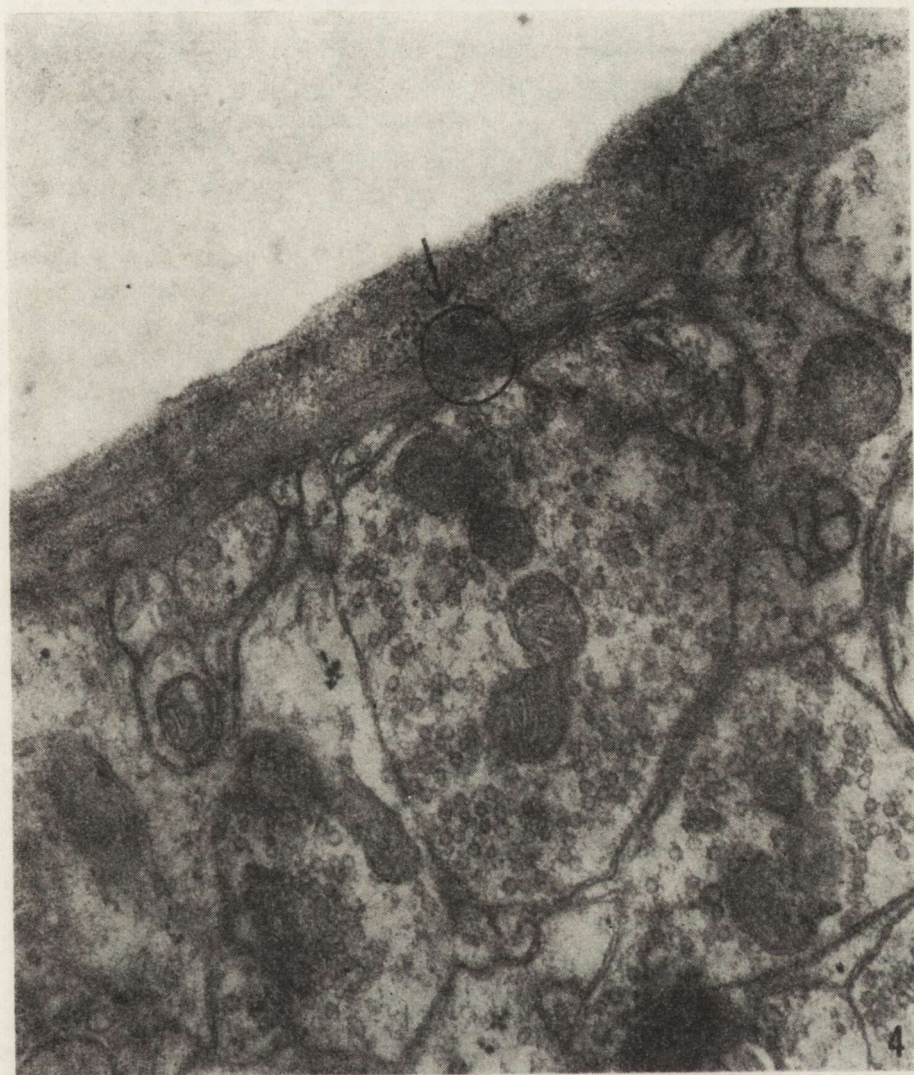


Fig. 4. Two parallel glial processes separate the synaptic bouton from the basement membrane of the vessel. Along a small section the glial processes of one layer are separated from each other allowing the synaptic bouton to slip into the gap they form (arrow). $\times 40\ 000$

Ryc. 4. Dwie warstwy wypustek komórek glejowych oddzielają „bliską” kolbkę synaptyczną od błony podstawnej naczyń włosowatych. Na małej przestrzeni wypustki glejowe jednej z warstw są rozdzielone a w szczelinę tę wpadła się kolbka synaptyczna (strzałka). Pow. $40\ 000 \times$

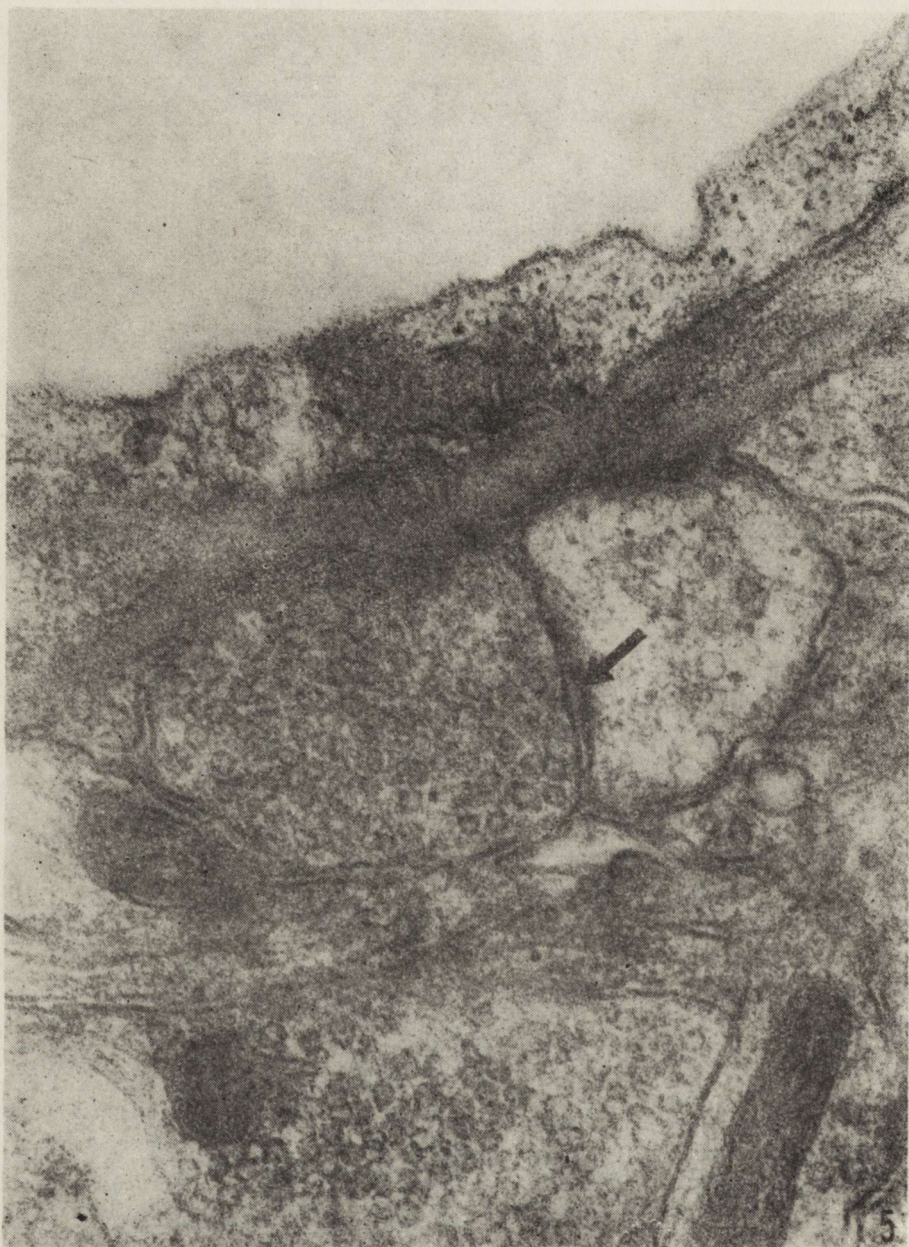


Fig. 5. The "close" synaptic bouton containing spherical vesicles has a blurred membrane structure at the point where it adheres to the basement membrane. It also forms a synaptic contact with a dendrite (arrow). $\times 70\ 000$

Ryc. 5. „Bliska” kolbka synaptyczna z pęcherzykami kulistymi ma zatartą strukturę swej błony w miejscu przylegania do błony podstawnej naczyń. Kolbka ta tworzy styk z dendrytem (strzałka). Pow. $70\ 000 \times$

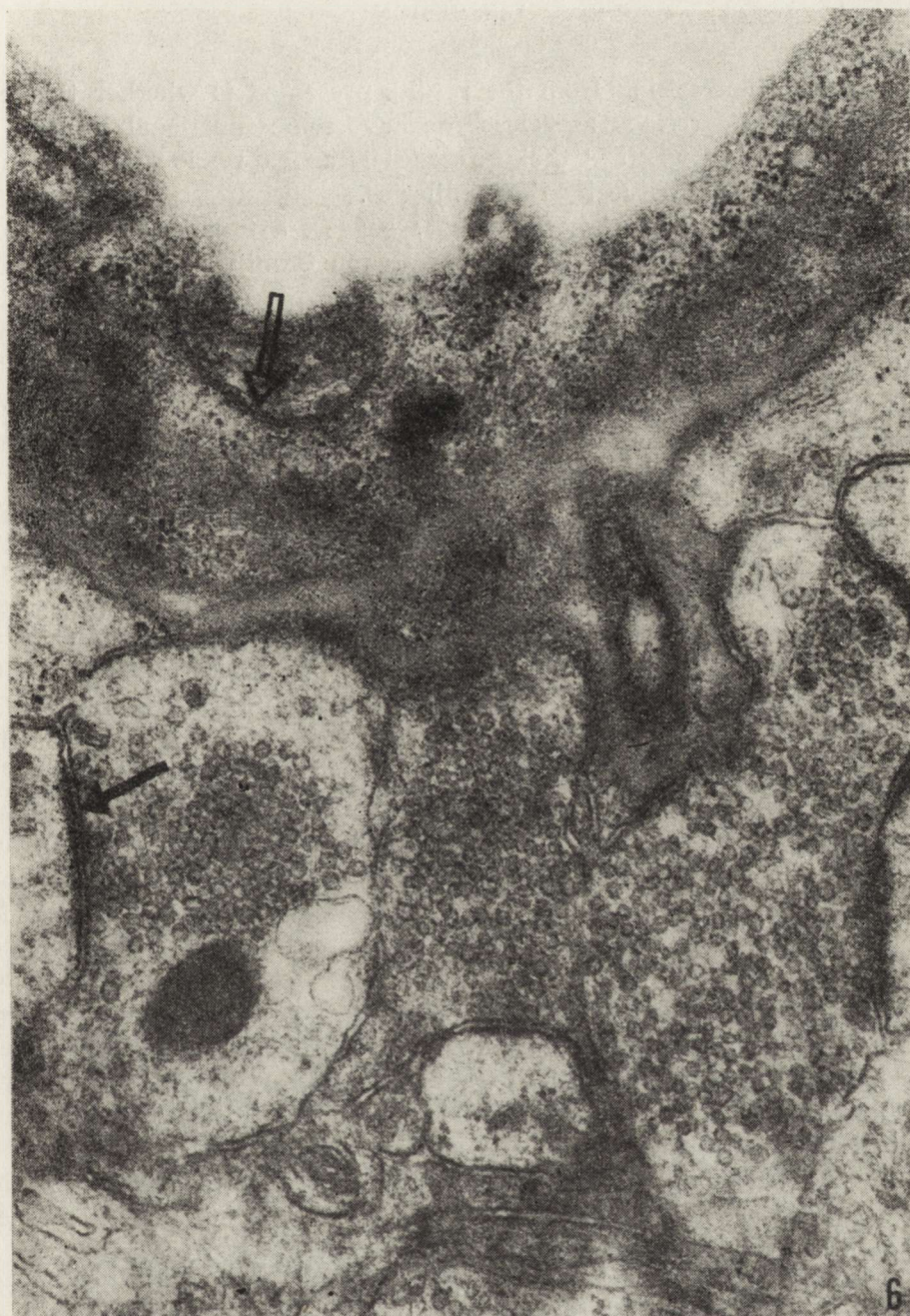


Fig. 6. Capillary vessel endothelium forms a junction (double arrow) Multiple "close" synaptic boutons along the irregularly indented basement membrane of this vessel.

The boutons form synaptic contacts with dendrites (arrow). $\times 50\,000$

Ryc. 6. Naczynie włosowate ze stykiem komórek śródbłonna (strzałka podwójna). Wzdłuż wpuklającej się nieregularności błony podstawnej naczynia liczne „bliskie” kolbki synaptyczne. Kolbki te tworzą styki z dendrytami (strzałka). Pow. 50 000 \times

DISCUSSION

The question arising from the results presented is whether the terminal boutons described as "close" do have some functional relation to the capillaries or whether their presence is an expression of the penetration of nervous tissue by the capillaries.

The results presented here seem to suggest a functional correlation between the capillaries and the "close" axon terminals. In the cat and rat the findings were as follows: a varying degree of separation of glial cell processes (Figs 3, 4), blurring of the synaptic terminal cell membrane at the area where it adhered to the basement membrane (Fig. 5), the appearance of axon terminals in the vicinity of the junction of two endothelial cells (Fig. 6). These results may suggest a functional correlation between the axon terminal and the capillary wall.

The establishment of the existence of differences in the number of perivascular nerve endings in the motor, limbic and visual cortex of the cat and rat, presented in this work, adds to our belief in a functional role of the "close" synaptic endings in regard to the capillary vessels in the cortical areas studied.

Comparison of the number of "close" nerve endings in the cat with that found in the same cortical areas of the rat points to certain similarities as well as some interspecial differences. The difference in the number of synaptic boutons in the limbic cortex could be due to the collection of specimens from functionally different regions of the limbic system. The validity of this supposition will, however, require further investigation of anatomically defined areas of the limbic system which are known to perform antagonistic functions (Narkiewicz et al. 1975).

The varying number of nerve endings surrounding the terminal vessels in areas of the central nervous system which are often anatomically close (e.g. the limbic and visual cortex of the rat) seems to support the view that the results presented are not accidental. However, when evaluating the significance of the results we must take into account the occurrence of junctions of "close" synaptic boutons and dendrites.

In the here examined specimens of cat and rat brain cortex the observations of Rennels and Nelson (1975) who saw the endings merged into the basement membrane like pericytes were not confirmed. It is possible that this type of connection is characteristic of the rat hypothalamus or, as Rennels and Nelson suggest, of the terminals of axons originating in the *locus coeruleus*.

From the above results illustrating the structural relation of axon terminals to capillary walls it may be concluded that in the motor, limbic and visual cortex a functional interdependence between the "close" terminals and the capillary walls exists. The results presented require further investigations with the use of different methods.

NACZYNNIA WŁOSOWATE MÓZGU

II. Zakończenia nerwowe naczyń włosowatych
w różnych częściach kory mózgowej kota i szczura

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie stosunku zakończeń nerwowych do ściany naczyń włosowatych w korze ruchowej, limbicznej i wzrokowej kota i szczura. Badania wykonano na 3 kotach i 10 szczurach.

Stwierdzono, że kolbki synaptyczne „bliskie” były oddzielone od błony podstawnej naczyń cienką wypustką glejową, bądź przylegały bezpośrednio do błony podstawnej na małym odcinku.

Liczba „bliskich” zakończeń nerwowych przypadających na 1 naczynie była różna w badanych polach u obu badanych gatunków. Stwierdzono również pewne różnice i podobieństwa międzygatunkowe w liczbie zakończeń nerwowych przypadających na 1 naczynie. Te różnice, jak również morfologiczna reakcja błony „bliskich” zakończeń nerwowych i wypustek glejowych w okolicy naczyń włosowatego, sugerują możliwość czynnościowej zależności między zakończeniem nerwowym i ścianą naczynia.

КАПИЛЛЯРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

II. Нервные окончания капилляров
в разных частях мозговой коры кошки и крысы

Резюме

Целью работы было исследование отношения нервных окончаний к стенке капилляров в двигательной, лимбической и зрительной мозговой коре кошки и крысы. Исследования были проведены на 3 кошках и 10 крысах.

Констатировано, что „близкие” синаптические колбочки были отделены от базальной оболочки сосуда тонким глиозным отростком, или же прилегал непосредственно к базальной оболочке на малом отрезке.

Число „близких” нервных окончаний приходящихся на 1 сосуд было неодинаково в исследуемых полях у обоих исследованных видов. Констатировано также некоторые различия и межвидовые сходства относительно нервных окончаний приходящихся на 1 сосуд. Эти различия, а также морфологическая реакция оболочки „близких” нервных окончаний и глиозных отростков в области капилляра внушают возможность функциональной зависимости между нервным окончанием и стенкой сосуда.

REFERENCES

1. Amtrop O.: Estimation of capillary permeability of inulin, sucrose and manitol in rat brain cortex. *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 110, 337—342.
2. Ando K.: A histochemical study on the innervation of the cerebral blood vessels in bats. *Cell Tis. Res.*, 1981, 217, 55—64.
3. De Bault L. E., Henriquez E., Hart M. N., Cancilla P. A.: Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture. *In Vitro* 1981, 17, 480—494.
4. Dragiev M.: The innervation of cerebral capillaries. *Arch. Anat. Gistol. Embriol.*, 1967, 53, 167—173.
5. Crone C., Olesen S. P.: Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* 1982, 241, 49—55.

6. Edwards D. A., Garlick D.: An ultrastructural study of the blood-brain barrier in the rat. In: *Progress in Microcirculation Res.* Ed. D. Garlick, Committee in Postgraduate Med. U.N.S.W., Sydney 1981, 51—54.
7. Goehrlert U. G., Ng Ying Kin N. M. K., Wolfe L. S.: Biosynthesis of prostacyclin in rat cerebral microvessels and the choroid plexus. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 1192—1201.
8. Itakura T., Yamamoto K., Tohyama M., Shimizu N.: Central dual innervation of arterioles and capillaries in the brain. *Stroke* 1977, 8, 360—365.
9. Jokelainen P. T., Webb D. R., Yush E. D.: A combined electron microscopic-microangiographic methodology for cerebrovascular studies. *J. Ultrastruct. Res.* 1980, 71, 116—125.
10. Kobayashi S., Tsukahara S., Sugita K., Nagata T.: Adrenergic and cholinergic innervation of rat cerebral arteries. *Histochemistry*, 1981, 70, 129—138.
11. Lossinsky A. S., Vorbrod A. W., Wiśniewski H. M., Iwanowski L.: Ultra-cytochemical evidence for endothelial channel-lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1981, 53, 197—202.
12. Madison R., Crutcher K. A., Davis J. N.: Sympathohippocampal neurons are inside the blood-brain barrier. *Brain Res.*, 1981, 231, 183—189.
13. Narkiewicz O., Juraniec J., Wrzołkowa T.: Ultrastruktura synaps a zróżnicowanie czynnościowe ciała migdałowatego. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 1975, 5, 43—60.
14. Owman Ch., Edvinsson L., Hardebo J. E., Gröschel-Stewart V., Unsicker K., Walles B.: Immunohistochemical demonstration of actin and myosin in brain capillaries. *Acta Neurol. Scand.*, 1977, 56, Suppl. 64, 384—385.
15. Owman Ch., Edvinsson L.: Histochemical and pharmacological approach to the investigation of neurotransmitters, with particular regard to the cerebrovascular bed. *Cerebral vascular smooth muscle and its control. Ciba Foundation Symposium.* Elsevier 1978, 56, 275—311.
16. Rennels M. L., Nelson E.: Capillary innervation in the mammalian central nervous system: an electron microscopic demonstration. *Amer. J. Anat.*, 1975, 144, 233—241.
17. Stefanovich V., Gojowczyk G.: Transport of 2-deoxy-(H)glucose in microvessels isolated from bovine cerebral cortex. *Neurochem. Res.*, 1981, 6, 431—440.
18. Vorbrod A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Iwanowski L.: Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scarpie infected mice. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1981, 53, 203—211.
19. Wrzołkowa T., Cofta T., Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain: I. Vascularisation density of various parts of the cerebral cortex in the cat and rat. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 77—83.

Authors' address: Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Medical Biology, Medical School. 1, Dębinki Str., 80—210 Gdańsk

LUBOMIRA DYDYK, RYSZARD PLUTA

WPŁYW WYSOKIEJ TEMPERATURY NA ULTRASTRUKTURĘ KORY MÓZGU I SUBSTANCJI BIAŁEJ PODKOROWEJ KRÓLIKA

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

Jednym z najczęściej badanych czynników środowiskowych oddziałujących na ustrój żywy jest temperatura. Wyniki badań nad jej wpływem na układ nerwowy są często kontrowersyjne, a badania mikroskopowo-elektronowe ośrodkowego układu nerwowego w warunkach hipolub hipertermii są nieliczne. W związku z powyższym na podstawie prac, które wykazały wzrost zużycia tlenu przez mózg zwierząt poddanych przegrzaniu (Meyer, Handa 1967; Nemoto, Frankel 1970; Carlson i wsp. 1976), przystąpiono do badania wpływu wysokiej temperatury na ultrastrukturę kory mózgu. O wyborze właśnie tej bogato komórkowej struktury zdecydowało duże zużycie tlenu, które wykazuje kora mózgu w warunkach normotermii. Przyjęto zatem, że zmiany spowodowane przez hipertermię w tkance nerwowej mózgu powinny wystąpić najwyraźniej w korze. Ponadto postanowiono sprawdzić, czy u zwierząt poddanych działaniu wysokiej temperatury istnieją różnice w obrazach mikroskopowo-elektronowych kory ruchowej i kory czuciowej, a także prześledzić wpływ przegrzania na ultrastrukturę substancji białej podkorowej.

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 12 królikach albinotycznych, obojga płci, o masie ciała 2,6—3,9 kg. Doświadczenia prowadzono w komorze termicznej o wymiarach 90 × 40 × 40 cm. Temperatura w komorze utrzymywana była w granicach 38—39°C, natomiast wilgotność względna powietrza w zakresie 45—60%. Czas trwania doświadczenia w tych warunkach wynosił 3 godziny. Doświadczenia rozpoczynano zawsze o tej samej porze dnia (godz. 9⁰⁰), a do komory wkładano króliki pojedynczo. Tem-

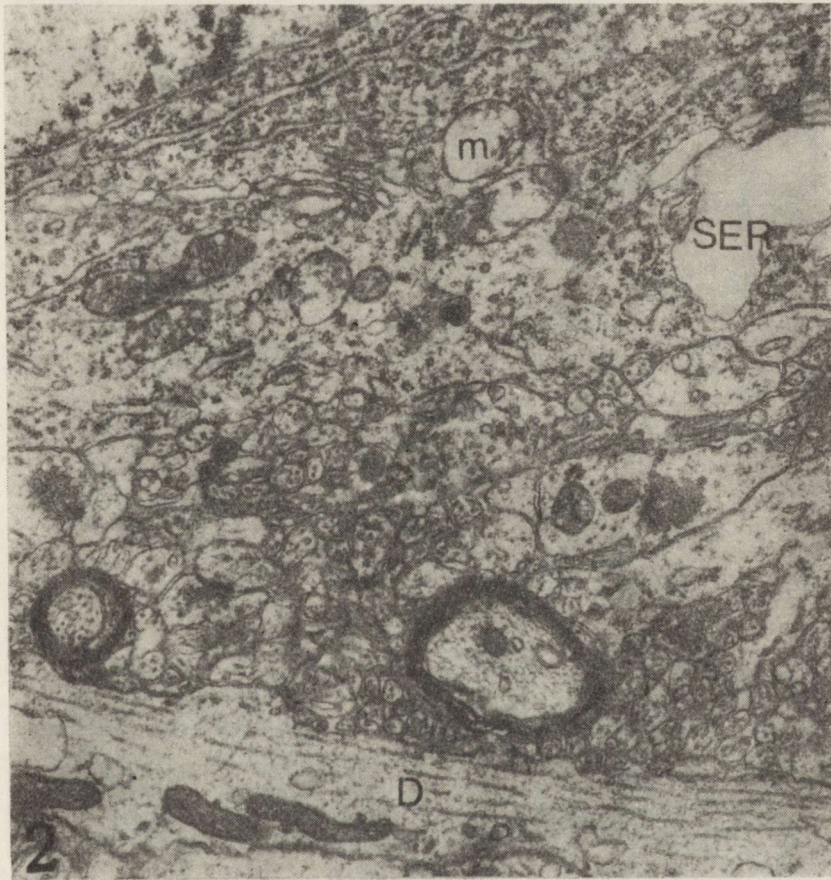
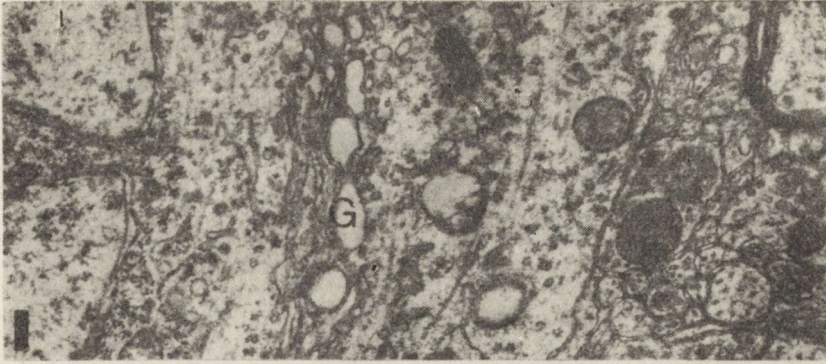
peraturę w komorze termicznej kontrolowano przy pomocy czujnika platynowego oraz trzech termometrów rtęciowych. Temperaturę rejestrowano przy użyciu 12-kanalowego rejestratora typu MKV/T12, firmy VEB Messgeratwerk Erich Weinert (Magdeburg NRD), w połączeniu z przedwzmacniaczem.

Materiał do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano bezpośrednio oraz po 3, 6 i 24 godzinach po doświadczeniu. Króliki usypiano Vetbutalem w dawce 40 mg/kg masy ciała. Perfuzję wykonywano 3% roztworem aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,3. Płyn perfuzyjny podawano przez lewą komorę serca do tętnicy głównej wstępującej, przy równoczesnym zaciśnięciu tętnicy głównej zstępującej i nacięciu prawego przedsionka serca. Mózg wyjęty z czaszki pozostawiano w płynie perfuzyjnym w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Wycinki z ruchowej i czuciowej kory mózgu oraz z podkorowej substancji białej wkładano na 2 godziny do 0,1 M buforu kakodylanowego o pH 7,3, a następnie utrwalano w 2% roztworze czterotlenku osmu w tym samym buforze przez 2 godziny. Utrwalony materiał odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu, zatapiano w Eponie 812 i skrawano na ultramikrotomie LKB. Półciennie skrawki służące do kontroli pobrania materiału z właściwego miejsca barwiono błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, następnie oglądano oraz wykonywano zdjęcia w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

WYNIKI

Obrazy mikroskopowo-elektronowe wykazywały podobne zmiany w ultrastrukturze ruchowej i czuciowej kory mózgu.

Bezpośrednio po doświadczeniu w cytoplazmie perykarionów komórek nerwowych stwierdzono poszerzone zbiorniki układu Golgiego, obrzmiałe mitochondria z jasną macierzą i odsuniętymi na obwód grzebieniami, pojedyncze ciała gęste (ryc. 1) oraz szerokie kanały gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 2). W dendrytach, z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej, obserwowano szerokie zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej i pojedyncze obrzmiałe mitochondria. W licznych aksonach końcowych z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej pęcherzyki synaptyczne skupiały się w pobliżu szczeliny synaptycznej (ryc. 2). Zmiany w perykarionach i wypustkach komórek glejowych zaznaczały się przede wszystkim w astrogleju przynacyniowym. Najczęściej polegały one na małej gęstości elektronowej cytoplazmy ubogiej w organelle subkomórkowe (ryc. 3). Rzadziej obserwowano znaczne poszerzenie kanałów gładkiej siateczki śródplazmatycznej, przy dobrze zachowanych mitochondriach (ryc. 4). W cytoplazmie komórek śródbłonka naczyń przedwłosowatych występowały liczne pęcherzyki pinocytarne (ryc. 4).

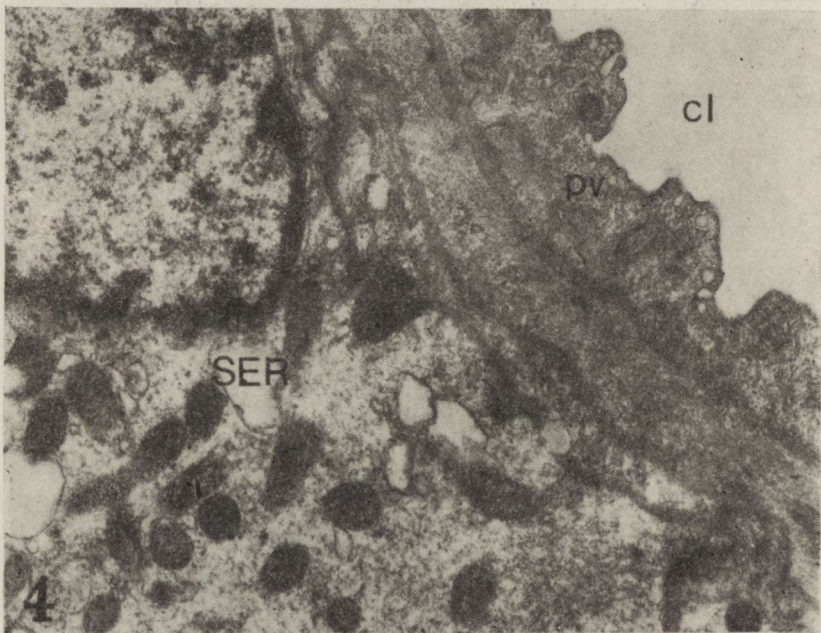


Ryc. 1. Kora czuciowa mózgu, bezpośrednio po doświadczeniu. Poszerzone zbiorniki układu Golgiego (G) w komórce nerwowej. Pow. 8 900 ×

Fig. 1. Sensory cerebral cortex, immediately after experiment. Dilated cysternae of Golgi apparatus (G) in neuron. × 8 900

Ryc. 2. Kora ruchowa mózgu, bezpośrednio po doświadczeniu. Szeroki kanał gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) i obrzmienie mitochondriów (m) w komórce nerwowej. Dendryt (D). Pow. 8 900 ×

Fig. 2. Motor cerebral cortex, immediately after experiment. Large channel of smooth endoplasmic reticulum (SER) and swelling of mitochondria (m) in neuron. Dendrite (D). × 8 900

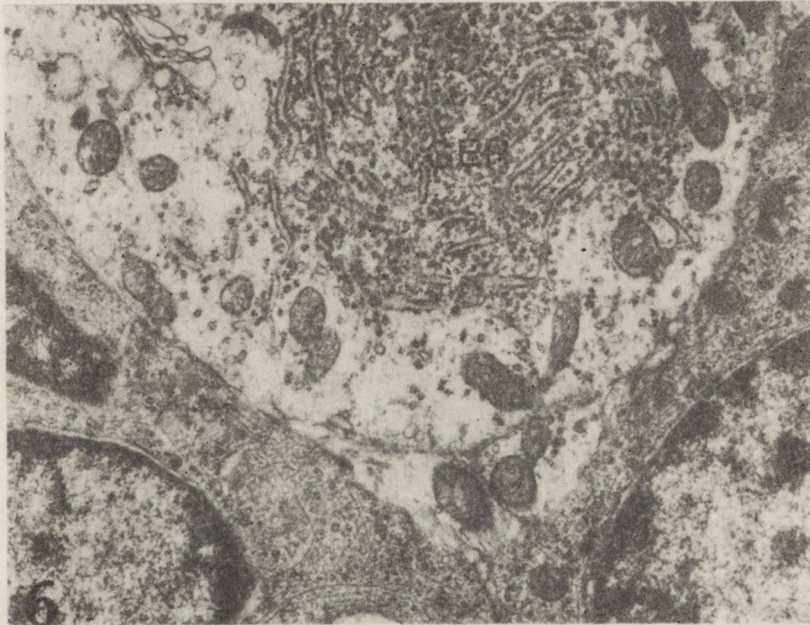
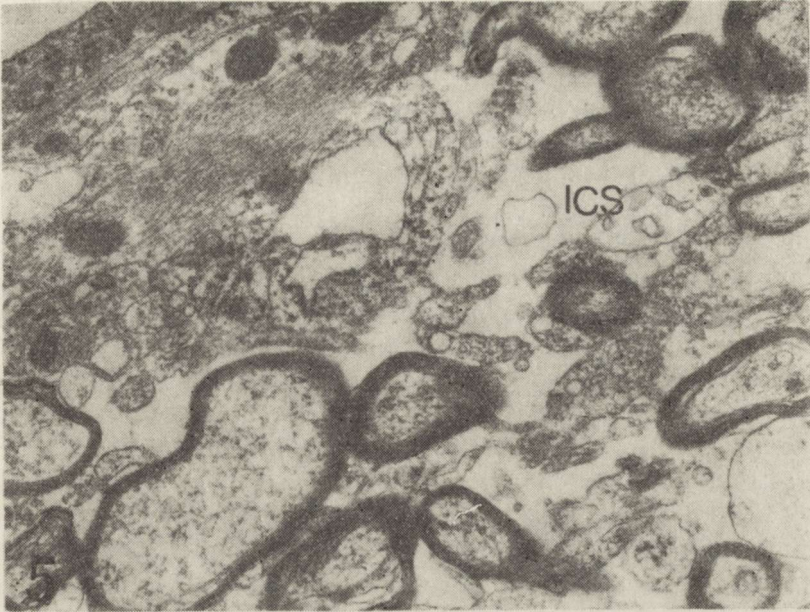


Ryc. 3. Kora ruchowa mózgu, bezpośrednio po doświadczeniu. Obrzmienie okołonaczyniowej wypustki astrocytu (ast). Światło naczynia włosowatego (cl). Pow. 13 350 ×

Fig. 3. Motor cerebral cortex, immediately after experiment. Swelling of perivascular astrocytic process (ast). Capillary lumen (cl). × 13 350

Ryc. 4. Kora ruchowa mózgu, bezpośrednio po doświadczeniu. Szerokie kanały gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) w komórce astrogleju i liczne pęcherzyki pinocytarne (pv) w cytoplazmie komórki śródbłonna naczynia włosowatego. Światło naczynia włosowatego (cl). Pow. 13 350 ×

Fig. 4. Motor cerebral cortex, immediately after experiment. Large channels of smooth endoplasmic reticulum (SER) in astroglial cell and numerous pinocytotic vesicles (pv) in cytoplasm of capillary endothelial cell. Capillary lumen (cl). × 13 350



Ryc. 5. Substancja biała podkorowa, bezpośrednio po doświadczeniu. Szerokie przestrzenie międzykomórkowe (ICS). Pow. 13 350 ×

Fig. 5. Subcortical white matter immediately after experiment. Wide intercellular spaces (ICS). × 13 350

Ryc. 6. Kora ruchowa mózgu, 3 godziny po doświadczeniu. Komórka nerwowa z cytoplazmą o zmniejszonej gęstości elektronowej i skupionymi kanałami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (GER). Pow. 13 350 ×

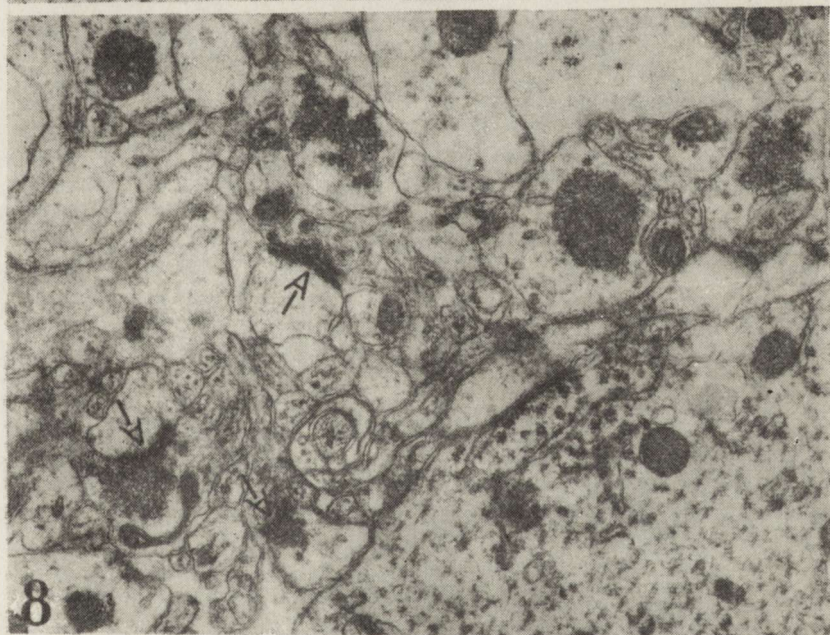
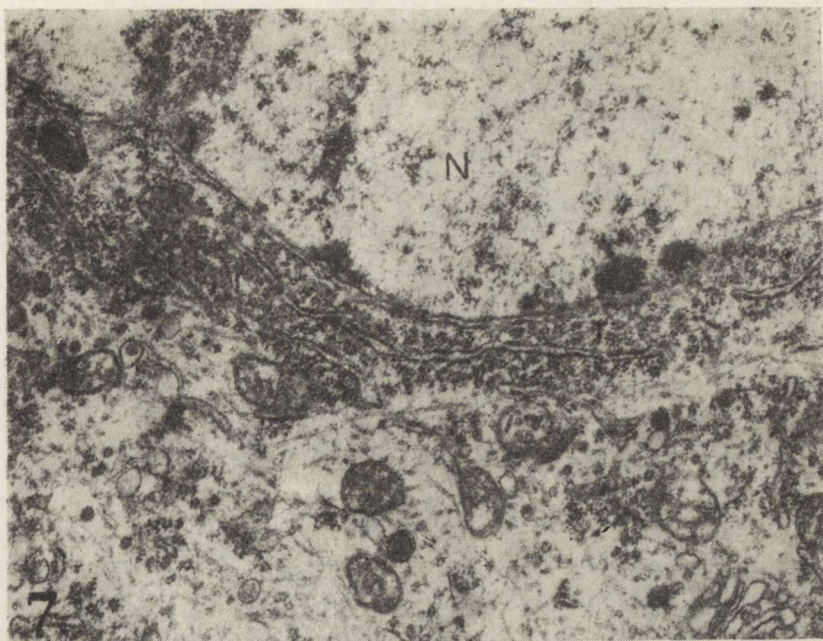
Fig. 6. Motor cerebral cortex, 3 hrs after experiment. Neuron cytoplasm with decreased electron density and with collected channels of granular endoplasmic reticulum (GER). × 13 350

W substancji białej podkorowej przestrzenie międzykomórkowe były szerokie (ryc. 5).

Trzy godziny po doświadczeniu w obrazach mikroskopowo-elektronowych kory mózgu występowały dwa typy zmian komórek nerwowych. Pierwszy występował w komórkach z cytoplazmą o zmniejszonej gęstości elektronowej i z gęsto skupionymi kanałami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 6). W drugim typie zmiany polegały na obecności licznych wolnych rybosomów otaczających jądro komórkowe (ryc. 7). W zakończeniach aksonalnych stwierdzono agregację pęcherzyków synaptycznych. W części postsynaptycznej zaznaczało się wyraźne poszerzenie pasa zagęszczenia cytoplazmy przy szczelinie synaptycznej (ryc. 8). Obserwowano liczne komórki astrogleju z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej (ryc. 9). Światło pojedynczych naczyń włosowatych było zwężone (ryc. 10). W substancji białej podkorowej widoczne były komórki astrogleju z mitochondriami o konfiguracji skondensowanej oraz z szerokimi kanałami gładkiej siateczki śródplazmatycznej i szerokimi zbiornikami układu Golgiego.

Sześć godzin po doświadczeniu w cytoplazmie perykarionów komórek nerwowych występowały liczne ciała gęste, obrzmiałe mitochondria i poszerzone zbiorniki układu Golgiego, w sąsiedztwie którego widoczne były liczne pęcherzyki opłaszczone i mniej liczne ziarniste (ryc. 11). W niektórych komórkach nerwowych obserwowano cytoplazmę o małej gęstości elektronowej, skupianie się kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i liczne ciała gęste (ryc. 12). Wyłącznie w korze ruchowej spotykano komórki nerwowe, w jądrze których stwierdzono skupianie się chromatyny w grudki oraz różnego kształtu struktury o wyglądzie nieregularnych torbieli otoczonych pojedynczą błoną. Kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej tych komórek były szerokie (ryc. 13). W przynacyniowych wypustkach astrogleju z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej występowały szerokie zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej oraz mitochondria o konfiguracji skondensowanej. W synapsach aksodendrytycznych i aksospinalnych utrzymywało się poszerzenie pasa zagęszczonej cytoplazmy przy błonie postsynaptycznej (ryc. 14). Obrazy substancji białej podkorowej nie różniły się od opisanych w trzeciej godzinie po doświadczeniu.

Dwadzieścia cztery godziny po doświadczeniu spotykano komórki nerwowe z licznymi rybosomami w pobliżu jądra (ryc. 15) oraz komórki nerwowe, w cytoplazmie których widoczne były liczne mikropęcherzyki o różnej gęstości elektronowej (ryc. 16). Obok nich występowały komórki nerwowe z licznymi rybosomami i polirybosomami w cytoplazmie, z wąskimi, o dużej gęstości elektronowej zbiornikami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej, z licznymi ciałami gęstymi i ze zmianami wakuolarnymi układu Golgiego (ryc. 17). Zmiany w dendrytach, połączeniach synaptycznych, perykarionach i wypustkach astrogleju były podobne do opisanych we wcześniejszych godzinach po doświadczeniu (ryc. 18).

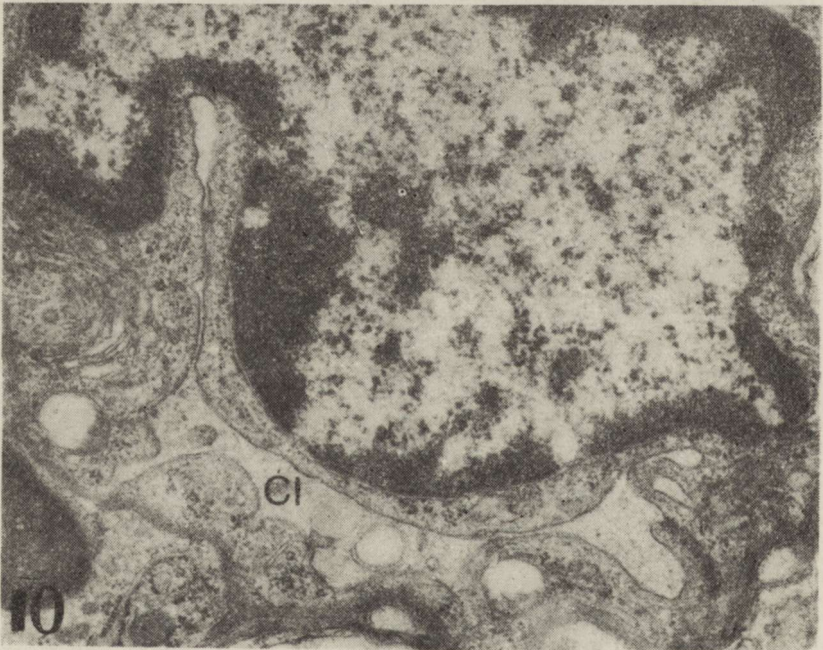
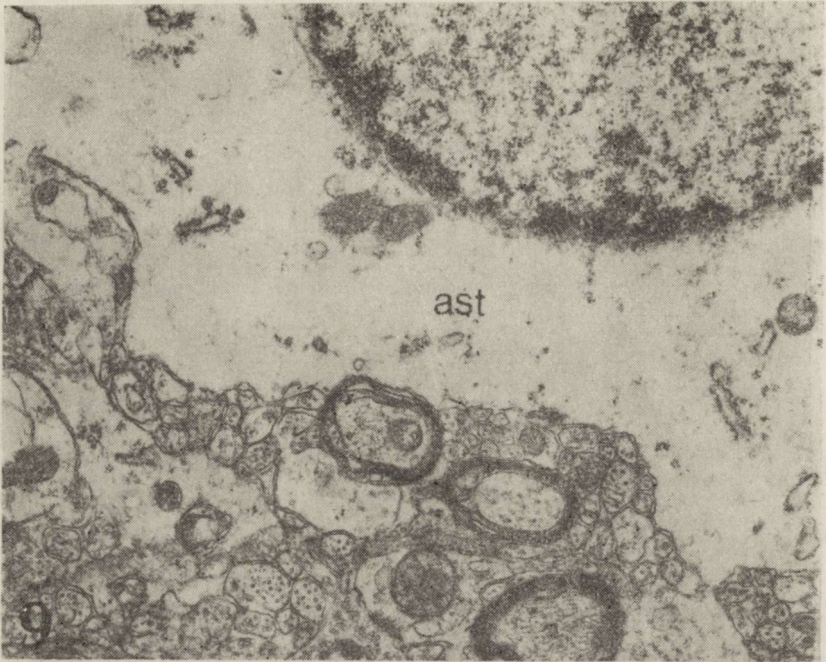


Ryc. 7. Kora czuciowa mózgu, 3 godziny po doświadczeniu. Komórka nerwowa z licznymi rybosomami (r) w cytoplazmie okołojądrowej. Jądro komórkowe (N). Pow. 13 350 X

Fig. 7. Sensory cerebral cortex, 3 hrs after experiment. Neuron with numerous ribosomes (r) in perinuclear cytoplasm. Nucleus (N). X 13 350

Ryc. 8. Kora czuciowa mózgu, 3 godziny po doświadczeniu. Połączenia synaptyczne z poszerzonym zagęszczeniem postsynaptycznym cytoplazmy (strzałki). Pow. 13 350 X

Fig. 8. Sensory cerebral cortex, 3 hrs after experiment. Synaptic junctions with enlarged postsynaptic density of cytoplasm (arrows). X 13 350

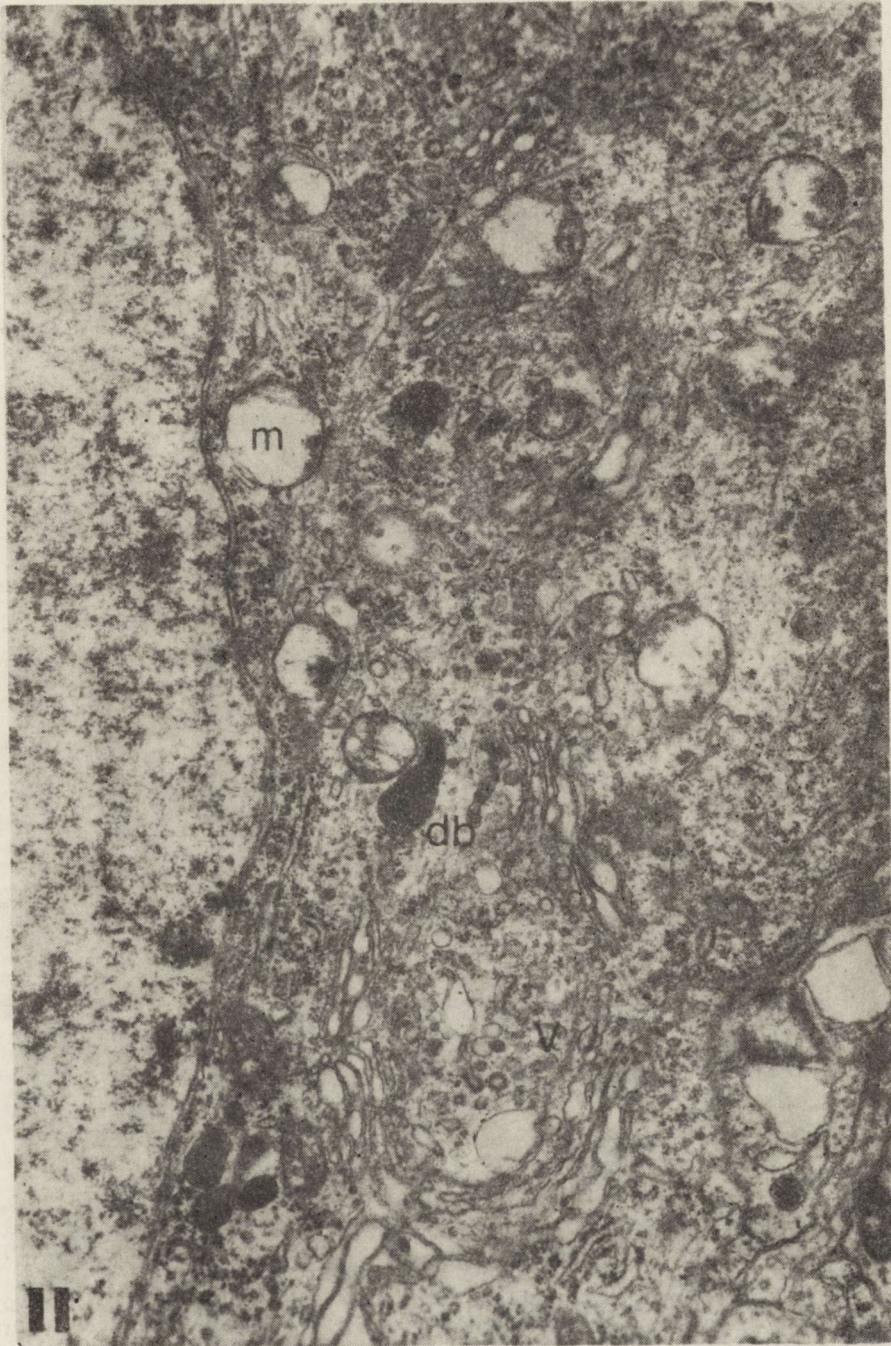


Ryc. 9. Kora ruchowa mózgu, 3 godziny po doświadczeniu. Obrzmienie cytoplazmy astrocytu (ast). Pow. 13 350 ×

Fig. 9. Motor cerebral cortex, 3 hrs after experiment. Swelling of astrocytic cytoplasm (ast). × 13 350

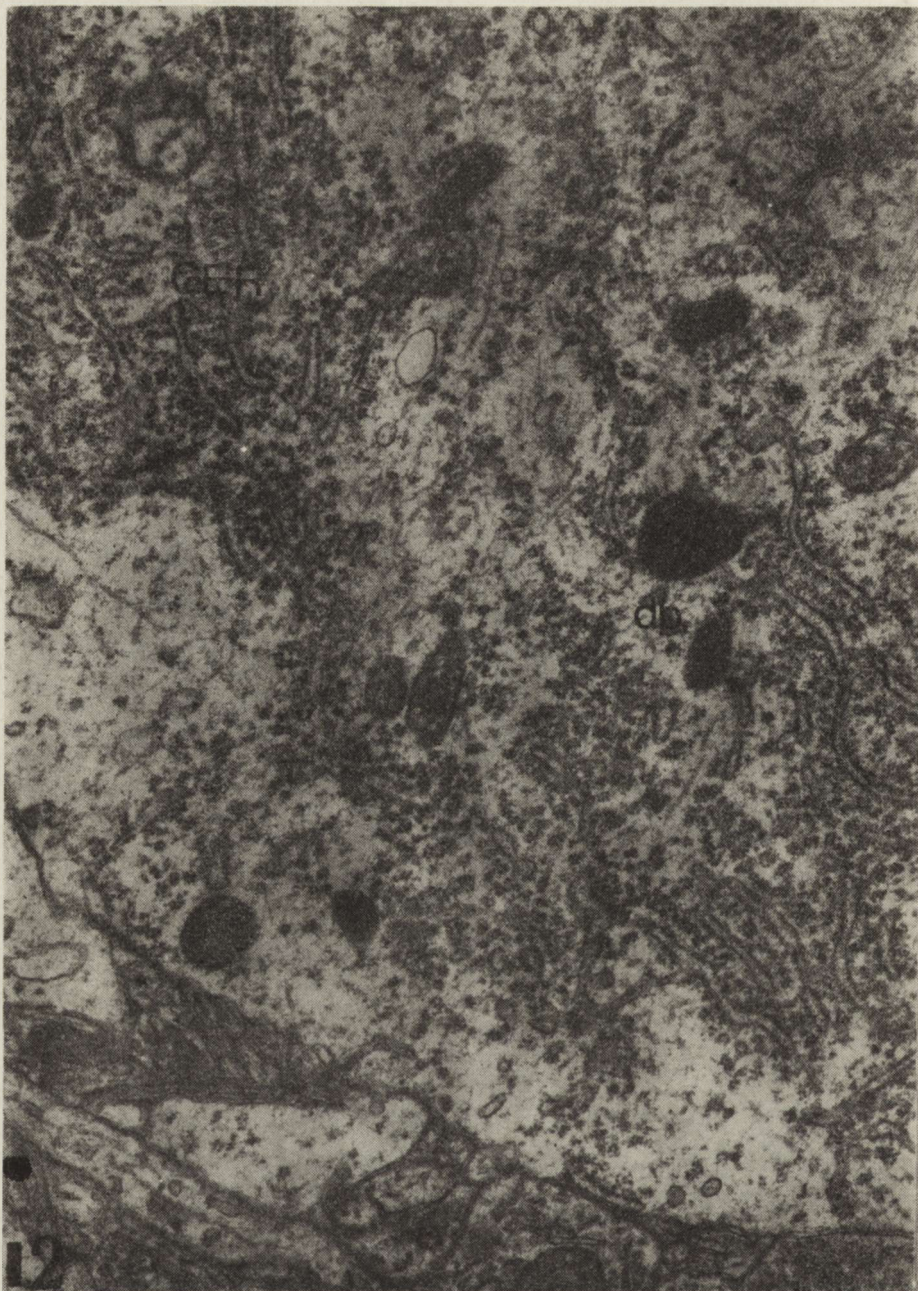
Ryc. 10. Kora ruchowa mózgu, 3 godziny po doświadczeniu. Zwężone światło naczyń włosowatych (Cl). Pow. 13 350 ×

Fig. 10. Motor cerebral cortex, 3 hrs after experiment. Narrowed lumen of capillary (Cl). × 13 350



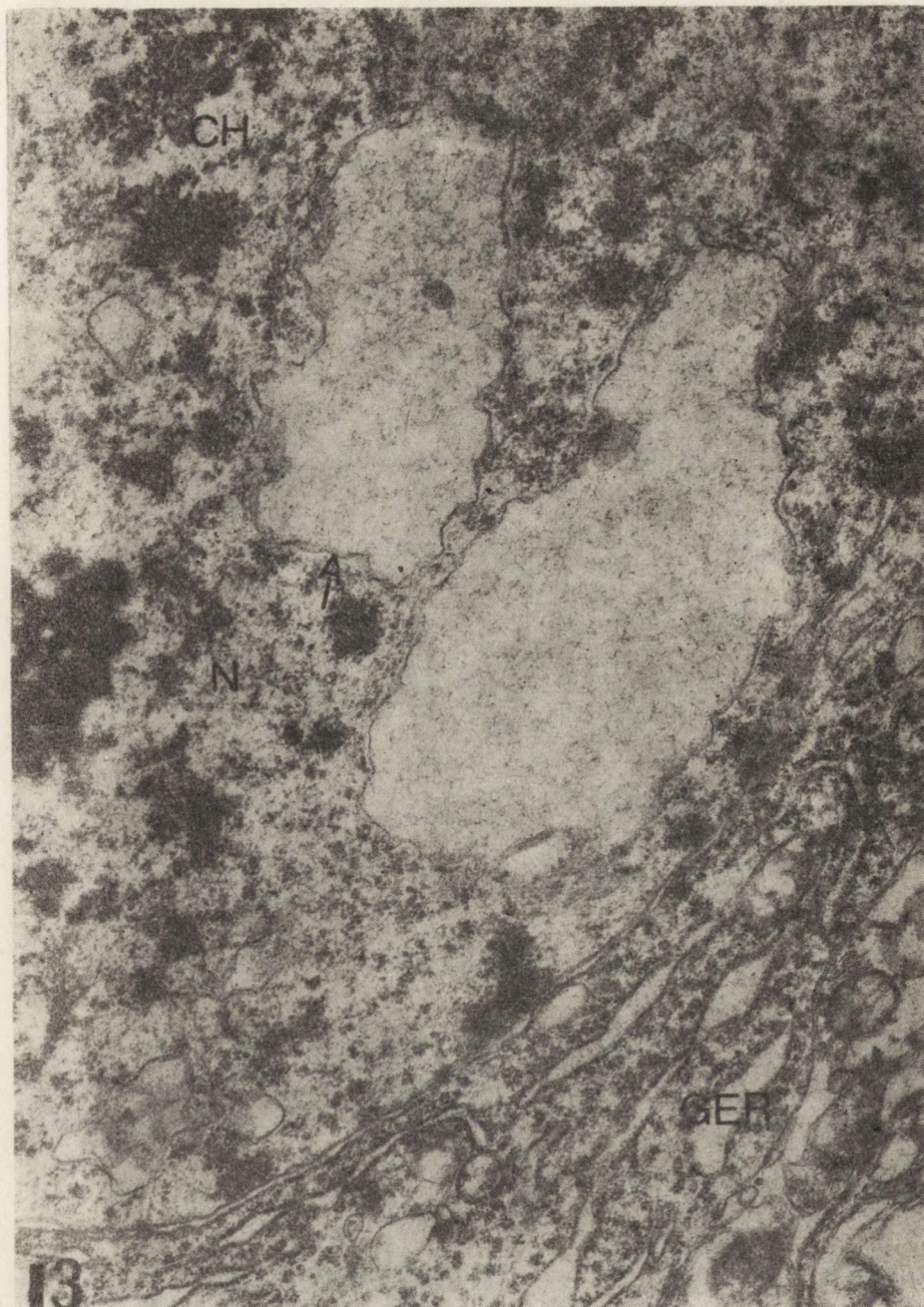
Ryc. 11. Kora ruchowa mózgu, 6 godzin po doświadczeniu. Obrzmiałe mitochondria (m), ciała gęste (db) i liczne mikropęcherzyki (v) w komórce nerwowej. Pow. 11 125 ×

Fig. 11. Motor cerebral cortex, 6 hrs after experiment. Swollen mitochondria (m), dense bodies (db) and numerous microvesicles (v) in neuron. × 11 125

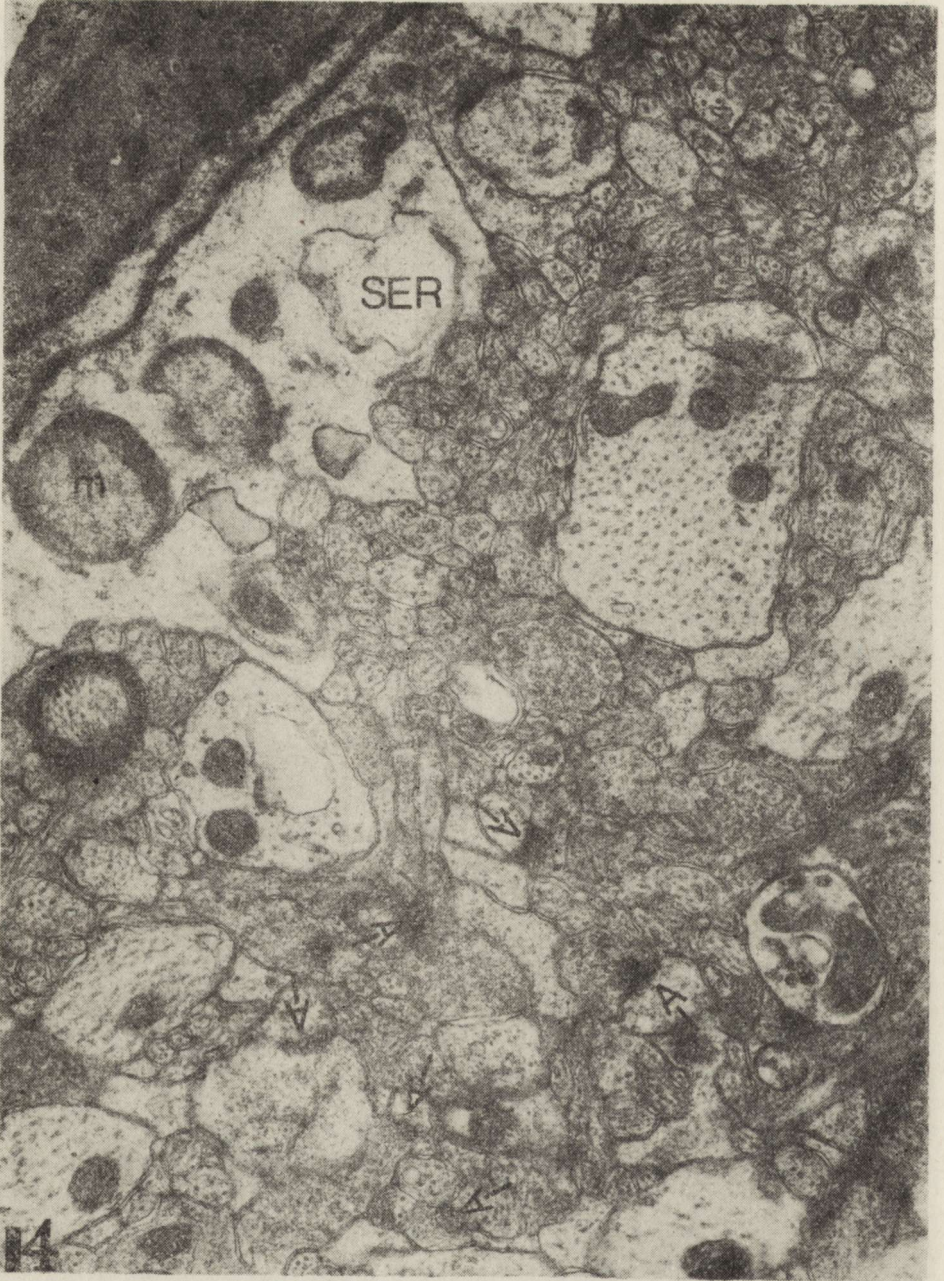


Ryc. 12. Kora czuciowa mózgu, 6 godzin po doświadczeniu. Komórka nerwowa z cytoplazmą o zmniejszonej gęstości elektronowej ze skupieniami kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (GER) i licznymi ciałami gęstymi (db). Pow. 13 350 ×

Fig. 12. Sensory cerebral cortex, 6 hrs after experiment. Neuron cytoplasm with decreased electron density, with accumulations of channels of granular endoplasmic reticulum (GER) and with numerous dense bodies (db). × 13 350

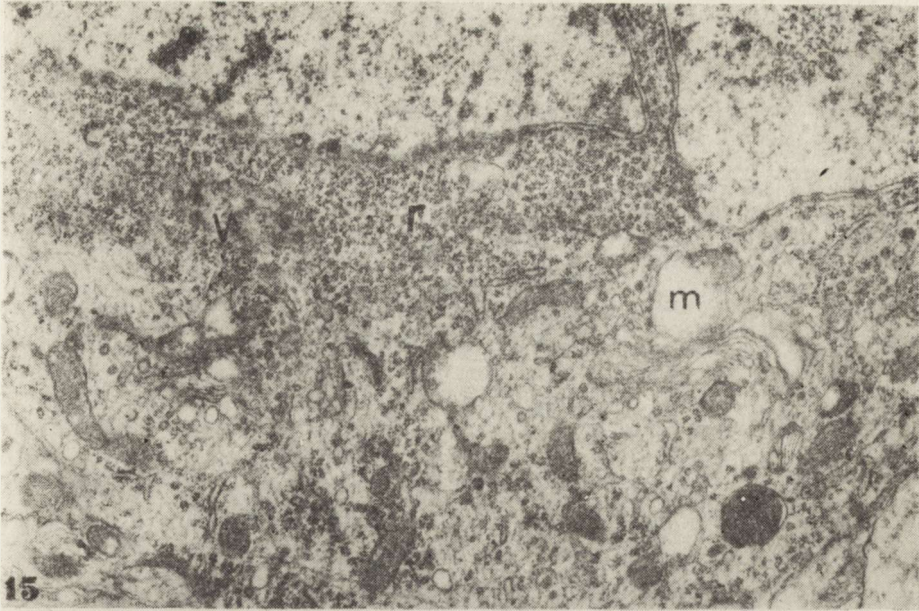


Ryc. 13. Kora ruchowa mózgu, 6 godzin po doświadczeniu. Struktury torbielopodobne (strzałka) w jądrze (N) komórki nerwowej. Grudka chromatyny (CH). Poszerzone kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (GER). Pow. 8 900 \times
Fig. 13. Motor cerebral cortex, 6 hrs after experiment. Vacuole-like structures (arrow) in nucleus (N) of neuron. Chromatin clumping (CH). Dilated channels of granular endoplasmic reticulum (GER). $\times 8 900$



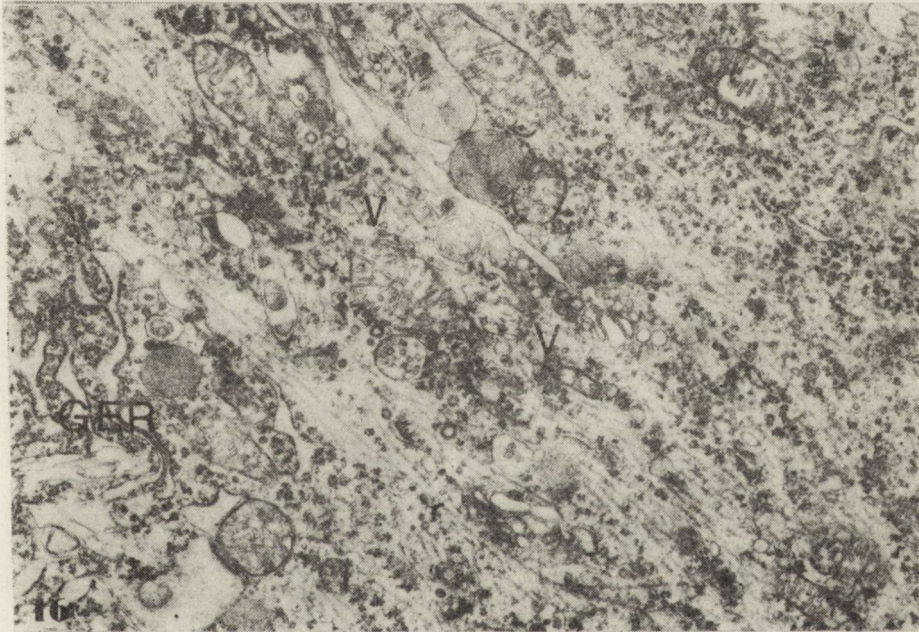
Ryc. 14. Kora czuciowa mózgu, 6 godzin po doświadczeniu. Szeroki kanał gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) i mitochondria o konfiguracji skondensowanej (m) w cytoplazmie przynaczyniowej wypustki astrocytu. Połączenia synaptyczne z poszerzonym zagęszczeniem postsynaptycznym cytoplazmy (strzałki) Pow. 13 350 ×

Fig. 14. Sensory cerebral cortex, 6 hrs after experiment. Large channel of smooth endoplasmic reticulum (SER) and condensed mitochondria (m) in cytoplasm of perivascular astrocytic process. Synaptic junctions with enlarged postsynaptic density of cytoplasm (arrows). × 13 350



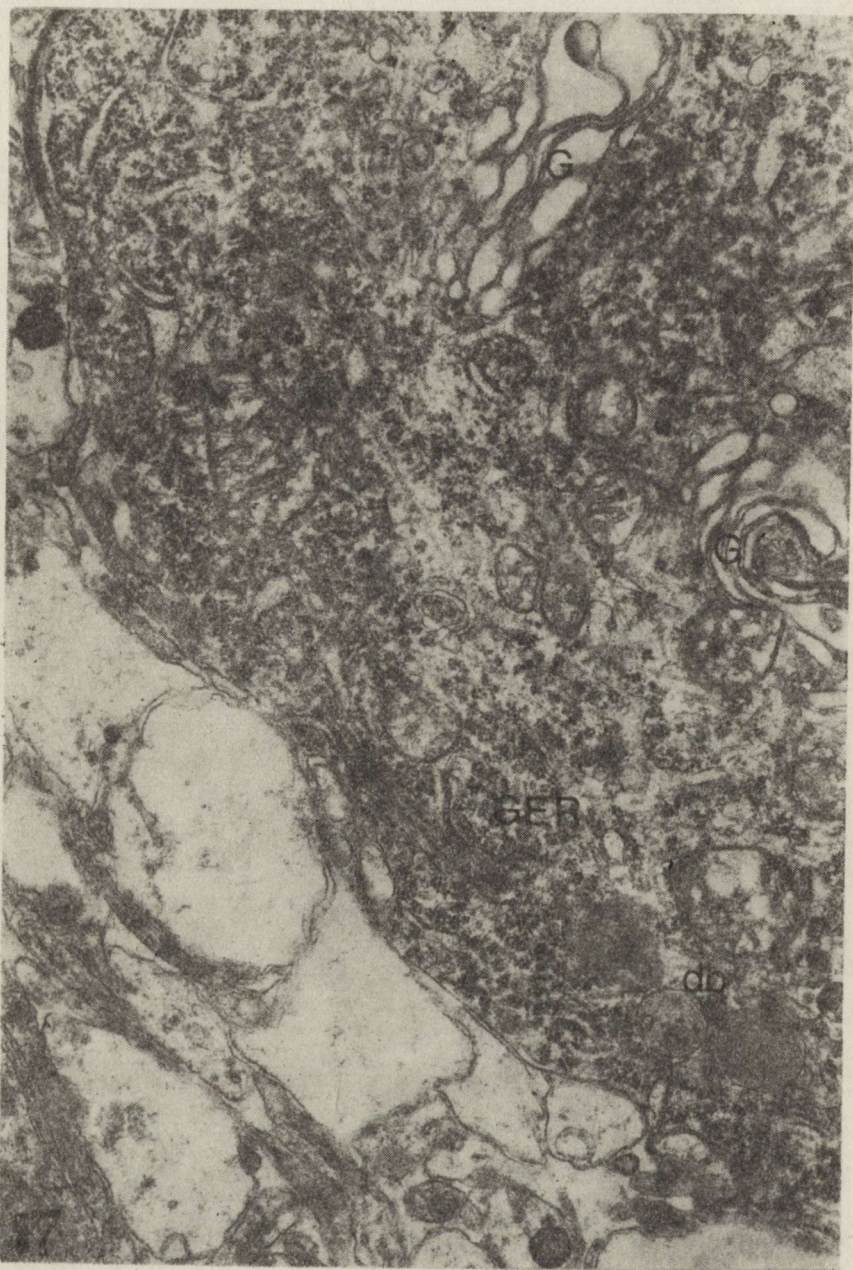
Ryc. 15. Kora ruchowa mózgu, 24 godziny po doświadczeniu. Komórka nerwowa z licznymi rybosomami (r) w przyjądrowej cytoplazmie, z licznymi mikropęcherzykami (v) i obrzmiałymi mitochondriami (m). Pow. 8 900 ×

Fig. 15. Motor cerebral cortex, 24 hrs after experiment. Neuron with numerous ribosomes (r) in perinuclear cytoplasm, with numerous microvesicles (v) and swollen mitochondria (m). × 8 900



Ryc. 16. Kora ruchowa mózgu, 24 godziny po doświadczeniu. Cytoplazma komórki nerwowej z licznymi mikropęcherzykami (v) i z szerokimi cysternami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (GER). Pow. 8 900 ×

Fig. 16. Motor cerebral cortex, 24 hrs after experiment. Neuron cytoplasm with numerous microvesicles (v) and large channels of granular endoplasmic reticulum (GER). × 8 900



Ryc. 17. Kora ruchowa mózgu, 24 godziny po doświadczeniu. Komórka nerwowa z cytoplazmą o zwiększonej gęstości elektronowej ze skupieniami wąskich kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej o zwiększonej gęstości elektronowej (GER), ze zmianami wakuolarnymi układu Golgiego (G) i licznymi ciałami gęstymi (db). Pow. 8 900 ×

Fig. 17. Motor cerebral cortex, 24 hrs after experiment. Neuron cytoplasm with increased electron density, with accumulations of narrow channels of granular endoplasmic reticulum with increased electron density (GER), with vacuolar changes in Golgi apparatus (G) and numerous dense bodies (db). × 8 900



Ryc. 18. Kora czuciowa mózgu, 24 godziny po doświadczeniu. Szeroki kanał gładkiej siateczki śródplazmatycznej (SER) w dendrycie. Mitochondrium o konfiguracji skondensowanej (m) w przynaczyniowej wypustce astrocytu. Połączenia synaptyczne z poszerzonym zagęszczeniem postsynaptycznym cytoplazmy (strzałki). Pow. 11 125 X

Fig. 18. Sensory cerebral cortex, 24 hrs after experiment. Large channel of smooth endoplasmic reticulum (SER) in dendrite. Condensed mitochondrion (m) in perivascular astrocytic process. Synaptic junctions with enlarged postsynaptic density of cytoplasm (arrows). X 11 125

OMÓWIENIE

W obrazach mikroskopowo-elektronowych kory mózgu i substancji białej podkorowej królików poddanych przegrzaniu występują zmiany mogące być wyrazem przejściowego obrzęku mózgu, który utrzymuje się do szóstej godziny po doświadczeniu i ustępuje między szóstą a dwudziestą czwartą godziną po doświadczeniu. Zmiany te polegają na zmniejszeniu gęstości elektronowej cytoplazmy komórek nerwowych i glejowych, na obrzmieniu mitochondriów i poszerzeniu zbiorników ziarnistej siateczki śródplazmatycznej w komórkach nerwowych oraz na poszerzeniu przestrzeni międzykomórkowych w substancji białej podkorowej.

Mechanizm wzrostu wodochłonności komórek tkanki nerwowej mózgu w warunkach hipertermii nie jest wyjaśniony. Według Davisa (1973), regulacja objętości komórki jest ściśle związana z transportem kationów. W związku z przepuszczalnością błony komórkowej dla wody zmiana stopnia transportu czynnego lub przepuszczalności biernej sodu i potasu prowadzi do zmiany stężeń tych kationów w komórce i osmotycznego obrzmienia koloidu komórki. Whittam (1956) oraz Tosteson i Hoffman (1960) wykazali osmotyczne obrzmienie koloidu komórek w warunkach prowadzących do inhibicji czynnego transportu sodu, natomiast Cook (1956) i Tosteson (1964) stwierdzili osmotyczne obrzmienie komórek w stanie zwiększonego biernego wnikania do nich jonów.

Badania Gormana i Marmora (1970), Marchiafavy (1970) oraz Zecevic i Levitana (1980), prowadzone na różnych gatunkach zwierząt poddanych przegrzaniu, wykazały wzrost przepuszczalności błony cytoplazmatycznej komórek nerwowych dla biernego wnikania jonów sodu.

Powstaje pytanie, czy w warunkach hipertermii dochodzi również do hamowania czynnego transportu sodu? Paradoksalne zjawisko wzrostu wentylacji płucnej przy niskim ciśnieniu cząstkowym dwutlenku węgla we krwi tętniczej, które w warunkach hipertermii stwierdzili Albers (1960) oraz Euler i wsp. (1970), można uznać za następstwo bezpośredniego wpływu wysokiej temperatury (Pleschka 1971). Badania prowadzone przez Karczewskiego i wsp. (1973), Grieba i Karczewskiego (1973), Grieba i wsp. (1973) oraz Kapuścińskiego i Karczewskiego (1973) wykazały, że hiperwentylacja, która występuje w warunkach hipertermii przy niskim ciśnieniu cząstkowym dwutlenku węgla we krwi tętniczej, obniża wtórnie to ciśnienie i w ten sposób prowadzi do skurczu naczyń mózgowych oraz niedokrwienia mózgu.

W mózgu zwierząt poddanych działaniu wysokiej temperatury, obok niedotlenienia typu ischemicznego rozwijać się może niedotlenienie typu hipoksyjnego. Wskazują na to badania Carlssona i wsp. (1976), którzy w warunkach hipertermii obserwowali postępujące obniżenie ciśnienia cząstkowego tlenu we krwi tętniczej.

Niedotlenienie ischemiczne i hipoksyjne mózgu hamuje działanie pompy sodowo-potasowej, co prowadzi do wzrostu stężenia jonów sodu w komórkach tkanki nerwowej mózgu, z wtórnym wzrostem ich wodochłonności.

Wzrost zawartości wody w komórkach tkanki nerwowej mózgu zwierząt poddanych przegrzaniu, spowodowany wzrostem biernego wnikania i inhibicją czynnego transportu jonów sodu, stanowi kryterium rozpoznawcze obrzęku cytotoksycznego. Nasze badania, w których obok zmniejszonej gęstości elektronowej cytoplazmy komórek nerwowych i glejowych obserwowano poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych w substancji białej podkorowej, jak również badania Muellera (1979), który u szczurów poddanych wpływowi wysokiej temperatury stwierdził wzrost przepuszczalności bariery krew-mózg, mogą wskazywać, że obrzęk mózgu powstający pod wpływem przegrzania ma cechy nie tylko obrzęku cytotoksycznego, lecz także naczyniopochodnego.

Drugą zmianą stwierdzoną w badaniach mikroskopowo-elektronowych kory mózgu jest zwężenie światła pojedynczych naczyń włosowatych, obserwowane w trzeciej godzinie po doświadczeniu.

Wydaje się, że zjawisko to można wiązać z powrotem do stanu normotermii, w którym ustępuje wpływ wysokiej temperatury powodujący wzrost mózgowego przepływu krwi (Meyer, Handa 1967; Carlsson i wsp. 1976) i z obniżeniem przez hiperwentylację poziomu ciśnienia cząstkowego dwutlenku węgla we krwi tętniczej.

W trzeciej godzinie po doświadczeniu wokół jądra komórek nerwowych obserwowano liczne rybosomy. W dwudziestej czwartej godzinie po doświadczeniu pojawiły się komórki nerwowe z bardzo licznymi rybosomami w całej cytoplazmie perykarionu. Obrazy te sugerują zwiększoną syntezę białek. Sugestię tę może potwierdzać praca Freedmana i wsp. (1981), którzy wykazali, że hipertermia powoduje wzrost syntezy białek mikrosomalnych i synaptycznych.

Obrazy mikroskopowo-elektronowe połączeń synaptycznych, wykazujące poszerzony pas zagęszczenia cytoplazmy przy błonie postsynaptycznej, odpowiadają obrazom frakcji synaptosomalnych mózgu zwierząt poddanych przegrzaniu (Freedman i wsp. 1981). Interpretacja tych obrazów wymaga dodatkowych badań.

Na uwagę zasługuje występowanie w komórkach nerwowych dużej liczby mikropecherzyków. Wydaje się, że zjawisko to może wskazywać na wzrost zachodzących w nich przemian metabolicznych. Wyrazem tego mógłby być wzrost zużycia tlenu przez mózg, obserwowany u zwierząt poddanych przegrzaniu (Meyer, Handa 1967; Nemoto, Frankel 1970). Jednakże przeczą temu prace, które wykazały, że hipertermia nie zaburza metabolizmu komórek tkanki nerwowej mózgu (Nemoto, Frankel 1970; Artru, Gronert 1980).

WNIOSKI

1. Hipertermia prowadzi do przejściowego mieszanego obrzęku mózgu.
2. Powoduje zmiany w obrazach mikroskopowo-elektronowych kory mózgu sugerujące wzrost syntezy białek.
3. Wywiera podobny wpływ na ultrastrukturę kory ruchowej i czuciowej.

**ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ
КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА И БЕЛОГО ПОДКОЖНОГО ВЕЩЕСТВА КРОЛИКА**

Резюме

Работа была проведена на 12 альбинотических кроликах, которые помещали в термической камере на 3 часа. Температура в камере сохранялась в границах 38—39°C, а относительная влажность воздуха колебалась от 45 до 60%. Материал для исследований авторы брали непосредственно и в 3, 6 и 24 часа после эксперимента. Электронно-микроскопные исследования показали, что гипертермия ведет к смешанному, временному отеку головного мозга и вызывает изменения в электронно-микроскопных картинах нервных клеток коры головного мозга внушающие рост синтеза белков. Кроме того констатировано, что у кроликов подвергнутых гипертермии изменения в ultraструктуре клеток двигательной и сенсорной коре головного мозга похожи.

**INFLUENCE OF HYPERTHERMIA ON ULTRASTRUCTURE OF THE CEREBRAL
CORTEX AND SUBCORTICAL WHITE MATTER IN RABBITS**

Summary

The study was carried out on 12 albino rabbits, which were subjected to high surrounding temperature in a thermic chamber for 3 h. The temperature within the chamber ranged from 38 to 39°C, the relative humidity was 45—60%. Material for electron microscopy was taken from the motor and sensory cortex and from subjacent white matter, immediately after the end of experiment and 3, 6 and 24 h later. The study showed that hyperthermia resulted in transient brain edema combining the morphological features of both cytotoxic and vasogenic edematous process, and changes in the ultrastructure of neurons indicating an increase of protein synthesis. Ultrastructural abnormalities in both motor and sensory cortex were essentially similar.

PIŚMIENNICTWO

1. Albers C.: Der Mechanismus des Warmchecheln beim Hund. III. Die CO₂ Empfindlichkeit des Atemzentrums während des Warmchecheln. Pflug. Arch. ges. Physiol., 1961, 274, 166—183.
2. Artru A. A., Gronert G. A.: Cerebral metabolism during porcine malignant hyperthermia. Anesthesiology, 1980, 53, 121—126.
3. Carlsson C., Hagendal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric

- acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001—1006.
4. Cook J. S.: Some characteristics of hemolysis by ultraviolet light. *J. Cell Comp. Physiol.*, 1956, 47, 55—61.
 5. Davis R. P.: Biochemiczne i metaboliczne aspekty transportu. W: *Błony biologiczne*. Red. R. M. Dowben. PZWL, Warszawa 1973, 82—115.
 6. Euler V. C., Herrero F., Wexler I.: Control mechanisms determining rate and depth of respiratory movements. *Respir. Physiol.*, 1970, 10, 93—108.
 7. Freedman M. S., Clark B. D., Cruz T. F., Gurd J. W., Brown I. R.: Selective effects of LDS and hyperthermia on the synthesis of synaptic proteins and glycoproteins. *Brain Res.*, 1981, 207, 129—145.
 8. Gorman A. L. F., Marmor M. F.: Temperature dependence of the sodium-potassium permeability ratio of a molluscan neuron. *J. Physiol. (Lond.)*, 1970, 210, 913—931.
 9. Grieb P., Karczewski W. A.: Changes in the CSF lactates in hyperthermic, hypocapnic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—75) 12—1—12.
 10. Grieb P., Karczewski W. A., Sroczyńska K.: Respiratory responses to hyperthermia in normocapnic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—8) 12—1—11.
 11. Kapuściński A., Karczewski W. A.: The effects of hyperventilation on the cerebral blood flow in normo- and hyperthermic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—11) 11—1—22.
 12. Karczewski W. A., Karczewska E., Rycembel Z.: Thermal polypnoea: response of phrenic nerve activity to hyperthermia and hyperventilation. *IRCS Medical Science* 1973 (73—8) 12—1—12.
 13. Marchiafova P. L.: The effect of temperature change on membrane potential and conductance in *Aplysia* giant nerve cell. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1970, 34, 847—852.
 14. Meyer J. S., Handa I.: Cerebral blood flow and metabolism during experimental hyperthermia. *Minn. Med.*, 1967, 50, 37—44.
 15. Mueller S. M.: Increased blood-brain barrier permeability during hyperthermia in the awake rat. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 1979, 104, 81—83.
 16. Nemoto E. M., Frankel H. M.: Cerebral oxygenation and metabolism during progressive hyperthermia. *Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 1784—1788.
 17. Pleschka K.: Interaction of CO₂ and thermal stimuli in panting. *J. Physiol. (Paris)*, 1971, 63, 383—386.
 18. Tosteson D. C., Hoffman J. F.: Regulation of cell volume by active cation transport in high and low potassium sheep red cells. *J. Gen. Physiol.*, 1960, 44, 169—177.
 19. Tosteson D. C.: Regulation of cell volume by sodium and potassium transport. W: *The cellular functions of membrane transport*. Red. J. F. Hoffman. N. J. Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1964, 89—101.
 20. Whittam R.: Permeability of kidney cortex to chloride. *J. Physiol. (Lond.)*, 1956, 131, 542—548.
 21. Zecevic D., Levitan H.: Temperature acclimation effects on membrane physiology of an identified snail neuron. *Am. J. Physiol.*, 1980, 239, 47—57.

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

MARIA DĄMBSKA, DANUTA MASLIŃSKA, JERZY ONYSZKIEWICZ,
ANNA WILMOWSKA-PIETRUSZYŃSKA

EFFECT OF RECURRENT SEIZURES IN PREGNANT RABBITS ON THE DEVELOPMENT OF FETAL BRAIN

Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish
Academy of Sciences, Warszawa, National Research Institute for Mother
and Child, Warszawa

Epileptic seizures exert a harmful effect on the nervous system (Scholz 1951; Meldrum, Horton 1973) causing often more injury to the immature brain than to the adult one (Fowler 1957; Meldrum et al. 1973; Wasterlain, Plum 1973). The question arises, whether epileptic seizures in the mother during her pregnancy exert also a damaging effect on the developing fetal brain.

The aim of this study was: 1) to verify experimentally if the injurious factors arising in the organism of the mother during seizures effect the fetuses; 2) to evaluate morphologically the influence of the mother's seizures during pregnancy on the development of fetal brain.

MATERIAL AND METHODS

Studies were performed on 5 pregnant rabbits weighing 3—4 kg. Seizures in these animals were evoked by the use of the Pacemaker PM electrostimulator, from the 10th day of pregnancy, by applying electric stimulation of 70 V, 60 Hz for 3 min. Rabbits manifested the "grand mal" type of seizures with a tonic and clonic phase. Gasometric investigation of rabbit blood (pH, pCO₂, pO₂) and verification of glucose level were performed before, immediately after and 1 h 30 min or 2 h after seizures. Rabbits were anesthetized with Eunarcon immediately after the last electroshock on the day of expected delivery and cesarean section was performed. Gasometric investigation immediately after birth and 1 h 30 min later and verification of the blood glucose level of 2 newborn rabbits from each litter were performed. Other newborn were used for morphological examination.

Mature fetuses from 3 rabbits not subjected to electroshocks delivered also by cesarean section served as the control group. Rabbits were decapitated under anesthesia.

For light microscopic examination the sections through the hemisphere at the level of the motor cortex and through the bulbar region were stained with cresyl violet.

Fresh cryostat sections from the bulbar region of fetal brains were used to study succinic dehydrogenase (SDH), and acid phosphatase (Acp) activities. SDH activity was demonstrated by the method of Nachlas et al. (1957). Acid phosphatase activity was revealed by (a) the metal salt method of Gomori, and (b) naphthol AS-TR phosphatase (substrate), Fast blue B (diazonium salt) (Pearse 1972). The material for electron microscopic examination obtained from the same brain regions, was fixed in paraformaldehyde in cacodylate buffer pH 7.2—7.3, postfixed in osmium tetroxide, and embedded in Epon 812. Synapses, axosomatic and between the processes, in the second layer of the motor cortex were counted in 3 control and 3 experimental animals. Two types of synapses were distinguished: 1) immature with single presynaptic vesicles, and 2) more mature with more numerous presynaptic vesicles. They were counted in 10 fields of each grid.

RESULTS

Gasometric investigations in adult rabbits demonstrated appearance of hypoxemia after electroshock (Tab. 1). It lasted up to 1 h 30 min after seizures. The pH level immediately after seizures was significantly lower than before. The difference between pH level before seizures and 1 h 30 min later was statistically not significant. The $p\text{CO}_2$ level immediately after seizure was significantly higher than before. The difference between the $p\text{CO}_2$ level before seizure and 1 h 30 min later was at the limit of statistical significance. The $p\text{O}_2$ level immediately after seizure and 1 h 30 min later was significantly lower than before it. Hypoglycemia was also found in these animals. The glucose level was significantly lower, persisting for 2 h after electroshock (Tab. 2).

In newborn rabbits the comparison between the control and the experimental groups demonstrated in the newborn from mothers treated by electroshock immediately before cesarean section features of hypoxemia (Tab. 3). The pH and $p\text{O}_2$ levels were significantly lower, and the $p\text{CO}_2$ level was significantly higher in the experimental group than in control animals immediately after delivery and 1 h 30 min later. The content of glucose in the blood of newborn rabbits was also significantly lower after seizures of the mother in comparison with its value in the control animals (Tab. 4).

Table 1. Gasometric investigation in pregnant rabbits
Tabela 1. Badania gazometryczne u królic ciężarnych

	pH			pCO ₂			pO ₂		
	\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)
Before seizures									
Przed napadami drgawkowymi	7.40	0.14	(10)	42.00	1.30	(10)	108.00	0.24	(10)
After seizures									
Po napadach drgawkowych	7.30***	0.11	(10)	48.00***	0.36	(10)	60.00***	1.44	(10)
1 hour 30 min after seizures									
1 godz 30 min po napadach	7.40	1.14	(10)	43.00	2.14	(10)	61.00***	2.28	(10)

*** $p < 0.001$

(n) — number of animals
liczba zwierząt

Table 2. Glucose content in blood of pregnant rabbits
Tabela 2. Zawartość glukozy we krwi królic ciężarnych

Before seizures			After seizures			Two hours later		
Przed napadami drgawkowymi			Po napadach drgawkowych			Dwie godziny później		
\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)
88.00	2.37	(10)	65.00***	1.80	(10)	58.00***	1.70	(10)

*** $p < 0.001$

(n) — number of animals
liczba zwierząt

Table 3. Gasometric investigation in newborn rabbits
Tabela 3. Badania gazometryczne u noworodków króliczych

	pH			pCO ₂			pO ₂		
	\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)
Control group									
Grupa kontrolna	7.36	0.04	(6)	42.30	2.38	(6)	86.00	2.54	(6)
Experimental group									
After seizure of mother									
Grupa doświadczalna									
Po napadzie drgawkowym matki	7.16***	0.21	(10)	62.60***	2.18	(10)	42.00***	2.62	(10)
1 hour 30 min later									
1 godz 30 min później	7.25***	2.10	(10)	49.20***	2.54	(10)	53.00***	2.38	(10)

*** $p < 0.001$

(n) — number of animals
liczba zwierząt

Table 4. Glucose content in blood of newborn rabbits
 Tabela 4. Zawartość glukozy we krwi noworodków króliczych

Control group Grupa kontrolna			Experimental group Grupa doświadczalna		
\bar{x}	SD	(n)	\bar{x}	SD	(n)
63.00	0.54	(6)	41.00***	0.14	(10)

*** $p < 0.001$

(n) — number of animals
 liczba zwierząt

Light microscopy: Fetal brains from the control group were compared with those of the experimental one. In the experimental group the cortex was not so well differentiated, regarding the layers and maturity of particular cells, as in the control group. Similar differences were observed in the brain stem as far the appearance of the nerve cells was concerned. Neither necrosis nor neuronal injury were noted in the experimental group.

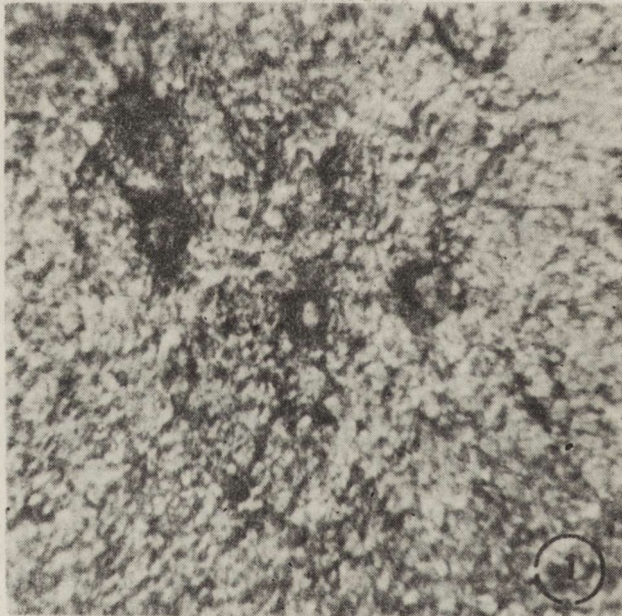


Fig. 1. Control group. Activity of succinic dehydrogenase localized in perikarya of motor neurons (*nuc. n. hypoglossi*) and in neuropil of the brain stem. $\times 400$
 Ryc. 1. Grupa kontrolna. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej zlokalizowana w perykarionach neuronów ruchowych (jądro n. XII) i w neuropilu pnia mózgu.
 Pow. 400 \times

In the control group of animals the activity of succinate dehydrogenase was demonstrated in the perikarya and neuropil of the brain stem motor neurons (*nuc. n. hypoglossi*) (Fig. 1). In experimental animals the activity of this enzyme was localized mainly in the perikarya of neurons, but it was very low in neuropil (Fig. 2). Acid phosphatase activity was slightly higher in the experimental group of animals than in the control one.

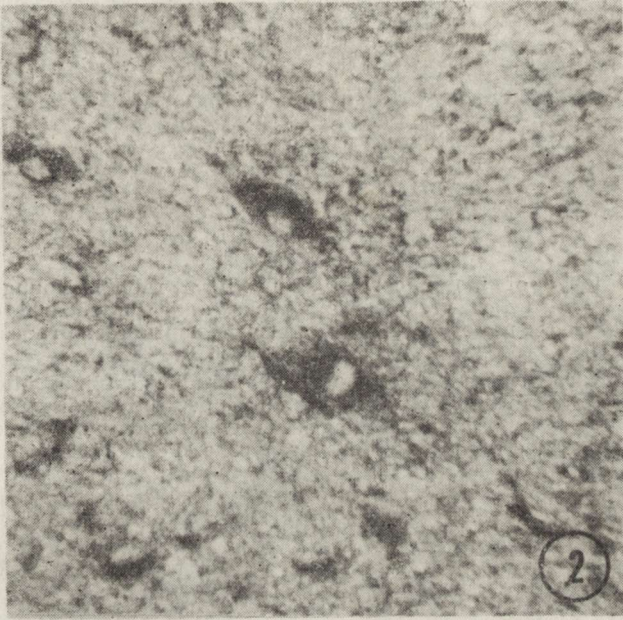


Fig. 2. Experimental group. Succinic dehydrogenase activity localized mainly in perikarya of motor neurons (*nuc. n. hypoglossi*) and very low in the neuropil of the brain stem. $\times 400$

Ryc. 2. Grupa doświadczalna. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej zlokalizowana głównie w perykarionach neuronów ruchowych (jądra n. XII), a bardzo niska w neuropilu w pniu mózgu. Pow. 400 \times

Electron microscopy: Second external layers of the motor cortex verified in semithin sections revealed that in the control group most of the nerve cells were neuroblasts with large nucleus, numerous ribosomes and single channels of rough endoplasmic reticulum. The majority of synaptic junctions were synapses between the neuronal processes in early stages of development with few presynaptic vesicles and symmetrical distribution of electron-optically dense material on both synaptic membranes (Fig. 3). Some of them had more or less numerous presynaptic vesicles and a thin layer of electron-optically dense material on the postsynaptic membrane (Fig. 4). Axosomatic junctions were very scarce and usually containing only 1—2 synaptic vesicles. In the expe-

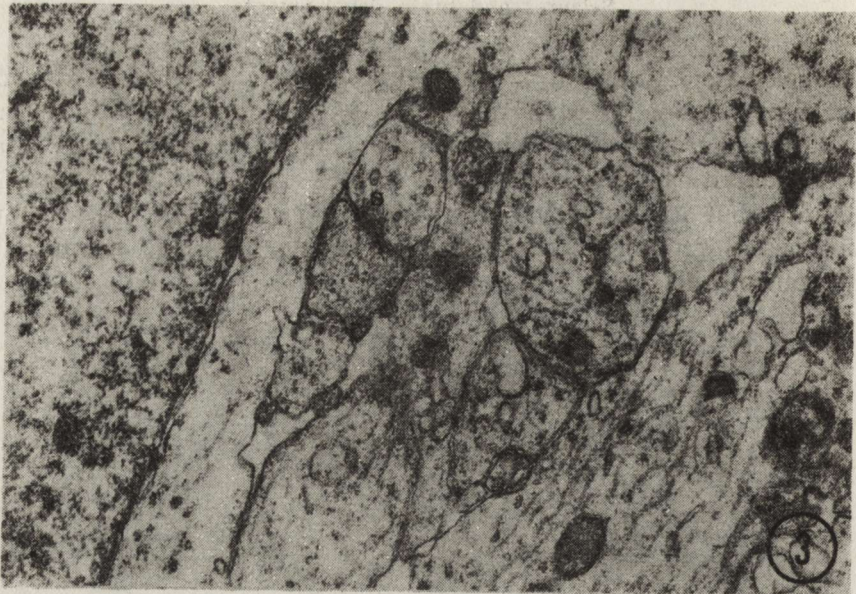


Fig. 3. Second layer of motor cortex of newborn rabbit. Young axo-dendritic synaptic junction with few presynaptic vesicles and symmetrical distribution of electron-optically dense material in pre- and postsynaptic membranes; s — synaptic junction. $\times 27\ 000$

Ryc. 3. Druga warstwa kory ruchowej u noworodka królika. Młode połączenie synaptyczne międzywypustkowe z nielicznymi pęcherzykami presynaptycznymi i symetrycznie rozłożonym materiałem gęstym elektronowo-optycznie na obu błonach, s — połączenie synaptyczne. Pow. $27\ 000 \times$

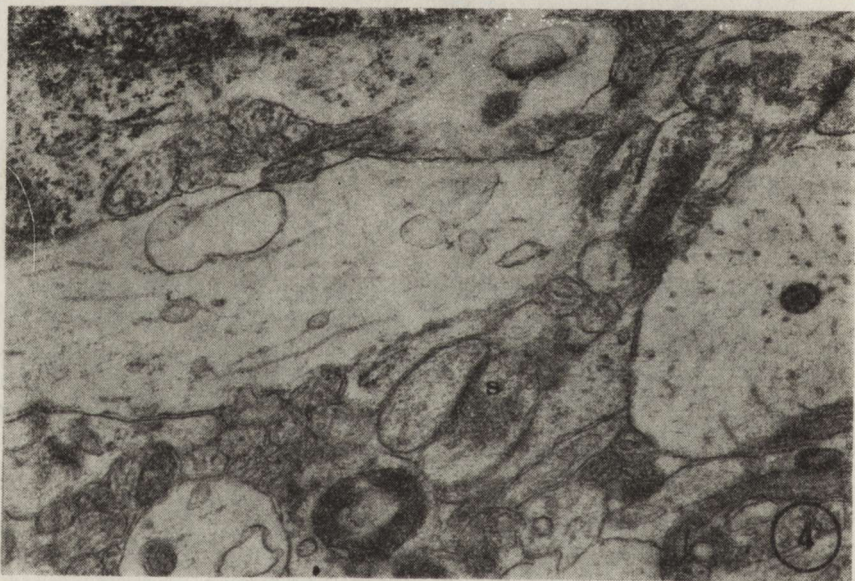


Fig. 4. Second layer of motor cortex of control newborn rabbit. Synaptic junction between processes with presynaptic vesicles and thin layer of electron-optically dense material on postsynaptic membrane; s — synaptic junction. $\times 27\ 000$

Ryc. 4. Druga warstwa kory ruchowej noworodka królika. Międzywypustkowe połączenie synaptyczne z pęcherzykami presynaptycznymi i cienką warstwą elektronowo-optycznie gęstego materiału na błonie postsynaptycznej; s — połączenie synaptyczne. Pow. $27\ 000 \times$

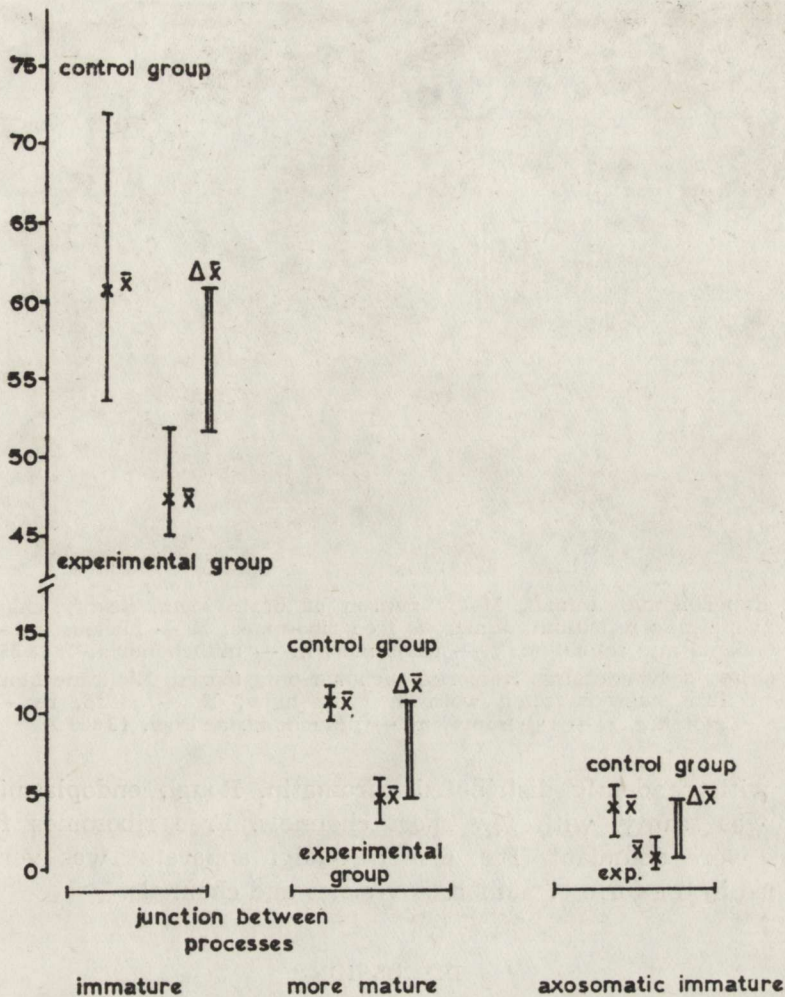


Fig. 5. Average number of synaptic junctions in motor cortex of newborn rabbits
 Ryc. 5. Średnia liczba połączeń synaptycznych w korze ruchowej noworodków króliczych

perimental group these features of immaturity of synaptic junctions in the cortex were more pronounced (Fig. 5).

In the brain stem motor neurons of hypoglossal nuclei were classified on semithin sections. In the control group the cytoplasm of motor neurons was abundant. Rough endoplasmic reticulum consisted of numerous narrow channels covered with ribosomes. The Golgi apparatus was composed of few electron-optically empty channels and vesicles. Mitochondria were rather numerous. In experimental group the motor neurons of the tegmental part of the brain stem including those of the hypoglossal nucleus were characterized by large often irregularly shaped

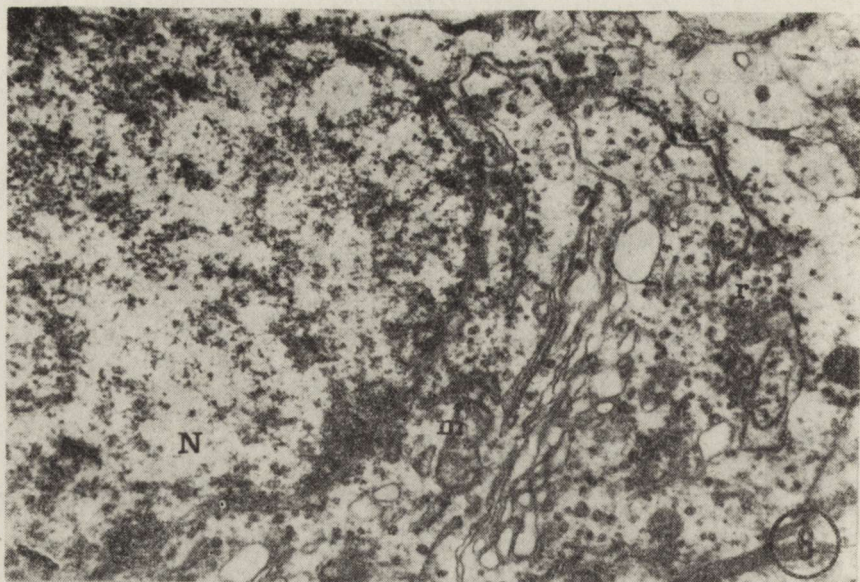


Fig. 6. Experimental animal. Motor neuron of brain stem. Scanty channels of rough endoplasmic reticulum, numerous free ribosomes; N — nucleus, re — rough endoplasmic reticulum, r — ribosomes, m — mitochondria. $\times 13\ 350$

Ryc. 6. Grupa doświadczalna. Komórka ruchowa pnia mózgu. Nieliczne błony siatki szorstkiej, duże nagromadzenie wolnych rybosomów; N — jądro, re — siatka szorstka, r — rybosomy, m — mitochondria. Pow. $13\ 350 \times$

nuclei with randomly distributed chromatin. Rough endoplasmic reticulum was scanty, with few short channels. Free ribosomes forming rosettes were abundant (Fig. 6). The Golgi apparatus was very well developed in the form of numerous vesicles and channels.

DISCUSSION

In the present studies the method of evoking seizures in pregnant rabbits corresponds to that used by Appleton and De Vivo (1974). For evaluation of the influence of seizures in mothers on the fetal brains, oxygenation and glucose content in maternal and fetal blood immediately after and 1 h 30 min or 2 h after electroshock was determined, according to procedure used by Meldrum and Horton (1973; 1974).

Morphological studies of brains of fetuses from mothers subjected during the posttaterogenous phase of pregnancy to 20 electroshocks, did not exhibit any focal injuries. However, comparison of the nervous system of control and experimental animals revealed a retardation of its maturation. Since evaluation of morphological maturity of the nervous system is more or less subjective, different methods were used for its verification. Control and experimental groups were compared on the

basis of comparable morphological features, it means 1) the general appearance of the motor cortex, 2) the number and maturity of synapses in the second cortical layer and 3) the maturity of selected groups of nerve cells in the brain stem. The delay of maturation in the cortex in the experimental group was manifested by lower differentiation visible in the light microscope and an earlier stage of development of synapses as seen in the electron microscope. The maturation of synaptic junctions was estimated according to Gruner and Zahnd (1967) and Jones and Revel (1970). The very low number of axosomatic synapses, which appeared later than junctions between the processes (Vochler et al. 1963) was also considered as a feature of retardation of their development in the experimental group.

In the brain stem the retardation of maturation was expressed by the delayed maturation of neurons visible in the electronmicroscope. Its evaluation was based on general features of cellular immaturity (Caley, Maxwell 1968; Eayrs, Goodhead 1959). Histoenzymatic studies correspond well with the morphological electronmicroscope observations. Lower activity of succinate dehydrogenase in the neuropil of the experimental group may be related to the lack of development of dendritic processes. An elevated activity of acid phosphatase may correspond to interaction between GERL with lysosomes and rough endoplasmic reticulum in the period of intensive maturation (Whaley 1975).

Recurrent seizures in pregnant rabbits as indicated by our observations, constitute a sufficient damaging factor evoking hypoxemia and in consequence retardation of fetal brain development.

WPLYW NAPADÓW DRGAWKOWYCH KRÓLIC CIĘŻARNYCH NA ROZWÓJ PŁODU

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu codziennych napadów padaczkowych królicy ciężarnej w ciągu dwu ostatnich dekad ciąży na rozwój mózgu płodu. Napady drgawkowe wywoływano elektrostymulatorem Pacemaker PM, stosując drażnienie przez okres 3 min i uzyskując napad typu „grand mal”. Stwierdzono, że niedotlenienie i hipoglikemia, występująca po napadach we krwi matki, pojawia się również u płodu i utrzymuje się ponad 1 godz. 30 min. Mózgi donoszonych płodów, uzyskiwanych przez cięcie cesarskie, oceniano w mikroskopie świetlnym i elektronowym. Nie stwierdzono w nich uszkodzeń ogniskowych. Natomiast porównanie układu nerwowego zwierząt doświadczalnych z kontrolnymi pozwoliło na stwierdzenie niewielkiego opóźnienia jego dojrzewania u płodów po doświadczeniu: kora ruchowa była słabiej zróżnicowana, połączenia synaptyczne w jej obrębie mniej rozwinięte. Neurony ruchowe jądra nerwu podjęzykowego wykazywały mniejszą dojrzałość w obrazie mikroskopowo-elektronowym oraz pod względem aktywności histoenzymatycznej.

ВЛИЯНИЕ СУДОРОЖНЫХ ПРИПАДКОВ БЕРЕМЕННЫХ КРОЛЬЧИХ НА РАЗВИТИЕ ПЛОДА

Резюме

Целью работы была оценка влияния ежедневных эпилептических припадков беременной крольчихи в течение двух последних декад беременности на развитие головного мозга плода. Судорожные припадки авторы вызывали электростимулятором Pacemalter PMA-6, применяя раздражения в течение 3 минут и получая припадок типа „grand mal”. Констатировано, что гипоксия и гипогликемия, выступающая после припадков в крови матери, появляются также у плода и удерживаются свыше 1 часа и 30 минут. Мозги доношенных плодов получаемых при помощи кесарева сечения оценивались в световом и электронном микроскопах. Не констатировано в них головных повреждений. Зато сравнение нервной системы экспериментальных животных с контрольными позволило констатировать небольшое замедление созревания этой системы у экспериментальных плодов: двигательная кора была слабее дифференцирована, синаптические соединения в ее пределах менее развиты. Двигательные нейроны ядра подъязычного нерва проявляли меньшую зрелость в электронно-микроскопической картине и в отношении гистохимической активности.

REFERENCES

1. Appleton D. B., de Vivo D. C.: An animal model for the ketogenic diet. *Epilepsia*, 1974, 15, 211—227.
2. Caley D. W., Maxwell D. S.: An electron microscopic study of neurons during postnatal development of the rat cerebral cortex. *J. comp. Neurol.*, 1968, 133, 17—43.
3. Eayrs J. T., Goodhead B.: Postnatal development of the cerebral cortex in the rat. *J. Anat.*, 1959, 93, 385—397.
4. Fowler M.: Brain damage after febrile convulsion. *Arch. Dis. Child*, 1957, 32, 67—76.
5. Gruner J. E., Zahnd J. P.: Sur la maturation synaptique dans le cortex visuel du lapin. In: *Regional development of the brain in early life*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1967, 125—133.
6. Jones D. G., Revel E.: The postnatal development of the synapses. A morphological approach utilizing synaptosomes. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 1970, 111, 195—208.
7. Meldrum B. S., Horton R. W.: Physiology of status epilepticus in primates. *Arch. Neurol.*, 1973, 28, 1—9.
8. Meldrum B. S., Vigoroux R. A., Brierley J. B.: Systematic factors and epileptic brain damage. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 83—87.
9. Meldrum B. S., Horton R. W., Brierley J. B.: Epileptic brain damage in adolescent baboons following seizures induced by ally glycine. *Brain*, 1974, 97, 407—418.
10. Nachlas M. M., Tsou K. C., Sauza E., De Cheng C. S., Seligman A. M.: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. Cytochem.*, 1957, 5, 420—436.
11. Pearse A. G. E.: *Histochemistry. Theoretical and applied*, Vol. 2, Williams Wilkins, Baltimore 1972.
12. Scholz W.: *Die Krampfschädigungen des Gehirns*. Springer Verlag, Berlin 1951.
13. Vochler K., Pappas J. D., Purpura D. G.: Electron microscope study of cat superficial neocortex. *Exp. Neurol.*, 1963, 7, 107—130.

14. Wasterplain C. G., Plum F.: Vulnerability of developing rat brain to electroconvulsive seizures. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 38—46.
15. Whaley W. G.: *The Golgi Apparatus*. Springer Verlag, Berlin, New York 1975.

Authors' address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Pasteura Str., 02—093 Warszawa

MARIA DAŃBSKA, LECH IWANOWSKI, DANUTA MAŚLIŃSKA,
MARIA OSTENDA

BLOOD-BRAIN BARRIER IN YOUNG RABBIT BRAIN AFTER DICHLORVOS INTOXICATION

Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish
Academy of Sciences, Warszawa

Intoxication with Dichlorvos (DDVP), an organophosphorous pesticide and strong inhibitor of acetylcholinesterase (AChE) leads to disorders in the central nervous system (CNS). Regarding the human beings there exists a possibility of acute and chronic intoxications with this substance. This was one of the reasons for studying this problem. During long lasting investigations intoxication with DDVP appeared as the most harmful one for the developing brain (Maślińska, Zalewska 1978a,b). Dichlorvos was applied to young animals during the period of intense maturation of the cerebral and cerebellar cortex and myelination of the white matter. It caused a delay of maturation and provoked irreversible changes in the nervous tissue (Dańska, Maślińska 1981; Maślińska et al. 1981). Electron microscopic examination demonstrated that several neurons, both perikarya and axons, and myelin sheath were damaged (Dańska et al. 1981). Glial cells showed more severe lesions in oligodendrocytes than in astrocytes (Dańska, Maślińska 1982).

Anticholinesterase agents have been known to be capable of increasing the permeability of brain capillaries (Greig, Mayberry 1951). Among them most organophosphorous pesticides change the permeability of vessels in the CNS following chronic poisoning (Clark, Stavinoha 1971; Greig, Holland 1949). The aim of the present study is the observation of the influence of DDVP on vessel walls, the perivascular area and permeability of the barriers in developing brain.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were performed on rabbits. Dichlorvos was given during ten days starting on the 6th day of life. Twelve young rabbits received DDVP per os (9 mg/kg of body weight per day, in 0.1 ml of

oil). Clinically they tolerated this dose relatively well. The brains were examined on the 16th and 32nd days of life. Other eight untreated animals of the same age served as the control group.

Histochemical studies of butyryl- and acetylcholinesterase were performed on 14 μm thick cryostat sections according to Gomori's (1952) and to Karnovsky's method (1964). The preincubation and incubation solutions contained 10^{-5} M 284C51 (Wellcome Res. Lab.) and 10^{-4} M iso-OMPA (Koch-Light) to inhibit specific and nonspecific cholinesterases, respectively. Butyrylthiocholine iodide and acetylthiocholine iodide were used as substrates. Incubation was carried out at 37°C for 3–5 hours. Control reactions without substrates were also performed.

Corpus callosum, motor cortex and cerebellar cortex were studied in the electron microscope after perfusion with 1.5% glutaraldehyde, later postfixed in osmium tetroxide and dehydrated in ethanol. The blocks were embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate and examined in a Tesla 500 electron microscope. Microvessels and the choroid plexus from 3 normal and 3 intoxicated 16-day-old rabbit brains were studied ultracytochemically for transport of the horseradish peroxidase (HRP) protein tracer through the vessel wall as a marker of normal or damaged blood-brain barrier (BBB). In the group of 16-day-old animals, the procedure with HRP, including injection, fixation and incubation was performed according to the modified Karnovsky's method (Lossinsky et al. 1979).

RESULTS

In brain capillary walls of the control rabbits activity of butyryl- and acetylcholinesterase was detected. Acetylcholinesterase (AChE) activity was present only in the vessel walls of some brain regions (e.g. in mesencephalon) (Fig. 1).

In 16-day-old animals treated with Dichlorvos the activity of acetylcholinesterase (Fig. 2) and butyrylcholinesterase was inhibited. In 32-day-old rabbits, which survived 16 days after the last treatment the activity of butyryl- and acetylcholinesterase was the same as in the control animals.

Electron microscopic examination of 16-day-old experimental animals revealed in the vessel walls endothelial cells with numerous ribosomes, abundant rough endoplasmic reticulum, and relatively numerous channels of smooth endoplasmic reticulum. Dense bodies were also encountered. In other endothelial cells of capillary walls a stimulated GERL system was observed (Fig. 3). In the control group of the same age all these features observed in endothelial cells were much less pronounced. In intoxicated animals the astrocytes adjacent to the vessel exhibited rarefaction of cytoplasm, large mitochondria with granular matrix and

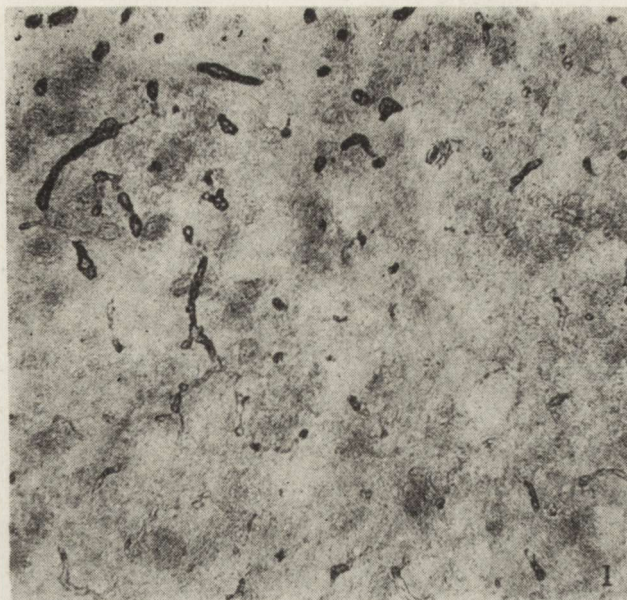


Fig. 1. Acetylcholinesterase activity in the brain of 16-day-old control rabbit
Ryc. 1. Aktywność acetylocholinoesterazy w mózgu 16-dniowego królika — grupa kontrolna

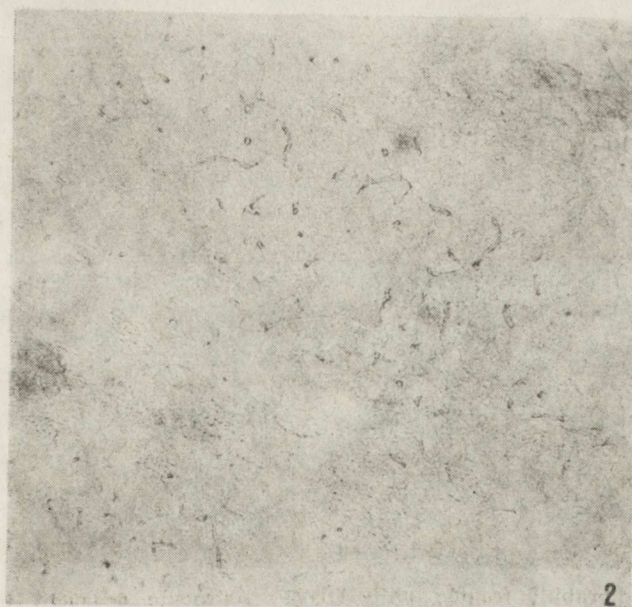


Fig. 2. Acetylcholinesterase activity in the brain of rabbit (16 days old) treated with Dichlorvos (DDVP)
Ryc. 2. Aktywność acetylocholinoesterazy w mózgu 16-dniowego królika po podaniu dichlorfosu

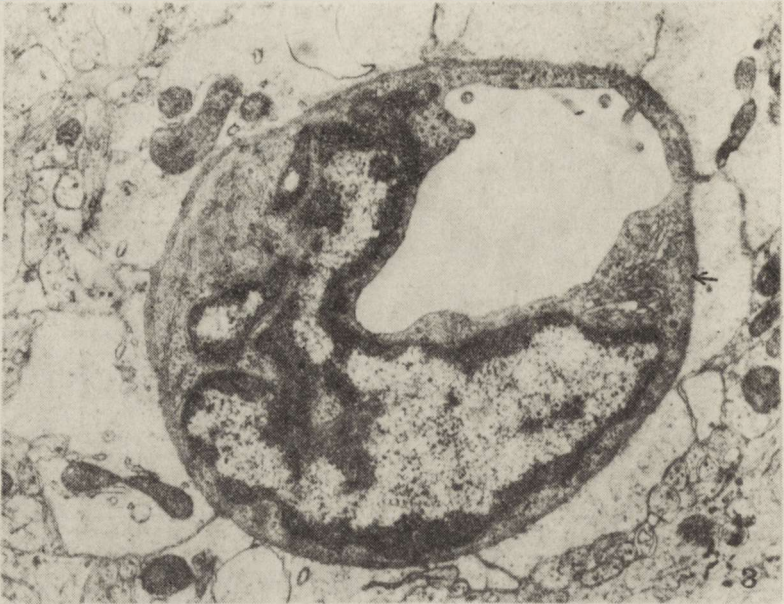


Fig. 3. 16-day-old rabbit treated with DDVP. Distended GERL system in endothelial perikaryon (arrow), glial extension swollen. Primary magn. $\times 5\,000$

Ryc. 3. Królik 16-dniowy po zatruciu DDVP. Poszerzony układ GERL w komórce endotelialnej (strzałka), obrzęk wypustek glejowych. Pow. kliszy $5\,000\times$

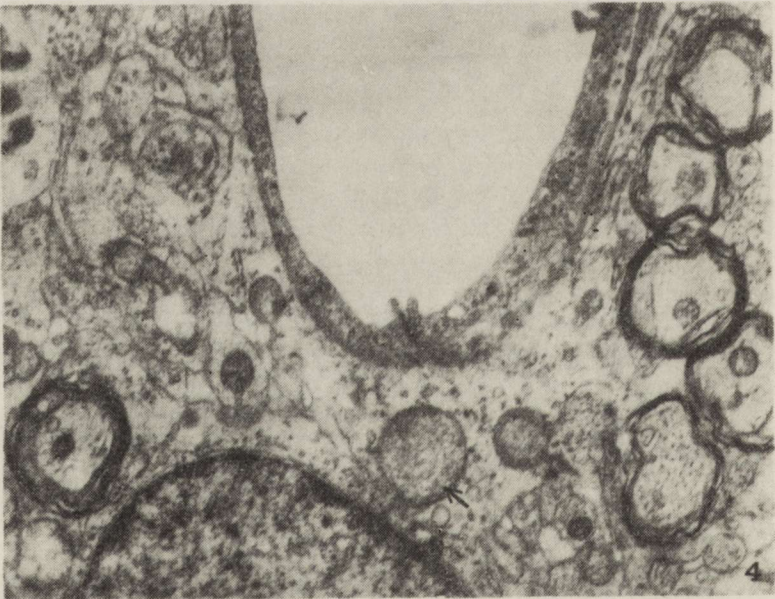


Fig. 4. 16-day-old rabbit treated with DDVP. Astrocyte adjacent to the vessel shows rarefaction of cytoplasm and large mitochondria with granular matrix and peripherally located cristae (arrow). Primary magn. $\times 5\,000$

Ryc. 4. Królik 16-dniowy po zatruciu DDVP. W astrocycie przynaczyniowym cytoplazma jest rozrzedzona, mitochondria duże z ziarnistą macierzą i zepchniętymi na obwód grzebieniami (strzałka). Pow. kliszy $5\,000\times$

short peripherally located cristae (Fig. 4). The rarefaction of cytoplasm was most often visible in the perivascular end feet (Fig. 3). Several astrocytes showed short fragments of smooth and rough endoplasmic reticulum in focally electron-lucent cytoplasm. Damage to mitochondria in perivascular tissue was also often visible. Capillaries of similar size examined in different structures showed similar lesions.

On the 32nd day of life (16 days after intoxication) in all examined structures the lesions in a great part still persisted. In some vessel walls they were even more pronounced. The rarefaction of cytoplasm of perivascular astrocytes (Fig. 5) was well expressed in neuropil of normal appearance.

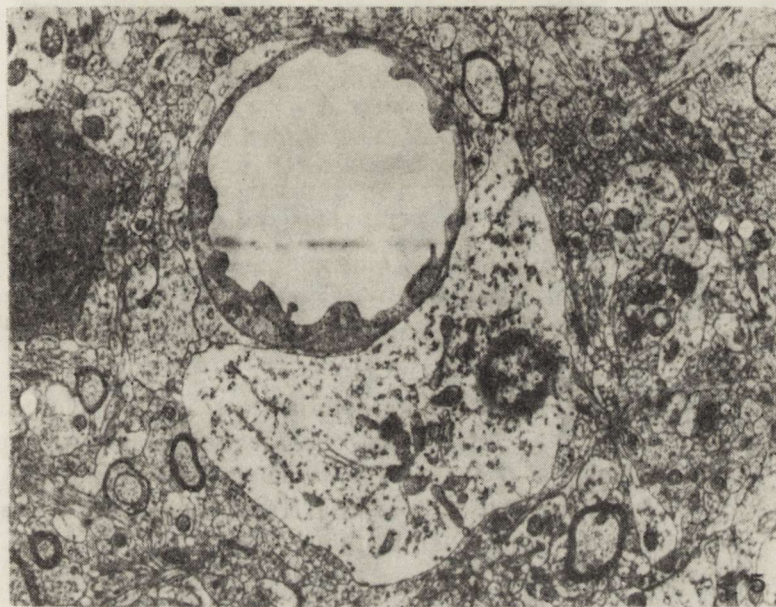


Fig. 5. 32-day-old rabbit, 16 days after DDVP treatment. Swollen perivascular astrocyte with damaged mitochondria and distended endoplasmic reticulum. Primary magn. $\times 3000$

Ryc. 5. Królik 32-dniowy w 16 dni po zatruciu DDVP. Astrocyt przynaczyniowy jest obrzękły, ma uszkodzone mitochondria i poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej. Pow. kliszy $3000 \times$

The HRP reaction product in the brain vessels of 16-day-old rabbits was observed in some pinocytotic vesicles and locally in intercellular junctions. It was closed in by tight junctions (Fig. 6). No pigment was observed in the basal lamina of capillaries. However, some HRP product penetrated into the brain parenchyma and was located in the dense bodies in astrocytes and segmentally in intracellular spaces in close vicinity of the vessels. There was no marked difference in HRP distribution in the control group and in the experimental one. In the choroid



Fig. 6. 16-day-old rabbit treated with DDVP and injected with HRP. HRP visible in large micropinocytotic vesicles and segmentally in intercellular space. Primary magn. 5 000 \times

Ryc. 6. Królik 16-dniowy po zatruciu DDVP i podaniu peroksydazy chrzanowej. Peroksydaza jest widoczna w dużych pęcherzykach pinocytarnych i odcinkowo w przestrzeni międzykomórkowej. Pow. kliszy 5 000 \times

plexus the HRP product filling intracellular spaces, was closed in by top junctions. It was observed also intracellularly in pinocytotic vesicles. Some HRP product was also present on the surface of microvilli. In the experimental animals the presence of the HRP product on the surface of microvilli was more marked than in the control.

DISCUSSION

The decrease of cholinesterases activity in brain capillary walls, found in animals treated with Dichlorvos could suggest changes in permeability of the blood-brain barrier. This is in agreement with the mentioned former investigations (Greig, Mayberry 1951; Firemark et al. 1964). In our studies we looked for changes in the morphological substrate of the barrier, during the period of its maturation (Gabriel 1973).

Electron-microscopic examination revealed on the 16th day of life directly after the end of intoxication features of stimulation of cytoplasmic organelles in endothelial cells. The question arises whether this picture is characteristic of this developmental stage or if it results from DDVP influence. The features observed in endothelial cells in the experimental group were not visible to the same degree in control animals

of the same age. On the other hand, a similar picture as that in 16-day-old experimental rabbits was seen in the experimental 32-day-old animals. In this group the changes were even more advanced. Both observations testify that DDVP intoxication could be responsible in a great part for this state of endothelial cells.

Features of increased permeability for horseradish peroxidase reaction products in the brain parenchyma were not found. It is known, that the blood-brain barrier mechanism does not concern lipid-soluble compounds, such as Dichlorvos. Thus, Dichlorvos quite easily penetrated brain tissue and caused morphological and histochemical changes. The lesions observed in perivascular astrocytes might be explained by the influence of this substance. They are most pronounced in mitochondria which were enlarged with short cristae pushed to the periphery and even showing more advanced damage. It seems that cytotoxic edema followed mitochondrial lesions. These changes appeared as partly irreversible, reaching what is called the no-return point. They caused prolonged disorders resulting in lesions to perivascular astrocytes visible even on the 32nd day of life. The observed lesions of the perivascular astrocytes and the changes in endothelial cells as well as the inhibition of cholinesterase activity in capillary walls do not disturb the blood-brain barrier mechanisms for horseradish peroxidase particles. However, the marked accumulation of HRP reaction products on the surface of microvilli could suggest, that Dichlorvos affects the permeability of the choroid plexus, thus cerebrospinal fluid barrier.

BARIERA KREW—MÓZG U MŁODYCH KRÓLIKÓW PO ZATRUCIU DICHLORFOSEM

Streszczenie

Przedmiotem badań był wpływ zatrucia dichlorfosem (DDVP) królików w okresie rozwoju na ściany naczyń mózgowych oraz przepuszczalność bariery krew-mózg. DDVP (9 mg/kg wagi ciała) podawano królikom przez 10 dni poczynając od 6 dnia życia, czyli w okresie dojrzewania bariery krew-mózg. Do badania pobierano mózgi zwierząt doświadczalnych i kontrolnych w 16 i 32 dniu życia. Przeprowadzono odczyny histochemiczne na aktywność butyrylo- i acetylocholinesterazy. Korę mózgu, korę mózdzku i spoidło wielkie oceniano w mikroskopie elektronowym. Ponadto u 16-dniowych królików przeprowadzono ultracytochemiczne badanie transportu peroksydazy chrzanowej (HRP).

Stwierdzono, że DDVP powoduje zahamowanie aktywności AChE w ścianach naczyń mózgowych. Badania ultrastrukturalne wykazały pobudzenie organelli w komórkach endotelialnych oraz uszkodzenie astrocytów przynaczyniowych utrzymujące się do 32 dnia życia zwierząt. Zaobserwowane zmiany pozwalają przyjąć, że wywołuje je DDVP przechodzący przez ściany naczyń jako związek rozpuszczalny w tłuszczach. Nie było bowiem objawów wzmożonej przepuszczalności dla HRP w naczyniach mózgowych, a jedynie nieznaczne jej zwiększenie w obrębie splotu naczyniówkowego.

ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР У МОЛОДЫХ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ ДИХЛОРФОСОМ

Резюме

Предметом исследования были влияние отравления дихлорфосом (DDVP) кроликов в периоде развития на стенки головного мозговых сосудов, а также проницаемость гемато-энцефалического барьера. DDVP (9 мг/кг веса тела) вводили кроликам в течение 10 дней, начиная от 6 дня жизни, т.е. в периоде созревания гемато-энцефалического барьера. Исследованы головные мозги экспериментальных и соответственных контрольных животных на 16 и 32 дню жизни. Было проведено гистохимическое исследование активности бутирил-ацетилхолинэстеразы. Кора головного мозга, кора мозжечка и большая спайка оценивались в электронном микроскопе. Кроме того у 16-дневных кроликов было проведено ультраци-тохимическое исследование транспорта хреновой пероксидазы (HRP).

Констатировано, что DDVP вызывает торможение активности ацетилхолинэстеразы в стенках головного мозговых сосудов. Ультраструктурные исследования проявили возбужденные органеллы в эндотелиальных клетках, а также повреждение околососудистых астроцитов. Наблюдаемые изменения позволяют высказать мнение, что они вызываются DDVP проходящим через стенки сосуда как соединение растворимое в жирах. Не было симптомов усиленной проницаемости для HRP в головномозговых сосудах, а только незначительное ее увеличение в области васкулярного сплетения.

REFERENCES

1. Clark G., Stavinoha W. B.: A permeability changes in CNS tissue in chronic poisoning with disulfoton. *Science* 1971, 10 (1), 421—423.
2. Dąbbska M., Maślińska D.: The effect of organophosphorus pesticide-dichlorvos on the developing rabbit brain. 1st Meeting of the Intern. Soc. Develop. Neuro-Sci., Strasbourg, July 1—4, 1981, p. 215.
3. Dąbbska M., Maślińska D., Olszewska K.: The effect of prolonged intoxication with dichlorvos on cerebral cortex of young rabbits. *Lab. Anim.*, 1981, 18, 47—51.
4. Dąbbska M., Maślińska D.: Effect of Dichlorvos (DDVP) intoxication of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 77—84.
5. Firemark H., Barlow C. F., Roth L. J.: The penetration of 2P PAM-C¹⁴ into brain and the effect of cholinesterase inhibitors on its transport. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1964, 145, 252—265.
6. Gabriel P.: Bariera krew—mózg, struktura i funkcja. *Pat. Pol.*, 1973, 14, 217—235.
7. Gomori G.: Enzymes. In: *Microscopic histochemistry. Principles and practice.* University of Chicago Press, Chicago 1952, pp. 137—221.
8. Greig M. E., Holland W. C.: Increased permeability of the hemoencephalic barrier produced by physostigmine and acetylcholine. *Science* 1949, 110, 237.
9. Greig M. E., Mayberry T. C.: The relationship between cholinesterase activity and brain permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1951, 102, 1—4.
10. Karnovsky M. J., Roots L.: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, 12, 219—221.
11. Lossinsky A. S., Garcia J. H., Iwanowski L., Lightfoote W. Jr: New ultra-structural evidence for a protein transport system in endothelial cells of gerbil brains. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1979, 47, 105—110.

12. Maślińska D., Zalewska Z.: Activity of some mitochondrial enzymes in the progeny of rabbits treated with dichlorvos in the gestation period. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1978, 16, 139—146.
13. Maślińska D., Zalewska Z.: Effect of dichlorvos, administered to the pregnant rabbits, on the cholinesterase activity in the progeny. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1978, 16, 335—342.
14. Maślińska D., Lewandowska I., Prokopczyk J.: Effect of prolonged acetylcholinesterase inhibition on postnatal brain development in rabbit. *Acta neuropath. (Berl.)*, Suppl. VII, 1981, 52—55.

Authors' address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Pasteura Str., 02—093 Warszawa

HALINA KROH

INTRANUCLEAR INCLUSIONS IN MOUSE NEURONS

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

Intranuclear inclusions in neurons of the central nervous system and in ganglion cells of the vegetative system in various animal species have a vast position in the literature of the subject since the first observations at the end of the past century (Mann 1894) up to the detailed descriptions based on electron microscopy investigations (Siegesmund et al. 1964). However, nuclear inclusions are not an unusual feature of the nervous cells only since they were found in many physiological and pathological conditions in the organs of the alimentary system (Tusques, Pradal 1968; Boquist 1969; Dahl 1970; Iwanaga et al. 1981), respiratory system (Tamura, Aronson 1978; El-Bermani et al. 1981) and endocrine glands (Arstila, Hopsu-Havu 1967; Frink et al. 1978). More than that, the inclusions similar morphologically were demonstrated also in the plant kingdom, in about 200 plant species (Wergin et al. 1970). Intranuclear inclusions in general can be classified as cytoplasmic pseudo-inclusions and genuine ones. Among the latter the most popular are amembranous intranuclear inclusions of rodlet type, of lattice type and fibrillar-tubular and tubular inclusions. To the types rarely found belong genuine membranous intranuclear inclusions.

Three types of genuine intranuclear neuronal inclusions in control and experimental material were observed in mice during ultrastructural studies, in which the effect of ethylnitrosourea (ENU) on the central nervous system was investigated (Kroh, Cervós-Navarro 1983). The question arises whether there exists a relation of the pathological process induced by ENU with the presence and the type of inclusions or if they represent an independent phenomenon.

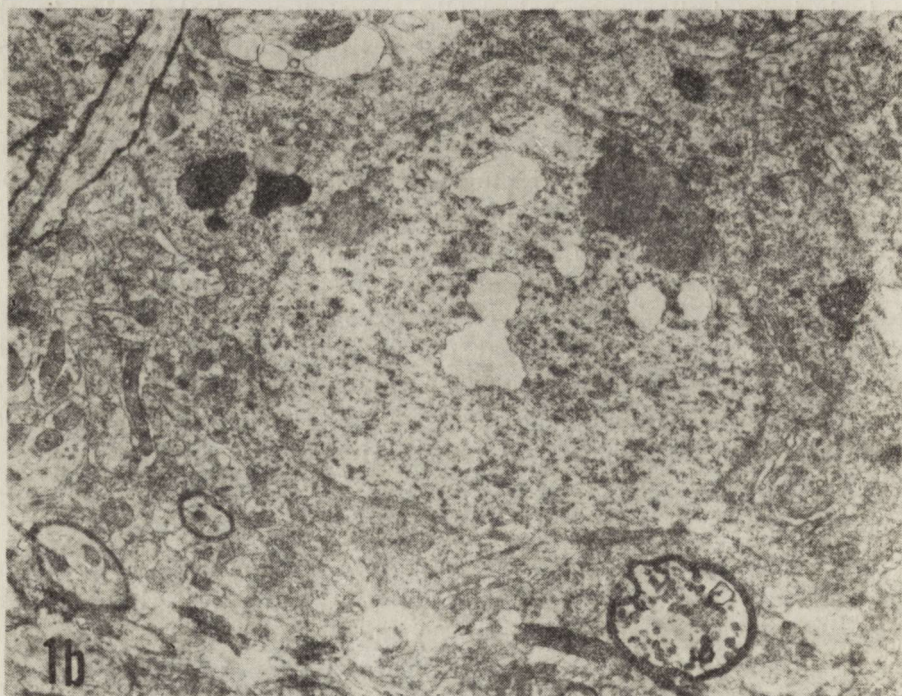
MATERIAL AND METHODS

Thirty five non-inbred Swiss mice were divided into four groups: eight controls, eight pregnant mice (age 72—272 days at the beginning of the experiment), eleven of the offspring of the pregnant mice, eight

adults (age 80—143 days). The pregnant mice (on gestational day 15) and the adults were injected i.v. with a single dose of freshly prepared ENU (80 mg/kg b.wt) dissolved in 0.9 NaCl adjusted to pH 4.2—4.4 with 1% NaH_2PO_4 . Control mice were injected with buffered NaCl physiological saline. Mice injected during pregnancy and the adult mice were killed on days 7, 14, 28, 48, 70, 100, 200 and 300 after injection. The controls and the offspring were killed on the corresponding days of their life and on days 21 and 60, respectively. All the animals were anesthetized i.p. with Nembutal and perfused through the heart (except for 7-day-old mice) with 3% glutaraldehyde in 0.2 cacodylate buffer, pH 7.2—7.4. After immediate removal of the brain and coronal cuts, the cerebral tissue from the sixteen standard locations was taken with a biopsy needle for ultrastructural investigations. This technique, the method of fixation, cutting and contrasting as well as examination in the EM were previously described in detail (Kroh, Luciani 1978; Kroh, Cervos-Navarro 1983).

RESULTS

The initial intention to use the material only for investigations of the effect of ENU on the oligodendroglia (Kroh, Cervos-Navarro 1983) did not allow quantitative evaluation of intranuclear inclusions in each particular cerebral region. Initially the intranuclear inclusions were



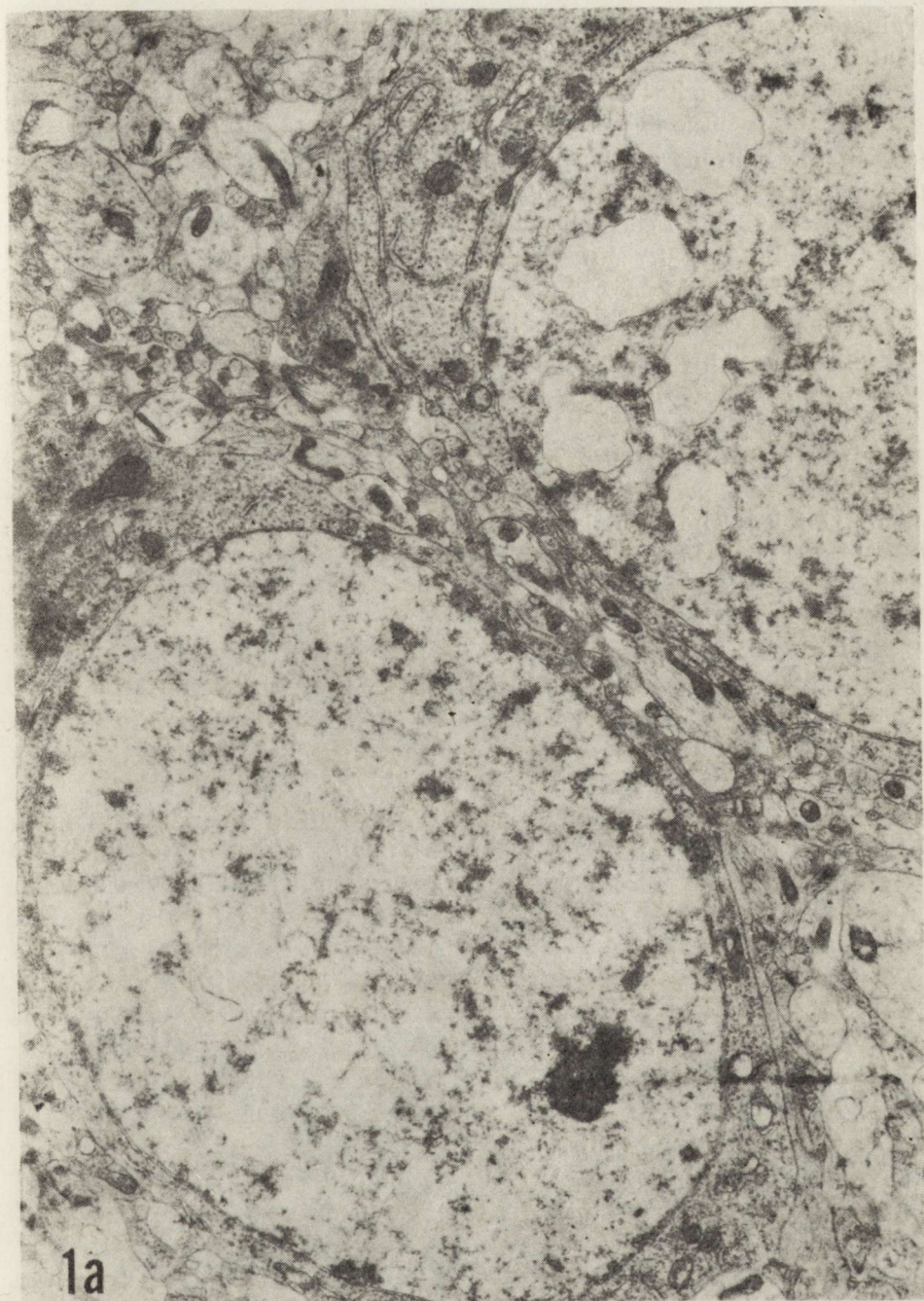


Fig. 1. Control mouse. *a* — 7-day-old. Numerous membranous inclusions in the nuclei of adjacent parietal cortical neurons. Areas of rarefied chromatin and segmented profiles in lower neuron. $\times 4070$. *b* — 500-day-old. Inclusions in parietal cortical neuron. $\times 3300$

Ryc. 1. Kontrola. *a* — Mysz 7-dniowa. Liczne wtręty obłonione w jądrach sąsiadujących neuronów kory ciemieniowej. Pola rozrzedzonej chromatyny i nie zamknięte profile błoniaste w dolnym neuronie. Pow. $4070 \times$. *b* — Mysz 500-dniowa. Wtręty obłonione w neuronie kory ciemieniowej. Pow. $3300 \times$

evaluated as an accidental finding, later each finding has been documented.

Intranuclear inclusions were noticed only in nerve cells. In control material the inclusions were observed in 4 mice, aged 7, 21, 80 and 500 days in the neurons of the parietal and pyriform cortex, in basal ganglia, in the pericommisural (anterior) area, medulla oblongata and cerebellar cortex*. The inclusions were manifested by partly or completely closed membranous irregular profiles. The membrane was unilayered (Figs. 1a,b), rarely double. The content was either translucent or consisted of rarefied, floccular material. In some cases the inside presented an additional small membranous irregular profile. The intranuclear inclusions were single or multiple, localized rather in the central area of the nucleus without any relation to the nuclear envelope.

In the offspring, whose mothers were injected with ENU on the 15th day of pregnancy, the membranous inclusions were observed in 4 out of 11 mice. The animals were 7, 14, 21, 28 days old. The inclusions were localized in the neurons of the pyriform cortex, in the pericommisural area and medulla oblongata. Their structure was like those in the control animals (Fig. 2).

In 3 out of 8 animals which were given ENU injections in adult life, the intranuclear neuronal inclusions were of a different character. The age of animals was 180, 282, 380 days. The inclusions were present in the parietal and pyriform cortex. They were spindle-shaped rodlets formed by the fibrils (Fig. 3) and, possibly, fibrils and tubules. The poles of the rodlets were usually sharply tapered, in others the bunches of fibrils of various length were asymmetrically arrayed. The fibrils of the rodlet were not exactly parallel to each other, adhering closer at some distances. The majority of rodlets was located in the zone of rarefied chromatin which formed a pale "halo". Of particular appearance was the rodlet two walls of which consisted of oblique fibrils with a wide layer of rarefied chromatin inbetween (Fig. 4). The rodlets were most often visible in the central area of the nucleoplasm, sometimes close to the nucleolus, but never in contact with the nuclear envelope. They were always single and never branched, located in nuclei with smooth as well as with irregular profiles.

Another type of intranuclear inclusions in this group of experimental mice resembled a narrow, straight or slightly curved line consisting of parallel layers. Some segments reveal an oblique pattern of particular layers, a lattice pattern (Figs 5a,b). The lattice-type inclusions were less numerous than the rodlets, they also appeared singly contacting neither nucleolus nor the nuclear membrane. Their immediate surrounding consisted of rarefied chromatin.

* Anatomical terms according to Craigie's neuroanatomy of the rat (1963)

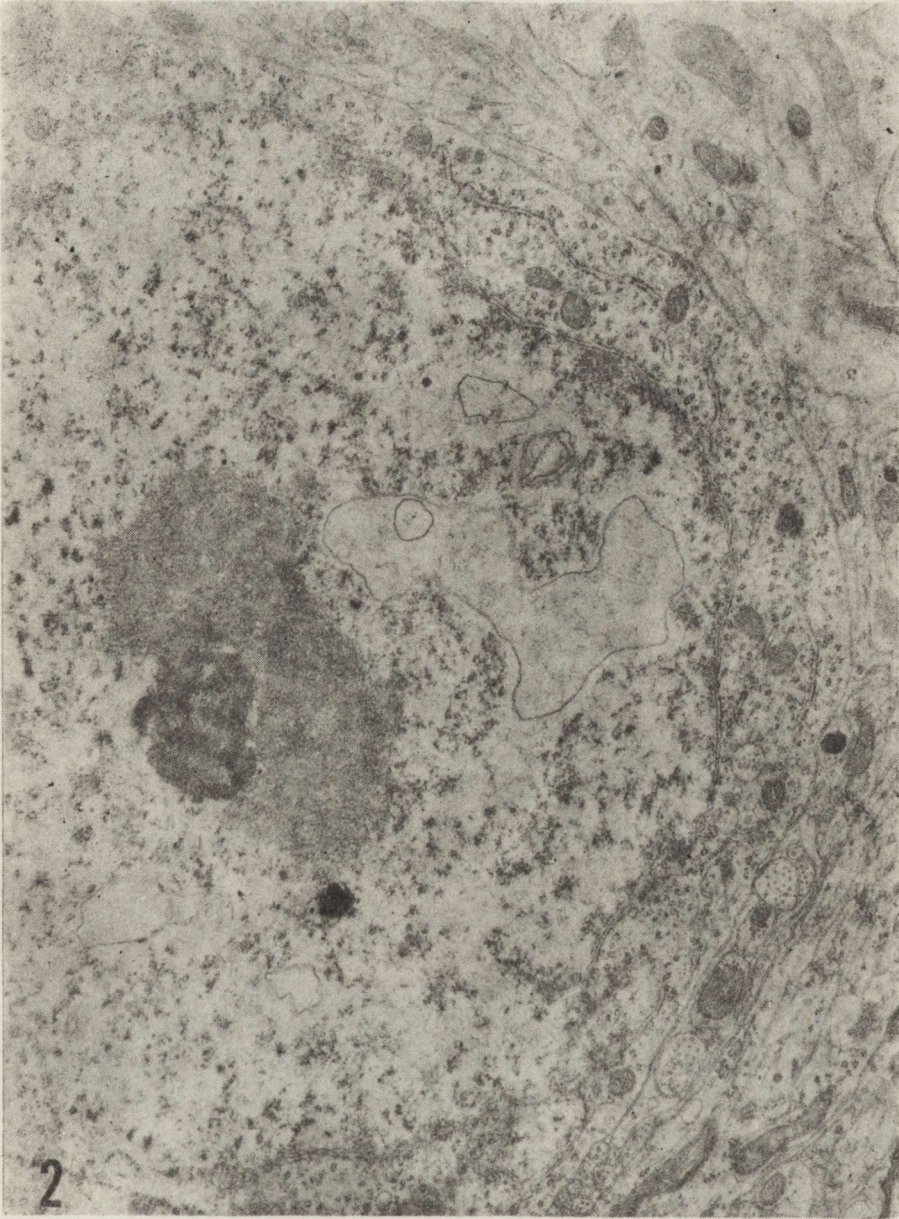


Fig. 2. Offspring mouse, 14-day-old. Membranous intranuclear inclusions, also with double membrane, with floccular content in the neuron of medulla oblongata. $\times 5000$

Ryc. 2. Mysz potomna, 14-dniowa. Śródjądrowe wtręty obłonione, także o podwójnym profilu, z kłaczkową zawartością w neuronie rdzenia przedłużonego. Pow. $5000 \times$

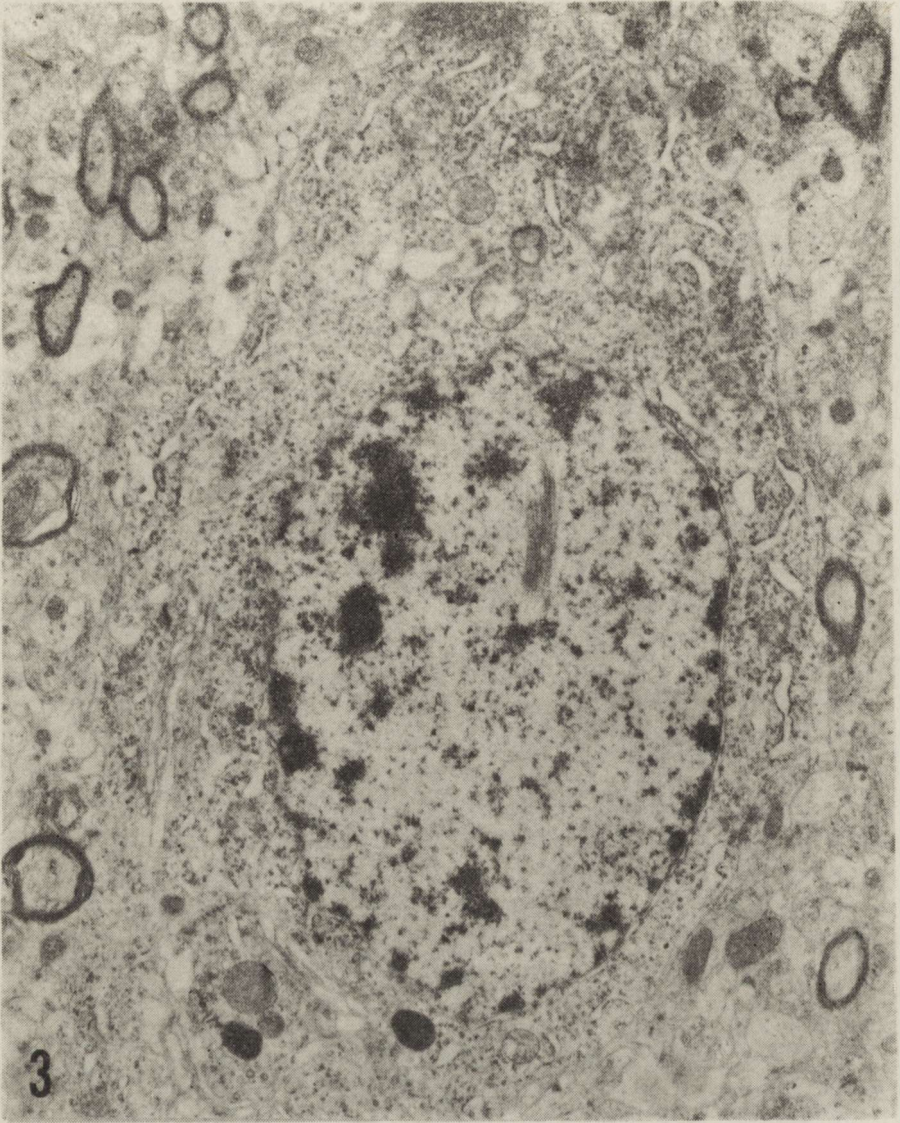


Fig. 3. Adult mouse, 180-day-old, 70th experimental day. Fibrillar rodlet in the nucleus of parietal cortical neuron. $\times 5000$

Ryc. 3. Mysz dorosła, wiek 180 dni, 70 dzień doświadczenia. Śródnajdrowy włóknikowy wtręt pałeczkowaty w neuronie kory ciemieniowej. Pow. 5000 \times

Six out of 8 mice which were given ENU injections on the 15th day of gestation developed all types of intranuclear inclusions in the neurons. Three mice exhibited membranous inclusions only; they were localized in the area of the striatum, hippocampal, cortex and medulla oblongata, on day 14, 100 and 300 of the experiment (the exact age of the animals at the beginning of the experiment was unknown but they were at least



Fig. 4. Adult mouse, 380-day-old, 300th experimental day. Two parts of fibrillar intranuclear inclusion separated by chromatin granules. Pyriform cortex. $\times 25\ 000$
Ryc. 4. Mysz dorosła, wiek 380 dni, 300 dzień doświadczenia. Dwa pasma śródjądrowego wtrętu włóknikowego rozdzielone chromatyną. Kora gruszkowata. Pow. $25\ 000 \times$

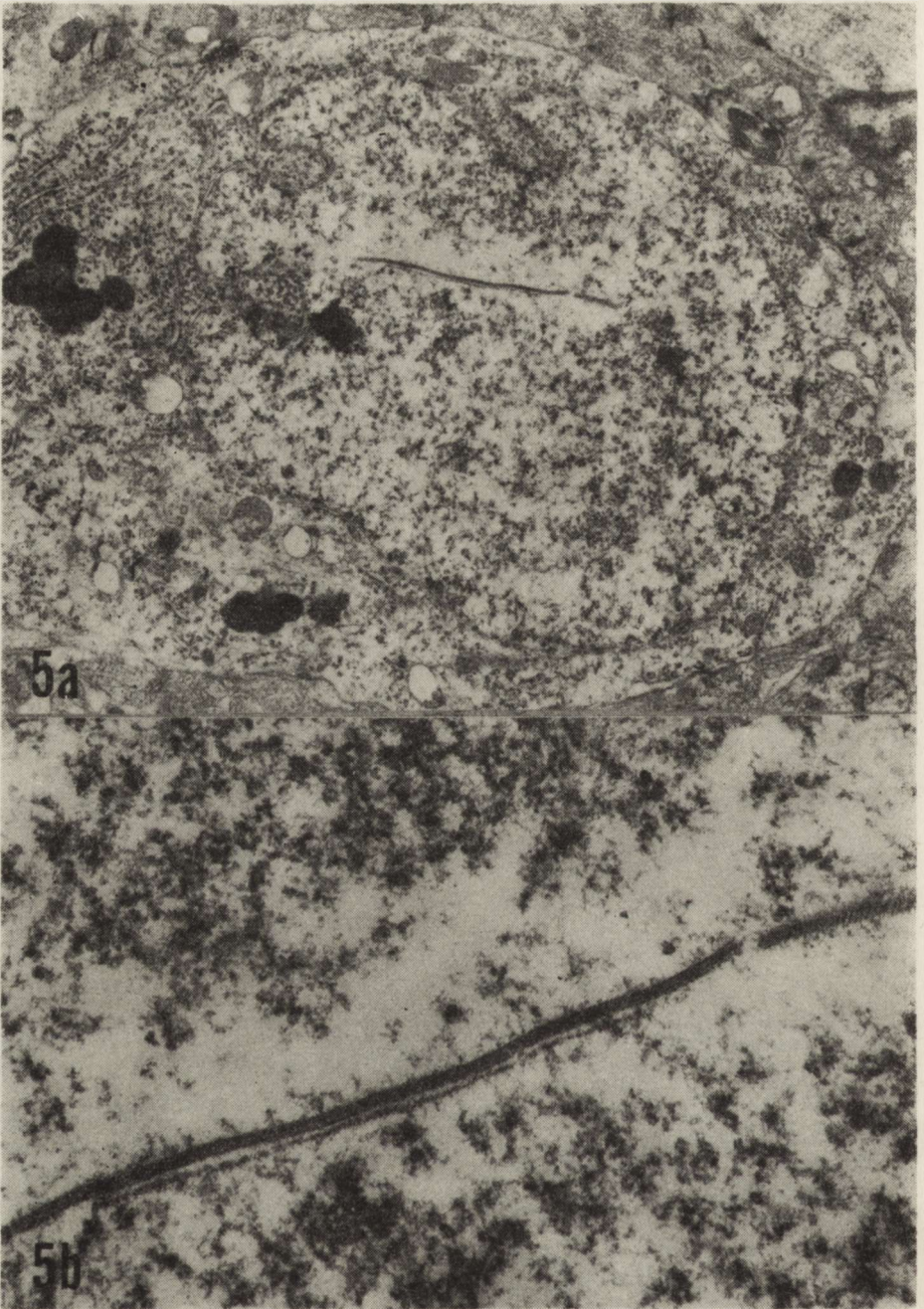


Fig. 5. Adult mouse, aged 282 days, 200th experimental day. Intranuclear lattice inclusion in the area of rarefied chromatin in the parietal cortex neuron. *a* — $\times 5000$, *b* — $\times 20\,400$

Ryc. 5. Mysz dorosła, wiek 282 dni, 200 dzień doświadczenia. Śródjądrowy wtęt kratkowany w polu rozrzedzonej chromatyny neuronu kory ciemieniowej, *a* — Pow. $5000\times$, *b* — Pow. $20\,400\times$

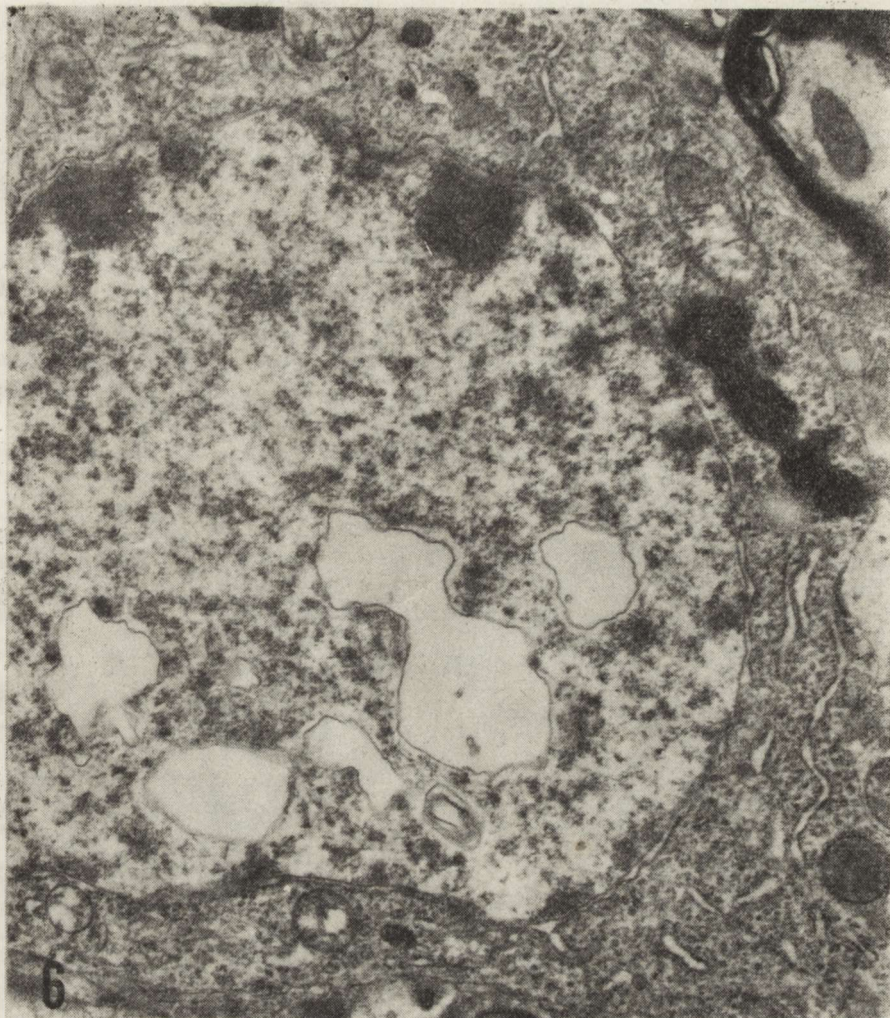


Fig. 6. Mother mouse, 200th experimental day. Numerous membranous intranuclear inclusions, also with double membrane in the parietal cortex neuron. $\times 8000$

Ryc. 6. Mysz matczyna, 200 dzień doświadczenia. Liczne śródjądrowe wtręty obłonię, również o podwójnym profilu w neuronie kory ciemieniowej. Pow. $8000 \times$

over 60 days old). Other 3 animals exhibited membranous inclusions (Fig. 6), rodlets and lattices (Figs 7a,b) in the same areas, i.e., in the parietal cortex, commissural region, cerebellar cortex and medulla oblongata. Oblique cuts of some fibrillar bundles showed a central space, some others a partial turn around the long axis of the rodlet (Figs 8a,b). The age of the mice was 81, 129 and over 260 on the experimental day 7, 48 and 200, respectively. More than one inclusion of identical or different type was never observed in a single nucleus.

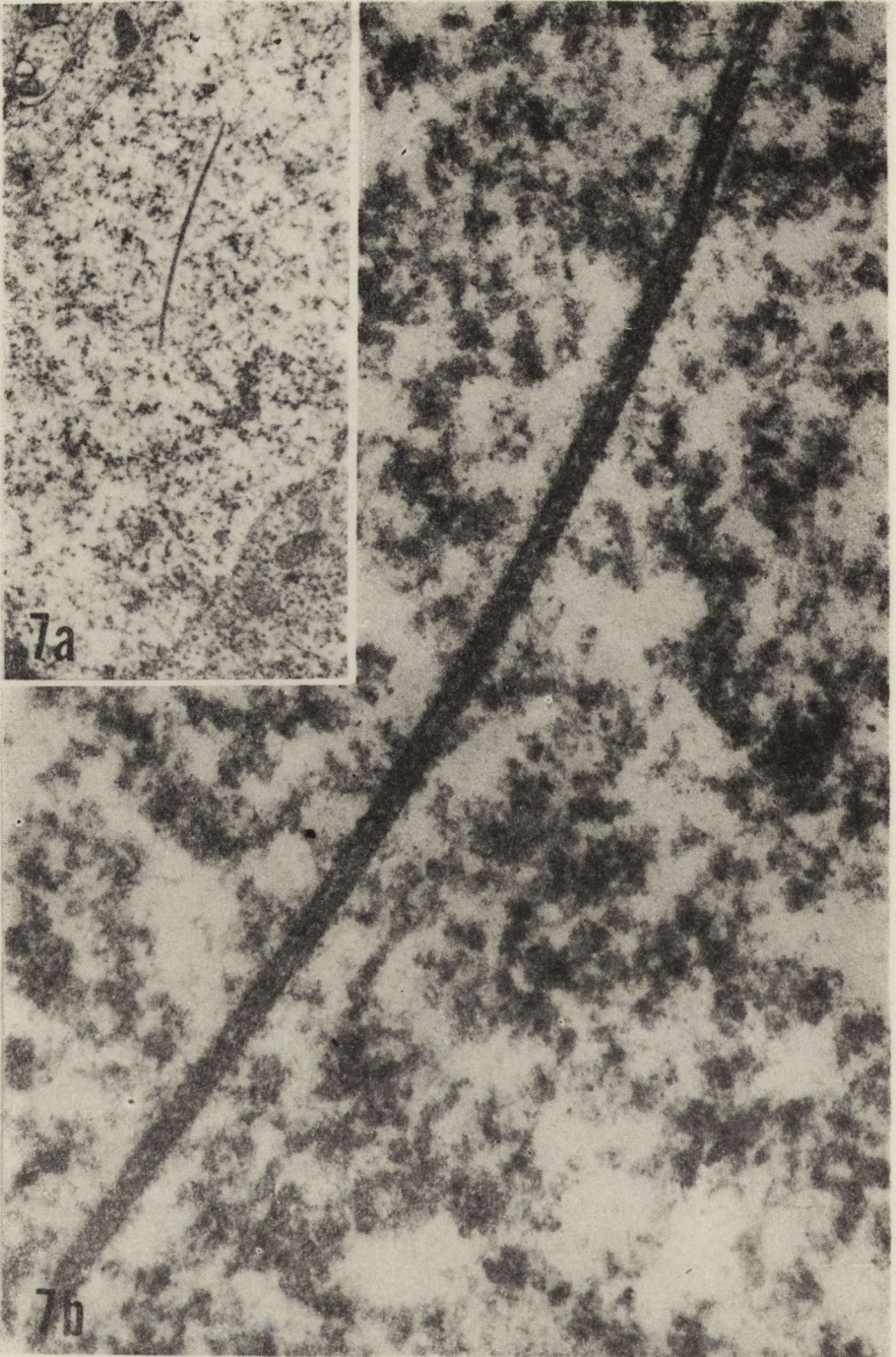


Fig. 7. Mother mouse, aged 81 days, 7th experimental day. Intranuclear lattice inclusion in cortical parietal region. *a* — $\times 8000$, *b* — $\times 50\,000$

Ryc. 7. Mysz matczyna, wiek 81 dni, 7 dzień doświadczenia. Śródjądrowy wręt kratkowany w neuronie kory ciemieniowej. *a* — Pow. $8000\times$, *b* — Pow. $50\,000\times$

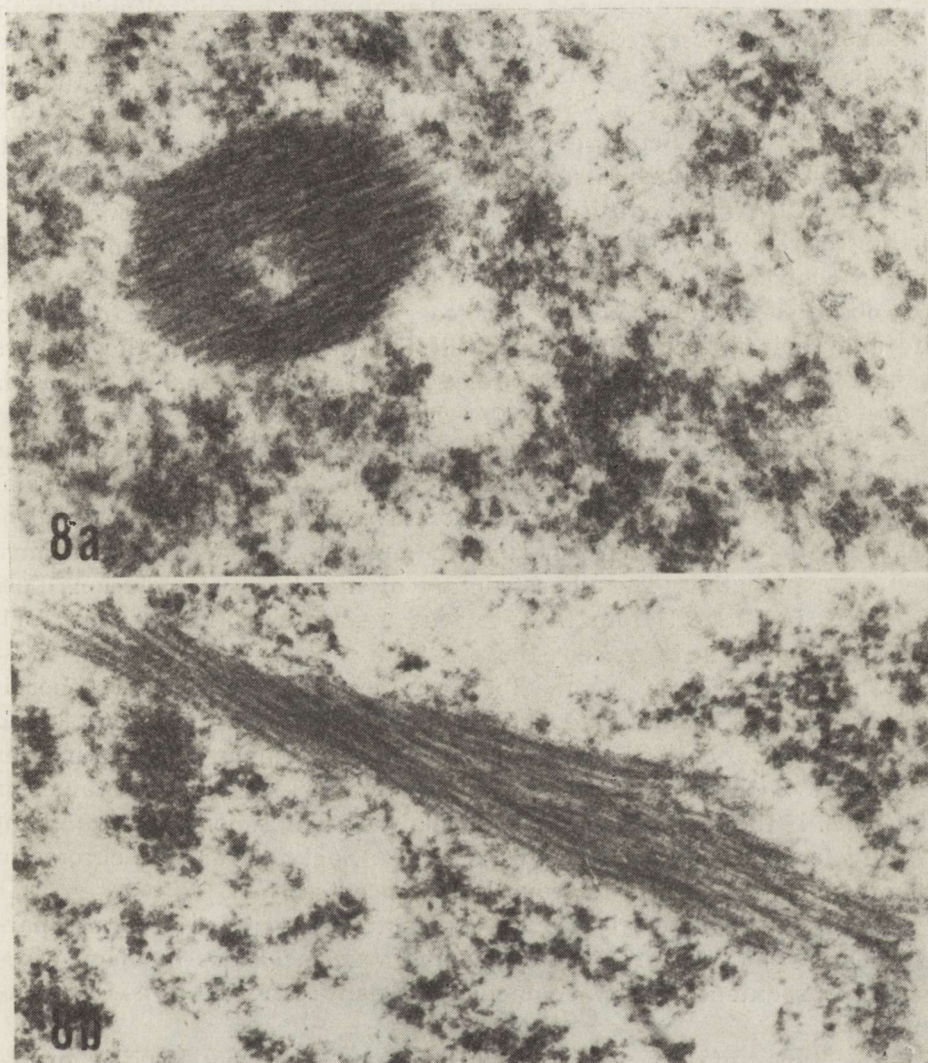


Fig. 8. Mother mouse, aged 81 days, 7th experimental day. *a* — Oblique cut of the intranuclear rodlet in pyriform cortex neuron. Central part devoid of fibrillar tubular component. $\times 31\,700$. *b* — Pericommissural area. Some fibrils partially turned around the long axis of the rodlet. $\times 20\,400$

Ryc. 8. Mysz matczyna, wiek 81 dni, 7 dzień doświadczenia. *a* — Skośny przekrój wtrętu pałeczkowatego w neuronie kory gruszkowatej. Centralna część wtrętu pozbawiona struktury włóknikowo-tubularnej. Pow. $31\,700\times$, *b* — Okolice spoidła przedniego. Część włókien skręcona wokół osi długiej wtrętu. Pow. $20\,400\times$

DISCUSSION

Most frequent were intranuclear membranous inclusions present both in the neurons of healthy and experimental mice. In control animals the inclusions were observed between 7 and 500, in the experimental ones between 7 and 380 days of life, this indicating a lack of any relationship of this type of inclusions with the age of the animals. Scarce literature data present contradictory evidence. According to Field and Peat (1971), who found membranous intranuclear inclusions in neurons of the parietal cortex in CBA mice only in old, healthy animals (11—31 months), this finding is related to the process of ageing. David and Nathaniel (1978) on the contrary studying *nucleus cuneatus* in young rats (1—6 weeks old) observed membranous intranuclear inclusions in the first week of life and their increase in number till the third week. In the authors' opinion these data indicate the role of the membranous inclusions in active neuronal differentiation. On the other hand, the same authors suggest the origin of membranous inclusions from the detached internal nuclear membrane, especially when the immature tissue of young animals can be easily damaged by fixation. The here presented material of inclusions in the neurons of young and mature animals speaks against such an explanation. The ultrastructure of membranous inclusions does not differ in general from the previous descriptions (Field, Peat 1971; David, Nathaniel 1978) except those not fully closed profiles. The question arises if a part of the membrane is not yet formed or whether it already became disintegrated. Ghadially (1975) presents this second possibility in the case of some intranuclear pseudoinclusions which after dissolution of the surrounding membrane become genuine intranuclear inclusions. If the other hypothesis is true, the membranous profiles might be fully formed among chromatin granules. Spots of rarefied chromatin around segmented profiles favour both concepts.

The presented material does not demonstrate quantitative data in particular areas, but the presence of membranous inclusions in many cerebral regions extends the phenomenon to many different types of neurons.

Other types of intranuclear inclusions, i.e. fibrillary bundles or fibrillar tubular inclusions of rodlet or lattice type were observed exclusively in the groups of experimental animals, at the age of 80—380 days, which were already adult when the experiment started. Masurovsky et al. (1970) demonstrated that the first appearance of fibrillar inclusions of rodlet type in tissue culture of chicken ganglion cells is preceded from the 4—9th embryonal day by a granular fibrillar body which gradually increases in size. The fully organized fibrillar inclusions are visible since the 2nd-3rd week of culture, increasing till 160 days *in vitro*. Their organisation proceeds together with neuronal differentiation. In the neurons of the parietal cortex of young mice (4—6 weeks old) intra-

nuclear fibrillar inclusions have been found at a rate 1:100, whereas in old mice (11—31 months old) the number of inclusions increased to 1:18 (Field, Peat 1970). One of the first publications on this subject (Chandler 1966) demonstrated inclusions in the neurons of mice and rats 5—6 months old. Also Meier (1968) found inclusions in the neurons of the sensorimotor cortex of ageing (25 months) rats. The observations of Nathaniel and David (1978) indicate that the number of fibrillar inclusions in the *nucleus cuneatus* of the rat increases with age since the first week of life reaching 6—8% in the sixth week at the termination of the experiment. The given data agree with the present author's personal experience. The location of fibrillar and fibrillar-tubular inclusions in the neurons of the parietal and pyriform cortex, in the cerebellar cortex and in the area of the anterior commissure was more limited than that of membranous inclusions. Intranuclear fibrillar inclusions since the first descriptions documented in EM by Siegesmund et al. (1964) in neurocytes of the olfactory bulb, pyramidal cortex and granular cerebellar layer have been found in normal conditions almost exclusively in the cerebral neurons and ganglion cells of the peripheral nervous system of various animal species, from the hagfish (Mugnaini 1967) to humans (Gambetti, Gonatas 1967). In the central nervous system of mice, in hippocampal and thalamic neurons there were inclusions of rodlet and lattice type (Chandler 1966; Chandler, Willis 1966), whereas in rats such inclusions were demonstrated in many cerebral structures (Karls-son 1966; Magalhaes 1967; Sotelo, Palay 1968; Feldman, Peters 1972; Seite et al. 1977b; Lafarga, Palacios 1977; 1979; Dimova et al. 1980), also in ependymal cells (Brightman, Palay 1963; Hirano, Zimmermann 1967; Weindl et al. 1968; Warchol 1978). Rodlet inclusions were observed in rabbits neurons of lamina terminalis (Weindl et al. 1968), in numerous neurons of hypothalamic nuclei (Clattenburg et al. 1972), whereas the inclusions of lattice and rodlet type were present in olfactory bulb and cortex (Willey, Schultz 1972). The inclusions are very frequent in ganglion cells of the vegetative system in various animal species (Kim et al. 1970; Seite et al. 1977c; Vuillet-Luciani et al. 1979; Costa, Paula-Barbosa 1979). The authors present different opinions concerning the frequency of inclusions. There exists a distinct difference between the individuals, between symmetrical and subsequent ganglia and also between particular cells (Seite et al. 1977c). The majority of investigators stresses the singularity of inclusions per nucleus, whereas in serial sections of sympathetic ganglia in cat up to five different inclusions, among them rodlets were demonstrated in a single neuron (Vuillet-Luciani et al. 1979). The problem of origin of intranuclear inclusions is rather complicated especially when one considers very rare documentation of cytoplasmic fibrillar inclusions associated with nuclear ones (Mugnaini 1967; Arstila, Hopsu-Havu 1967; Tanaka et al. 1976; Iwanaga et al. 1981). They were seen by Holmgren (1899) and demonstrated by Masurovsky et al.

(1970) as the rodlets penetrating nuclear membrane of a chicken sympathetic neuron. An overriding consideration is that inclusions are a physiological, functional phenomenon of unknown significance. Kim et al. (1970) proved that fibrillar inclusions are composed of protein with some addition of lipids. The main components are the following amino acids: arginine, lysine, histidine, tyrosine and tryptophan. The study of Fukui (1978) of fibrillar inclusions showed that they consist of actin; as such they can affect the construction and the shape of the nucleus. The physiological significance of the neuronal intranuclear inclusions has been additionally confirmed by Seite et al. (1977a) who found that under the influence of cAMP analogs as well as theophylline the number of inclusions in sympathetic ganglia increases up to 8.5 times. According to the same authors the formation of intranuclear inclusions is regulated by cellular cAMP which increases during physiological activity of sympathetic neurons.

In pathological conditions the possible increase of cAMP in the cerebellar cortical neurons connected with intranuclear inclusions was already suspected in experimental chronic alcoholism (Tavarez, Paula-Barbosa 1981). The intranuclear fibrillar inclusions in the here presented material are demonstrated only in experimental conditions and despite the coincidence with increasing age, some influence of a pathological process on the number of rodlets cannot be excluded. Nuclear inclusions in nervous tissue treated with ENU have not been described yet. Multivesicular membranous intranuclear inclusions were found in a late stage of cancerogenesis induced with nitrosomorpholine in hepatic cells and in hepatoma (Bannasch 1975) but never in brain tumors induced with ENU. Intranuclear rodlets were observed by Hirota (1979) in mice salivary glands carcinomas induced with nitrosoamine—nitrosomorpholine. Fibrillary bundles in a few neuronal nuclei of hamsters implanted intracerebrally with dibenzanthracene were seen by Popoff and Stewart (1968). Intranuclear fibrillar inclusions of rodlet type were evidenced before in cells of human glioblastoma multiforme (Robertson, MacLean, 1965), astrocytoma (Tani et al. 1971), mixed glioma (Bertel et al. 1981) and in human tumors of other organs (Stefani, Tonaki 1970; Tanaka et al. 1976; Sherwin et al. 1977; Gonzalez-Crussi et al. 1978; Ryder et al. 1979; Vacher-Lavenu 1981), including mice xenograft treated with Adriamycin (Benjamin et al. 1980). Determination of the interrelation between neuronal intranuclear inclusions and the demyelination process seems to be unavailing, though the fibrillar bundle in the neuron of the parietal cortex in a case of multiple sclerosis has also been documented (Raine, Field 1968). The rodlet and lattice inclusions in cortical neurons were present in two cases of SSLE (Perier et al. 1967) as well as in myoclonus epilepsy (Brown et al. 1967). The changes found and published in the same material previously (Kroh, Cervós-Navarro 1983) consisted

in the transformation of oligodendroglial cells with coexistence of demyelination foci. Neuronal changes were not observed in this vast material except in one period (100 days) of the experiment, when damage to the axons and their myelin sheath could be noticed (Kroh, Luciani 1978). In conclusion based upon the whole of the investigated material including changes evoked in oligodendroglia, it should be stressed that the pathological process in the central nervous system, which affects mainly cells of other type than the neurons, can induce morphological changes, like intranuclear fibrillar inclusions in neurons, most probably of functional origin. The etiology of membranous inclusions has to be left unexplained.

WTRĘTY ŚRÓDJĄDROWE W NEURONACH MYSZY

Streszczenie

W przebiegu badań nad wpływem etylnitrozomocznika (ENU) na OUN, podczas których stwierdzono transformację oligodendrogleju i ogniska demielinizacji, dodatkowym odkryciem były wtręty śródjądrowe w komórkach nerwowych mózgowia. Wtręty zauważono u części zwierząt ze wszystkich badanych grup. U myszy kontrolnych w różnym wieku występowały wyłącznie wtręty obłonione, tak jak i u młodych myszy potomnych z matek, którym podano ENU w 15 dniu ciąży. Podanie ENU dorosłym, nieciążącym myszom w różnym wieku powodowało wystąpienie w jądrach neuronów nieobłonionych wtrętów włókienkowych i włókienkowo-tubularnych typu pałeczek (rodlet) i kratownicy (lattice). W neuronach samic, które otrzymały ENU w czasie ciąży stwierdzano wszystkie typy wtrętów.

Obecność wtrętów w neuronach u zwierząt, u których ENU uszkodziło głównie komórki oligodendrogleju można pożytywać za skutek wtórnego pobudzenia neuronów poprzez patologicznie zmieniony oligodendroglej.

ВНУТРИЯДЕРНЫЕ ВКЛЮЧЕНИЯ В НЕЙРОНАХ МЫШЕЙ

Резюме

В ходе исследований влияния этилнитромочевина (ENU) на центральную нервную систему, во время которых констатировано трансформацию олигодендроглии и очага демиелинизации, дополнительным открытием были внутриядерные включения в нервных клетках головного мозга. Включения были замечены у части животных из всех исследуемых групп. У контрольных мышей в разном возрасте выступали исключительно включения покрытые оболочкой, так же как у молодых мышей, рожденных матерями, которым вводили этилнитромочевину на 15 дню беременности. Введение этилнитромочевина взрослым небеременным мышам в разном возрасте вызывало выступление в ядрах нейронов не покрытых оболочкой фибриллярных включений, а также фибриллярно-тубулярных включений типа палочек (rodlet) и решетки (lattice). В нейронах самок, которым вводили этилнитромочевину во время беременности констатировано все типы включений.

Наличие включений в нейронах у животных, у которых этилнитромочевина повредила главным образом клетки олигодендроглии можно признать результатом вторичного возбуждения нейронов через патологически измененную олигодендроглию.

REFERENCES

1. Arstila A. V., Hopsu-Havu V. K.: Nuclear and cytoplasmic microfilaments in the pineal chief cells of the rat. *Ztschr. Zellforsch.* 1967, 80, 22—28.
2. Bannasch P.: Die Cytologie der Hepatokarcinogenese. In: *Handbuch der allgemeinen Pathologie*. VI Band, III Geschwülste, Modelle experimenteller Karcinogenese. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975.
3. Benjamin J., Rana M. W., Xynos F. P., Urhahn J.: Intranuclear filaments in xenografts of human squamous cell carcinoma in nude mice. *Human Pathol.* 1980, 11, 87—89.
4. Bartel C., Gouranton J., Menault F., Chatel M.: The intranuclear filamentous inclusions of a human glioma. Their relation with nuclear bodies. *Eur. J. Cell Biol.*, 1981, 25, 36—45.
5. Boquist L.: Intranuclear rods in pancreatic islets β -cells. *J. Cell Biol.*, 1969, 43, 377—384.
6. Brightmann M. W., Palay S. L.: The fine structure of ependyma in the brain of the rat. *J. Cell Biol.*, 1963, 19, 415—439.
7. Brown W., Kotoriik J., Riehl J.: Ultrastructural studies in myoclonus epilepsy. *Neurology (Minneapolis)*, 1968, 18, 427—438.
8. Chandler R. L.: Intranuclear structures in neurons. *Nature*, 1966, 209, 1260—1261.
9. Chandler R. L., Willis R.: An intranuclear fibrillar lattice in neurons. *J. Cell Sci.*, 1966, 1, 283—286.
10. Clattenburg R. E., Singh R. P., Montemurro D. G.: Intranuclear filamentous inclusions in neurons of the rabbit hypothalamus. *J. Ultrastruct. Res.*, 1972, 39, 549—555.
11. Costa C. B., Paula-Barbosa M. M.: Inclusions in the nerve cells of the sphenopalatine ganglion of the dog. *Cell Tiss. Res.*, 1979, 201, 289—294.
12. Dahl E.: The fine structure of intranuclear inclusions. *J. Anat. (London)*, 1970, 106, 255—262.
13. David S., Nathaniel E. J.: Intranuclear inclusions in the developing neurons of the rat cuneate nuclei. *Cell Tiss. Res.*, 1978, 193, 525—532.
14. Dimova R., Vuillet J., Seite R.: Study of the rat neostriatum using a combined Golgi electron microscope technique and serial sections. *Neuroscience*, 1980, 5, 1581—1596.
15. El-Bermani Al. W., Montvilo J. A., Bloomquist E. J.: Intranuclear rodlets in a pulmonary neuroepithelial body of a rabbit. *Cell Tiss. Res.*, 1981, 220, 439—443.
16. Feldman M. L., Peters A.: Intranuclear rods and sheets in rat cochlear nucleus. *J. Neurocytol.*, 1972, 1, 109—127.
17. Field E. J., Peat A.: Intranuclear inclusions in neurons and glia: a study in the ageing mouse. *Gerontologia*, 1971, 17, 129—138.
18. Fink R., Krupp P. P., Young R. A.: Intranuclear fibrillary inclusions in influenza pneumonia. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1978, 102, 252—257.
19. Fukui Y.: Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of dictyostelium. *J. Cell Biol.*, 1978, 76, 146—157.
20. Gambetti P., Gonatas N. K.: Fibrils and lattice-like intranuclear structures in nuclei of neurons. *Riv. Patol. nerv. ment.*, 1967, 88, 188—196.
21. Ghadially F.: *Ultrastructural and pathological alterations in cell fine structure*. Butterworths, London, Boston 1975.
22. Gonzalez-Crussi F., Hull M., Mirkin D.: Intranuclear filaments in a soft tissue sarcoma. *Human Pathol.*, 1978, 9, 189—198.

23. Hirano A., Zimmermann H. M.: Some new cytological observations of the normal rat ependymal cell. *Anat. Rec.*, 1967, 158, 293—302.
24. Hirota N.: Intranuclear rodlets in undifferentiated carcinomas of salivary glands in strain A mice in a study involving a tobacco specific nitrosoamine. *Cancer Lett.*, 1979, 6, 365—369.
25. Holmgren E.: cit. after K. A. Siegesmund, C. R. Dutta, C.A. Fox 1964.
26. Iwanaga T., Yamada J., Yamashita T., Misu M.: Intranuclear filamentous inclusions in the gastro-enteropancreatic (GEP) endocrine cells of birds. *Cell Tiss. Res.*, 1981, 217, 283—288.
27. Karlsson M.: Three-dimensional studies of neurons in the lateral geniculate nucleus of the rat. *J. Ultrastruct. Res.*, 1966, 16, 429—481.
28. Kim S., Masurovsky E., Benitez H., Murray M.: Histochemical studies of the intranuclear rodlet in neurons of chicken sympathetic and sensory ganglia. *Histochemie*, 1970, 24, 33—40.
29. Kroh H., Cervos-Navarro J.: Transformation of oligodendroglia: a para- or preneoplastic effect of ethylnitrosourea on mouse brain. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1983, 59, 309—315.
30. Kroh H., Luciani A.: The effect of transplacental ethylnitrosourea on the fine structure of the adult mouse brain. I. Nerve cell. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 449—560.
31. Lafarga M., Palacios G.: Intranuclear rodlets in retrochiasmatic area neurons of the hypothalamus of the rat. *Experientia*, 1977, 33, 1368—1369.
32. Lafarga M., Palacios G.: Nuclear inclusions in paraventricular nucleus neurons of the rat hypothalamus. *Cell Tiss. Res.*, 1979, 203, 223—229.
33. Magalhaes M. M.: Intranuclear bodies in cells of rabbit and rat retina. *Exp. Cell Res.*, 1967, 47, 628—632.
34. Mann G.: cit after Willey J., Schultz R., 1971.
35. Masurovsky E., Benitez H., Kim S., Murray M.: Origin, development and nature of intranuclear rodlets and associated bodies in chicken sympathetic neurons. *J. Cell Biol.*, 1970, 44, 172—192.
36. Meier C.: Nukleare Einschlusskörper in Neuronen alternder Ratten. *Experientia*, 1969, 25, 294.
37. Mugnaini E.: On the occurrence of filamentous rodlets in neurons and glial cells of *Myxine glutinosa* (L). *Sarsia* 1967, 29, 221—232.
38. Perier O., Vanderhaeghen J., Pelc S.: Subacute sclerosing leucoencephalitis. Electron microscopic finding in two cases with inclusion bodies. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1967, 8, 362—380.
39. Popoff N., Stewart S.: The fine structure of nuclear inclusions in the brain of experimental golden hamsters. *J. Ultrastruct. Res.*, 1968, 23, 347—361.
40. Raine C. S., Field E. J.: Nuclear structures in nerve cells in multiple sclerosis. *Brain Res.*, 1968, 10, 266—268.
41. Robertson D., MacLean J. D.: Nuclear inclusions in malignant gliomas. *Arch. Neurol.*, 1965, 13, 287—296.
42. Ryder D., Horvath E., Kovacs K.: Nuclear inclusions in the human adenohypophysis. *Acta anat.*, 1979, 105, 273—283.
43. Seite R., Leonetti J., Luciani-Vuillet J., Vio M.: Cyclic AMP and ultrastructural organisation of the nerve cell nucleus: stimulation of nuclear microtubules and microfilaments assembly in sympathetic neurons. *Brain Res.*, 1977a, 124, 41—51.
44. Seite R., Vuillet-Luciani J., Vio M., Cataldo C.: Sur la présence d'inclusions nucléaires dans certains neurones du noyau candé du rat: repartition, fréquence et organisation ultrastructurale. *Biol. Cellulaire*, 1977b, 30, 73—76.
45. Seite R., Zerbib R., Vuillet-Luciani J., Vio M.: Nuclear inclusions in sympa-

- thetic neurons: a quantitative and ultrastructural study in the superior cervical and celiac ganglia of the cat. *J. Ultrastruct. Res.*, 1977c, 61, 254—259.
46. Sherwin R., Kaufman C., Dermer G., Monroe S.: Intranuclear rodlets in an intrathyroid tumor associated with hyperparathyroidism. *Cancer*, 1977, 39, 178—185.
 47. Siegesmund C., Dutta C., Fox C.: The ultrastructure of the intranuclear rodlet in certain nerve cells. *J. Anat. (London)*, 1964, 98, 93—97.
 48. Sotelo C., Palay S.: The fine structure of the lateral vestibular nucleus in the rat. I. Neurons and neuroglial cells. *J. Cell Biol.*, 1968, 36, 151—179.
 49. Stefani S., Tonaki H.: Fibrillar bundles in the nucleus of blood lymphocytes from leukemic and nonleukemic patients. *Blood*, 1970, 35, 243—249.
 50. Tamura H., Aronson B.: Intranuclear fibrillary inclusions in influenza pneumonia. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1978, 102, 252—257.
 51. Tanaka R., Santoli D., Koprowski H.: Unusual intranuclear filaments in the circulating lymphocytes of patients with multiple sclerosis and optic neuritis. *Am. J. Pathol.*, 1976, 83, 245—254.
 52. Tani E., Ametani T., Ishijima Y., Higashi N., Fujihara E.: Intranuclear paracrystalline fibrillar arrays in human glioma cells. *Cancer Res.*, 1971, 31, 1210—1217.
 53. Tavares M. A., Paula-Barbosa M. M.: Cerebellar intranuclear inclusions in chronically alcoholized rats. *Cell Tiss. Res.*, 1981, 216, 227—230.
 54. Tusques J., Pradal G.: Inclusion d'aspect filamenteux, dans le noyau des cellules argyrophiles de la muqueuse du lapin, mise en évidence en microscopie électronique. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1968, 267, 1738—1741.
 55. Vacher-Lavenu M. C., Louvel A., Daudet-Mousac M., Le Charpentier Y., Abelanet R.: Inclusions tubulo-filamenteuses intranucléaires dans le cellules multinucléées des tumeurs à cellules géantes des os. Étude ultrastructurale d'une série de 31 tumeurs. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 1981, 239, 639—644.
 56. Vuillet-Luciani J., Vio M., Cataldo C., Seite R.: Frequency distribution of tubulo-filamentous nuclear inclusions in the celiac ganglion of the cat as revealed by serial sections. *Experientia*, 1979, 36, 394—396.
 57. Warchol J.: Intranuclear microfilament bundles in the ependymal cells of the third ventricle of the rat. *Cell Tiss. Res.*, 1978, 194, 353—359.
 58. Weindl A., Schwink A., Wetzstein R.: Der Feinbau des Gefässorgans der Lamina terminalis beim Kaninchen. II. Das neuronale und gliale Gewebe. *Ztschr. Zellforsch.*, 1968, 85, 552—600.
 59. Wergin W. P., Gruber P. J., Newcomb E. H.: Fine structural investigation of nuclear inclusions in plants. *J. Ultrastruct. Res.*, 1970, 30, 533—557.
 60. Willey T. J., Schultz R. L.: Intranuclear inclusions in neurons of the rat primary olfactory system. *Brain Res.*, 1971, 29, 31—45.
 61. Zeman W., Innes J. R. M.: Craigie's neuroanatomy of the rat. Academic Press, New York, London 1963.

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

OCENA KSIĄŻKI

RECENT ADVANCES IN NEUROPATHOLOGY. Vol. 2. W. T. Smith, J. B. Cavanagh, Eds. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne and New York 1982, s. VIII + 301, rys. 134, tab. 12.

Książka składa się z 11 rozdziałów omawiających takie zagadnienia, jak: techniki immunohistologiczne w neuropatologii, cytoskeleton komórek układu nerwowego, mielinizacja, demielinizacja i remielinizacja w ośrodkowym układzie nerwowym, czynnościowe właściwości mikrogleju, starzenie się, kwasy nukleinowe i barwniki, zagadnienia choroby Jakoba-Creutzfeldta i podostrych encefalopatii gąbczastych pochodzenia wirusowego, zamknięte urazy mózgu, niedokrwienne uszkodzenia mózgu, mechanizm zwyrodnień aksonalnych w toksycznych neuropatiach, neuropatologia idiopatycznego nietrzymania stolca i patogeneza zwężenia wodociągu Sylwiusza.

Potrzeba publikowania prac przeglądowych, krytycznie podsumowujących dotychczasowe wyniki badań w neuropatologii, podobnie jak w innych dziedzinach nauk medycznych, jest bezdyskusyjna. Uzasadnia ją bardzo szybki, choć nierównomierny rozwój badań, szerokie zróżnicowanie nowo wprowadzanych technik, rozszerzających zakres dotychczasowej wiedzy, a niejednokrotnie diametralnie zmieniających utrwalone poglądy i opinie, a także masowość nowych informacji, bardzo rozproszonych i cząstkowych. Wybór przedmiotu tych publikacji zależy w znacznej mierze od subiektywnych odczuć redaktora wydawnictwa i jako taki może i powinien być dyskusyjny: czy omawiane zagadnienia dotyczą rzeczywiście kluczowych dla danej dyscypliny kierunków, decydujących o jej dalszym rozwoju, czy też obejmują problemy — wprawdzie nowe — ale zamknięte w sobie i leżące na poboczu ogólnych zainteresowań. Możliwe jest również łączenie obu tematów. Te ogólne uwagi dotyczą w całej rozciągłości recenzowanego II tomu „Recent Advances in Neuropathology”. Nie jestem przekonany, że wszystkie artykuły włączone do drugiego tomu, reprezentują pierwsze zagadnienie, choć należy do niego większość spośród nich. Chciałbym w tym aspekcie zwrócić specjalną uwagę na dwa pierwsze opracowania dotyczące technik immunohistologicznych w neuropatologii i problematyki cytoskeletonu komórek ośrodkowego układu nerwowego. Włączyłbym tu również opracowanie poświęcone czynnościowym właściwościom mikrogleju, choć zabrakło mi w nim morfologicznego materiału dokumentacyjnego.

Wszystkie bez wyjątku rozdziały książki zostały opracowane wysoce kompetentnie przez autorów, będących ekspertami w poszczególnych dziedzinach i wnoszących do omawianego tematu własne doświadczenie i oparte o nie opinie, choć różnią się one w sposób oczywisty potraktowaniem tematu.

Dwie uwagi krytyczne, jakie chciałem zgłosić, są natury edytorskiej. Pierwsza dotyczy nie najlepszej jakości niektórych rycin, co zadziwia u znakomitego wydawcy, jakim jest Churchill Livingstone, druga — staranności spisów bibliogra-

ficznych. Wydawnictwo tego typu, co omawiana książka, stanowi między innymi ważne źródło referencyjne, wymaga więc bardzo dużej dokładności i pełności cytowań.

Omawianą książkę uważam za bardzo dobrą i niezwykle cenną publikację, kontynuującą w doskonały sposób tradycję zapoczątkowaną przez pierwszy tom serii, który ukazał się w 1979 r. Należy życzyć redaktorom równie udanych dalszych tomów, na które czytelnicy będą czekać z niecierpliwością. Z książką tą winien zapoznać się każdy czynnie zajmujący się neuropatologią, a każdy neurolog, neurochirurg, ogólny patomorfolog i biolog komórkowy znajdzie w niej rzeczy niewątpliwie użyteczne, ciekawe, a nawet fascynujące.

Mirostaw J. Mossakowski

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

Prof. dr hab. med. Mirosław Mossakowski, Dyrektor CMDiK PAN i Kierownik Zespołu Neuropatologii Centrum został powołany w dniu 1 stycznia 1984 r. ponownie na stanowisko Sekretarza Wydziału VI Nauk Medycznych PAN.

*

25 października 1983 r. Rada Państwa nadała tytuł naukowy profesora zwyczajnego prof. dr. hab. med. Januszowi Groniowskiemu z Akademii Medycznej w Warszawie.

Tytuł naukowy profesora nadzwyczajnego otrzymała w tym samym dniu doc. dr hab. med. Eleonora Jankowicz, kierownik Kliniki Neurologicznej AM w Białymstoku.

*

Sekretarz Naukowy PAN przyznał doroczne nagrody naukowe za rok 1983 następującym osobom:

— prof. dr. hab. med. Witoldowi Karczewskiemu (z CMDiK PAN), wraz z zespołem, za pracę „Model rozszczepionego ośrodka oddechowego”.

— doc. dr hab. med. Krystynie Renkawek i dr med. Ewie Matyi (z CMDiK PAN) za pracę „Model doświadczalny choroby Huntingtona”.

*

Rada Naukowa przy Ministrze Zdrowia i Opieki Społecznej przyznała nagrodę naukową za pracę pt. „Diagnostyka prenatalna i postnatalna defektów metabolicznych — chorób lizosomalnych”.

Nagrodę otrzymał zespół Zakładu Genetyki Instytutu Psychoneurologicznego w składzie: dr hab. med. Jacek Zaremba, dr med. Barbara Czartoryska, doc. dr hab. med. Hanna Wehr, prof. dr hab. med. Ignacy Wald, dr n. biol. Teresa Abramowicz, mgr Danuta Górską oraz technicy — Elżbieta Gwiazda, Ewa Harmal i Stanisław Koman.

*

Doroczne nagrody naukowe Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich za rok 1983 przyznane zostały za następujące prace:

1) dwie równorzędne nagrody za prace opublikowane w „Neuropatologii Polskiej” przyznano koleżankom:

— Zofii Adamczewskiej-Goncerzewicz z Kliniki Neurologicznej AM w Poznaniu za pracę pt. „Rozwój nerwu wzrokowego królika w świetle badań lipidowych”;

— Annie Pastuszko z CMDiK PAN w Warszawie za pracę pt. „Synaptosomy — metabolizm w warunkach prawidłowych, w narkozie i niedotlenieniu”.

2) Nagrodę za najlepsze doniesienie na posiedzeniu SNP przyznano Januszowi Szymasiowi z Zakładu Anatomii Patologicznej AM w Poznaniu za pracę pt.

„Glejak wieloogniskowy” (przedstawioną 22 I 83 r.) oraz za pracę pt. „Identyfikacja morfologiczna MAG w glejakach mózgu” (przedstawioną 16 XII 83 r.).

*

Dr med. Jacek Zaremba, adiunkt Zakładu Genetyki Instytutu Psychoneurologicznego, uzyskał stopień doktora habilitowanego na podstawie rozprawy, pt. „Genetyka przewlekłej proksymalnej postaci rdzeniowego zaniku mięśni”. Kollokwium habilitacyjne odbyło się 23 listopada 1983 r. przed Radą I Wydziału Lekarskiego Akademii Medycznej w Warszawie.

*

13 października 1983 r. Rada Naukowa CMDiK PAN nadała stopień doktora nauk przyrodniczych mgr biol. Krystynie Noremborg na podstawie pracy pt. „Zależność transportu wapnia od stanu komponenty lipidowej”. Promotor: doc. dr hab. med. Jerzy Łazarewicz.

*

10 października 1983 r. Rada Naukowa Instytutu Psychoneurologicznego nadała stopnie doktora nauk medycznych następującym kolegom:

— lek. Marii Kołackiej-Pasternak na podstawie pracy pt. „Zgłoszenia mieszkańców Łodzi z powodu urazów głowy do placówek opieki zdrowotnej w okresie I X 73—30 IX 74”. Promotor: prof. dr hab. Ignacy Wald;

— lek. Zenonowi Rzepeckiemu na podstawie pracy pt. „Uczulenie limfocytów płynu mózgowo-rdzeniowego i krwi obwodowej na składniki lipidowe mieliny w stwardnieniu rozsianym”. Promotor: doc. dr hab. Anna Członkowska.

16 stycznia 1984 r. Rada Naukowa tegoż Instytutu nadała stopień doktora medycyny lek. Ewie Piłkowskiej na podstawie pracy pt. „Ocena stanu neuronu obwodowego u osób narażonych na dwusiarczek węgla”. Promotor: doc. dr hab. med. Danuta Wochnik-Dyjas.

Jerzy Dymecki

WARUNKI PRENUMERATY

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

- do dnia 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 31 maja na II półrocze roku bieżącego.

Cena prenumeraty:

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 wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zlecających indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Halina Kroh: Intranuclear inclusions in mouse neurons	139
Book reviews	157
Chronicle and Information (Jerzy Dymecki)	159

СОДЕРЖАНИЕ

Янина Рафаловска: Созревание миелина, демиелинизация и ремиелинизация в центральной и периферической нервной системе	1
Витольд Я. Бжоско, Збигнев К. Ляковски, Барбара Домбровска-Бернштейн, Дорота Матач, Ежи Кульчицки, Янина Плахциньска: Исследования патогенеза подострого склеротизирующего воспаления головного мозга	23
Анджей Леш: Z10-импрегнированные синаптические колбочки в невропиле надзрительного и околожелудочкового ядра крысы лишенной питьевой воды	39
Ежи Дымецки, Эльжбета Медыньска, Михал Вальски: Влияние способа умерщвления экспериментальных животных на картину синапсов двигательной коры (Морфометрическая оценка)	63
Тереса Вжолкова, Томаш Цофта, Ирена Лукашик: Капилляры головного мозга. I. Густота терминальной васкуляризации разных частей мозговой коры кошки и крысы	77
Ирена Лукашик, Тереса Вжолкова, Томаш Цофта: Капилляры головного мозга. II. Нервные окончания капилляров в разных частях коры кошки и крысы	85
Любомира Дыдык, Рышард Плюта: Влияние высокой температуры на ультраструктуру коры головного мозга и белого подкожного вещества кролика	97
Мария Домбска, Данута Масьлиньска, Ежи Онышкевич, Анна Вильмовска-Петрушиньска: Влияние судорожных припадков беременных крольчих на развитие плода	117
Мария Домбска, Лех Ивановски, Данута Масьлиньска, Мария Остенда: Гемато-энцефалический барьер у молодых кроликов после отравления дихлорфосом	129
Халина Крох: Внутрядерные включения в нейронах мышей	139
Рецензии книг	157
Отдел хроники и информации (Ежи Дымецки)	159

SPIS TREŚCI

Janina Rafałowska: Dojrzwianie mieliny, demielinizacja i remielinizacja w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym	1
Witold J. Brzosko, Zbigniew Laskowski, Barbara Dąbrowska-Bernstein, Dorota Matacz, Jerzy Kulczycki, Janina Płachcińska: Badania nad patogenезą podostrego stwardniającego zapalenia mózgu	23
Andrzej Loesch: ZIO-impregnowane kolbki synaptyczne w neuropilu jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura pozbawionego wody do picia	39
Jerzy Dymecki, Elżbieta Medyńska, Michał Walski: Wpływ sposobu uśmiercania zwierząt doświadczalnych na obraz synaps kory ruchowej (ocena morfometryczna)	63
Teresa Wrzołkowa, Tomasz Cofta, Irena Łukaszyk: Naczynia włosowate mózgu. I. Gęstość unaczynienia terminalnego różnych części kory mózgowej kota i szczura	77
Irena Łukaszyk, Teresa Wrzołkowa, Tomasz Cofta: Naczynia włosowate mózgu. II. Zakończenia nerwowe naczyń włosowatych w różnych częściach kory mózgowej kota i szczura	85
Lubomira Dydyk, Ryszard Pluta: Wpływ wysokiej temperatury na ultrastrukturę kory mózgu i substancji białej podkorowej królika	97
Maria Dąmbska, Danuta Maślińska, Jerzy Onyszkiewicz, Anna Wilmowska-Pietruszyńska: Wpływ napadów drgawkowych królic ciężarnych na rozwój płodu	117
Maria Dąmbska, Lech Iwanowski, Danuta Maślińska, Maria Ostenda: Bariera krew-mózg u młodych królików po zatruciu Dichlorfossem	129
Halina Kroh: Wtręty śródjądrowe w neuronach myszy	139
Ocena książki	157
Dział kroniki i informacji (Jerzy Dymecki)	159

CONTENTS

Janina Rafałowska: Myelination, demyelination and remyelination in the central and peripheral nervous system	1
Witold J. Brzosko, Zbigniew Laskowski, Barbara Dąbrowska-Bernstein, Dorota Matacz, Jerzy Kulczycki, Janina Płachcińska: Studies on the pathogenesis of subacute sclerosing panencephalitis	23
Andrzej Loesch: ZIO-stained synaptic boutons in neuropile of supraoptic and paraventricular nuclei of normal and dehydrated rats	39
Jerzy Dymecki, Elżbieta Medyńska, Michał Walski: Influence of the method of sacrificing of experimental animals on the motor cortex synapses pattern (morphometric evaluation)	63
Teresa Wrzołkowa, Tomasz Cofta, Irena Łukaszyk. Capillary blood vessels of the brain. I. Vascularisation density in various parts of the cat and rat cerebral cortex	77
Irena Łukaszyk, Teresa Wrzołkowa, Tomasz Cofta: Capillary blood vessels of the brain. II. Axon terminals of capillary vessels in different parts of the cat and rat cerebral cortex	85
Lubomira Dydyk, Ryszard Pluta: Influence of hyperthermia on ultrastructure of the cerebral cortex and subcortical white matter in rabbits	97
Maria Dąmbska, Danuta Maślińska, Jerzy Onyszkiewicz, Anna Wilmowska-Pietruszyńska: Effect of recurrent seizures in pregnant rabbits on the development of fetal brain	117
Maria Dąmbska, Lech Iwanowski, Danuta Maślińska, Maria Ostenda: Blood-brain barrier in young rabbit brain after Dichlorvos intoxication	129