

8.195

eqz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

<http://rcin.org.pl>

~~Mo, 2w~~

TOM 23

1985

ZESZYT 1

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

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 23

1985

ZESZYT 1

KOMITET REDAKCYJNY

Jan Albrecht, Jolanta Borowska-Lehman, Maria Dąbska, Jerzy Dymecki, Janusz Groniowski, Józef Kaluża, Adam Kunicki, Mirosław J. Mossakowski, Wielisław Pa-pierz, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

<http://rcin.org.pl>
PRZY WSPÓŁPRACY

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
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina Zelman
Sekretarz Redakcji: Anna Zaręba-Kowalska

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-82-79, 49-54-20

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1985.
Nakład: 580 egz. Objętość: ark. wyd. 12,70, ark. druk. 10,38 + luźna
wkładka, ark. A₁-14. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano
do składania 1984.11.9. Podpisano do druku 1985.05.2. Druk ukończo-
no w maju 1985. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 490/84. R-14.
Cena zł 125.—



MAŁGORZATA MURANYI

POWIĄZANIA CZYNNOŚCIOWE MIĘDZY UKŁADEM
NEUROHORMONALNYM A IMMUNOLOGICZNYM

<http://rcin.org.pl>

Zakład Chirurgii Transplantacyjnej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Rozwój badań nad powiązaniem i zależnościami między układem neurohormonalnym a immunologicznym zapoczątkowało kilka spostrzeżeń poczynionych głównie podczas obserwacji klinicznych, a częściowo także w pracach doświadczalnych. Zaobserwowano obniżenie odporności związane z podawaniem leków hormonalnych oraz zaburzenia odpowiedzi immunologicznej w nadczynności przysadki, sugerujące zależność funkcji immunologicznych od prawidłowego stanu hormonalnego (Ahlqvist 1976). Obserwacje te potwierdzono w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach. Podawanie hormonu wzrostu (STH — somatotropina) niedojrzałym myszom zmieniało reaktywność komórek grasicy i śledziony (Ahlqvist 1976), podawanie hormonów sterydowych, np. kortyzonu i hydrokortyzonu, powodowało efekt immunosupresyjny (Bathman 1971). Wiadomo również, że takie czynniki jak stres odgrywają rolę w patogenezie nowotworów (Riley 1981), schorzeń autoalergicznym (Ahlqvist 1976) i odrzucaniu przeszczepów (Comsa, Leonhardt 1979; Daum 1979). Jednym z pierwszych uzyskanych doświadczalnie dowodów zależności funkcjonowania układu limfatycznego od ośrodkowego układu nerwowego było wywołanie limfocytozy indukowanej stresem u kota (Ahlqvist 1976). Nieco później stwierdzono w badaniach anatomicznych istnienie unerwienia wegetatywnego narządów limfatycznych (Ahlqvist 1976). Zapoczątkowało to serię badań nad wpływem ich odnerwienia na reakcje odpornościowe (Williams 1980), a także nad skutkami immunologicznymi uszkodzenia niektórych struktur ośrodkowego układu nerwowego (Keller 1980; Nagy 1978).

UKŁAD NERWOWY A UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Dowody istnienia dróg komunikacji między układem nerwowym a funkcjami odpornościowymi układu limfatycznego

Hormony mają wpływ regulacyjny na wszystkie podstawowe funkcje komórek (synteza białek, kontrola ekspresji genów). Regulując wszystkie funkcje fizjologiczne organizmu oddziałują również na procesy odpornościowe. Wydzielanie hormonów jest regulowane przez ośrodkowy układ nerwowy na poziomie podwzgórze-przysadka. Czynność wewnątrzwydzielnicza przysadki reguluje całą gospodarkę hormonalną (Pierpaoli 1977). Przeprowadzono szereg badań mających na celu udowodnienie tej zależności. Badano wpływ uszkodzenia podwzgórza oraz usunięcia przysadki na odpowiedź immunologiczną *in vivo* i *in vitro*. Stwierdzono, że uszkodzenie elektrolityczne przedniej części podwzgórza u szczurów powoduje zahamowanie stymulacji limfocytów krwi obwodowej przez fitohemaglutyninę (PHA) oraz antygen tuberkulinowy (PPD) w hodowli *in vitro*. Nie zaobserwowano wpływu powyższej operacji na stymulację czystych limfocytów w hodowli. Stąd wniosek, że zabieg ten nie osłabia pierwotnie nabytej odporności, a przyczyną hamowania stymulacji limfocytów mogą być zmiany poziomu czynników humoralnych we krwi (np. kortykosterydów) lub czynników neurohormonalnych (Filipp 1973; Katz 1979). Usunięcie przysadki u szczurów powoduje zahamowanie odpowiedzi humoralnej i komórkowej na różne antygeny. Stwierdzono obniżenie produkcji przeciwciał przeciw krwinkom barana i reakcji skórnej anafilaksji oraz rozwoju odpowiedzi na kompletny adjuwant Freund. Zabieg ten powoduje również zmniejszenie masy węzłów chłonnych, co jest zgodne z obserwacją poczynioną u zarodków kurzych pozbawionych przysadki, które wykazywały daleko posuniętą involucję grasicy i węzłów chłonnych (Berczi 1981; Jankovic 1981; Nagy, Berczi 1981). Badano również wpływ uszkodzeń podwzgórza i przysadki na przeżycie przeszczepu skóry (Daum 1979). Stwierdzono skrócenie czasu przeżycia przeszczepu u zwierząt z uszkodzonym elektrolitycznie guzem popielatym po uprzednim usunięciu przysadki. Reakcja ta była tym silniejsza, im większe różnice immunogenetyczne występowały między dawcą i biorcą przeszczepu. Wpływ tego typu uszkodzeń podwzgórza na przeżycie przeszczepu sugeruje hamującą rolę guza popielatego w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Fakt, że efekt ten otrzymano po usunięciu przysadki przemawia za tym, że regulacja taka nie odbywa się za pośrednictwem czynników neurohormonalnych wydzielanych przez przysadkę, lecz raczej za pośrednictwem układu współczulnego. Wskazuje to na możliwość kontroli odpowiedzi immunologicznej przez ośrodkowy układ nerwowy z pominięciem hormonów, a poprzez regulację aktywności układu wegetatywnego. Jest to druga możliwa droga prowadząca od podwzgórza do układu immunologicznego. Poparciem dla tych przypuszczeń

jest istnienie unerwienia wegetatywnego narządów limfatycznych i grasicy (Williams 1980) oraz obecność receptorów alfa- i beta-adrenergicznych w węzłach chłonnych. Ustalono, że w przeciwieństwie do receptorów beta-adrenergicznych (De Micheli 1975; Pochet 1979), receptory alfa-adrenergiczne na limfocytach są nieliczne, natomiast w dużej liczbie występują w błonach komórek zrębu węzłów chłonnych (Ahlqvist 1976; Giron 1980). Dowodów potwierdzających hipotezę o udziale układu wegetatywnego (głównie współczulnego) w ośrodkowej regulacji odpowiedzi immunologicznej dostarczyły wyniki chemicznej sympatektomii śledziony i grasicy u myszy, przeprowadzonej bezpośrednio po urodzeniu. Jej efektem było wzmocnienie odpowiedzi przeciwciał na krwinki barana w siódmym tygodniu życia. Dowodzi to udziału układu sympatycznego w kształtowaniu humoralnej odpowiedzi immunologicznej *in vivo*. Mechanizm tego zjawiska jest nieznanym (Williams 1980). Sugeruje się trzy możliwości:

1. Sympatektomia może powodować zakłócenie w metabolizmie cyklicznych nukleotydów u subpopulacji komórek regulatorowych T. Układ współczulny i wydzielana przez niego adrenalina podnoszą *in vitro* aktywność cyklicznej adenylowej w limfocytach, co powoduje wzrost poziomu wewnątrzkomórkowego cyklicznego adenylo—monofosforanu (cAMP). Wzrost zawartości cAMP w limfocytach osłabia odpowiedź na krwinki barana, podczas gdy spadek cAMP wzmaga aktywność komórek T pomocniczych. Hamujący wpływ mediatorów wydzielanych na zakończeniach włókien współczulnych był niwelowany przez sympatektomię grasicy i śledziony, co doprowadzało do podwyższenia reakcji na krwinki barana.

2. Wskutek chemicznego usunięcia połączeń z układem współczulnym następuje rozregulowanie wydzielania histaminy. Modulacja reaktywności immunologicznej jest uwarunkowana bardzo bliskim sąsiedztwem włókien współczulnych z komórkami tucznyymi. Ponieważ komórki limfoidalne posiadają receptory histaminowe, spadek wydzielania histaminy powoduje zahamowanie takich reakcji, jak cytotoksyczność komórkowa, nadwrażliwość późna, produkcja czynnika hamującego migrację (MIF — czynnik wydzielany przez pobudzone limfocyty, powodujący wędrówkę makrofażów, do miejsca, w którym zachodzi reakcja zapalna) i powstawanie komórek tworzących łysinki (PFC — komórki zdolne do lizy obcogatunkowych erytrocytów).

3. Usunięcie włókien sympatycznych powoduje zakłócenie rozwoju odporności w następstwie zmian w wewnątrzgrasiczym środowisku hormonalnym. Normalna reaktywność immunologiczna jest uwarunkowana prawidłowym rozwojem limfocytów regulatorowych i efektorowych. Zróznicowana reaktywność komórek *in vitro* pod wpływem antygeny jest indukowana przez histaminę i leki beta-adrenergiczne (Ahlqvist 1976).

Wyniki badań morfologicznych wskazują, że układ współczulny ma

możliwość bezpośredniego wpływu na komórki T lub reguluje dostępność histaminy. Wymienione możliwe mechanizmy nie wykluczają się wzajemnie i mogą współistnieć ze sobą (Williams 1980). Znane są również informacje o wpływie unerwienia przywspółczulnego na reaktywność immunologiczną. Jest to wpływ antagonistyczny w stosunku do współczulnego. Powoduje on wzrost proliferacji i aktywności efektorowej limfocytów. Prawdopodobnie również wzmacnia efekty sympatektomii (Strom 1974). W świetle przytoczonych powyżej efektów staje się jasne, że w organizmie ptaków i ssaków funkcje układu odpornościowego podlegają ośrodkowej regulacji na poziomie podwzgórza.

Podjęmowano szereg prób udowodnienia istnienia przepływu informacji w przeciwnym kierunku, tj. od aktywowanego antygenem układu immunologicznego do podwzgórza. W tym celu badano zmiany aktywności elektrycznej neuronów podwzgórza i zawartości niektórych hormonów we krwi w czasie trwania pierwotnej reakcji immunologicznej. U szczura w 8 dni po wstrzyknięciu krwinek barana stwierdzono trzykrotny wzrost poziomu kortykosteronu we krwi oraz dwufazową zmianę poziomu tyroksyny: wzrost w 3 dni po wstrzyknięciu i znaczny spadek między 3 a 5 dniem. W 5 dni po wstrzyknięciu krwinek barana poziom tego hormonu zaczyna wzrastać i 8. dnia osiąga poziom fizjologiczny (Besedowsky i wsp. 1979). Bardziej bezpośrednich dowodów na istnienie aferentnego szlaku wymiany informacji między podwzgórzem a układem immunologicznym dostarczyło badanie zmian aktywności elektrycznej poszczególnych neuronów podwzgórza u zwierząt, którym podawano krwinki barana. Szczury tak zaszczepione wykazywały w 5. dniu po wstrzyknięciu trzykrotne zwiększenie częstotliwości wyładowań w neuronach, zbieżne w czasie ze szczytem odpowiedzi humoralnej w śledzionie (Besedowsky i wsp. 1979). Nie wiadomo, jakimi drogami przekazywana jest do podwzgórza informacja o wtargnięciu do organizmu antygeny. W rozważaniach na ten temat przyjęto kilka hipotez dotyczących mechanizmów przesyłania informacji do ośrodkowego układu nerwowego:

1. Przeciwciała, które mogą przekraczać barierę mózg—krew jako swoisty końcowy produkt stymulacji antygenowej.
2. Sygnały elektryczne z nerwów obwodowych unerwiających struktury limfoidalne. Przemawia za tym stwierdzony *in vitro* wpływ przekazników wegetatywnych na reakcję immunologiczną (adrenalina, noradrenalina, acetylocholina).
3. Odpowiedź na antygen indukuje również zmiany poziomu hormonów we krwi. Zmiany te mogą być odbierane w podwzgórzcu jako informacja o pojawieniu się antygeny.
4. Mediatory chemiczne wydzielane przez limfocyty T i B po aktywacji antygenem i w czasie produkcji przeciwciał oraz przez takie komórki, jak bazofile i komórki tuczne. Są nimi limfokiny, histamina i se-

rotonina. Ich prekursorzy mają zdolność przenikania bariery mózg—krew. Nie wydaje się przypadkiem fakt, że histamina i serotonina, stanowiące mediatory immunologiczne, występują w wysokim stężeniu w podwzgórze, które jest głównym ośrodkiem koordynacyjnym dla wszystkich procesów neurohormonalnych. Istnieje przypuszczenie, że mediatory te są łącznikiem pomiędzy procesami immunologicznymi a wydzielaniem kortykotropiny (ACTH) powodującej zmiany stężenia kortykosterydów we krwi. Zmiany te wpływają na przebieg reakcji odpornościowych (Besedowsky 1977; Riley 1981).

Wzajemne zależności między układem neurohormonalnym i immunologicznym w rozwoju osobniczym

Jednym z dowodów istnienia zależności w rozwoju neurohormonalnych i immunologicznych funkcji organizmu jest fakt, że u wielu gatunków zwierząt oba te układy rozwijają się równolegle. Stwierdzono na przykład, że u nowo narodzonych myszy i szczurów oba układy są bardzo słabo rozwinięte. U innych zwierząt w tym okresie zarówno układ immunologiczny, jak i hormonalny są bardziej zaawansowane w rozwoju. Jedynym wyjątkiem pod tym względem wśród wielu badanych gatunków zwierząt jest królik, który bezpośrednio po urodzeniu ma dobrze rozwinięty układ wewnątrzwydzielniczy, natomiast odpornościowy znacznie słabiej (Ahlqvist 1976). Różnego rodzaju niedobory funkcjonalne jednego z układów (niedorozwój, niewydolność) są zawsze związane z nieprawidłowościami w rozwoju drugiego z nich. Znane są naturalne modele stanowiące przykłady zakłóceń między funkcjami obu układów, np. bezgraniczne myszy „nude”, prócz zakłóceń odpowiedzi immunologicznej, wyrażających się brakiem limfocytów T, mają również niedokształcony układ hormonalny. Myszy z obniżonym poziomem somatotropiny (STH) i tyroksyny wykazują słabszą odpowiedź komórkową (Ahlqvist 1976). Zakłócenia tego typu wywoływano również doświadczalnie. Stan „germ free” u myszy i szczurów powoduje znaczny niedorozwój tkanki limfoidalnej i zmiany w układzie wewnątrzwydzielniczym w postaci niewydolności tarczycy, nadnerczy i jąder. Usunięcie grasicy u noworodków myszy wywołuje takie same zakłócenia, jakie obserwowano u myszy „nude”, natomiast zwierzęta „germ free” pozbawione tego narządu wykazują degranulację komórek produkujących STH, niedorozwój tarczycy oraz nadmiar hormonów płciowych we krwi. Przedstawione powyżej nieprawidłowości cofają się wyłącznie po wczesnej implantacji grasicy, podczas gdy podanie limfocytów T likwiduje jedynie zaburzenia immunologiczne. Sugeruje to, że grasica odgrywa dużą rolę w rozwoju gonad (Ahlqvist 1976; Besedowsky 1977; Gisler, Schenkel-Hulliger 1971a, b). Bursektomia (usunięcie torebki Fabrycjusza) u zarodków kurzych prowadzi do zmniejszenia liczby komórek produkujących prolaktynę, a dodatkowa ty-

mektomia (usunięcia grasicy) obniża liczbę komórek STH-wydzielniczych. Zarodkowa tymeektomia połączona z usunięciem przysadki wywołuje niedorozwój torebki Fabrycjusza u tych ptaków (Jankovic 1981). Wszystkie wymienione tu przykłady zaburzeń świadczą, że rozwijające się narządy obu układów wpływają wzajemnie na swoje dojrzewanie oraz że komunikacja limfo—neuro—hormonalna od wczesnych okresów ontogenezy jest konieczna do normalnego rozwoju organizmu. Raz zaburzona, choćby tylko na jednym poziomie, daje efekty w postaci niedorozwoju pozostałych składników tego złożonego układu. Pewne światło na ten problem rzucają wyniki badań zmian hormonalnych u zwierząt ze sztucznie wywołaną tolerancją immunologiczną. Myszy, którym od dnia urodzenia przez 8 dni podawano komórki śledziony od dorosłych osobników 4. różnych hybryd allogenicznyc (F₁), w późniejszym okresie były zdolne do całkowitej akceptacji allogenicznego przeszczepu skóry, cechowało je zahamowanie rozwoju układu neurohormonalnego oraz poziom hormonów w surowicy charakterystyczny dla końcowego rozwoju płodowego. Jedną z głównych cech embriogenezy jest szybko następujące po sobie pojawianie się nowych struktur molekularnych i komórkowych. Na ten właśnie okres przypada samorozpoznanie, w którym gwałtownie powstają nowe antygeny własne i w którym istnieje niepełna kompetencja układu immunologicznego. Skutkiem tego jest późniejszy brak reakcji na wszystkie pojawiające się w tym okresie antygeny. Przedłużenie tego etapu embriogenezy można osiągnąć przez sztuczną kontynuację lawinowego pojawiania się nowych struktur molekularnych, podając natychmiast po urodzeniu przez pewien czas kolejno różne komórki allogeniczne. Skutkiem immunologicznym takiego zabiegu jest brak odpowiedzi na podawane w tym czasie antygeny w dalszym życiu zwierzęcia. Nie jest to jednak skutek jedyny. Tą drogą uzyskuje się również opóźnienie dojrzewania układu hormonalnego wyrażające się zmianą poziomu hormonów we krwi. Poziom ten pozostaje taki jak przed urodzeniem. Potwierdza to wcześniej sformułowane wnioski o równoległym i wzajemnie zależnym rozwoju ontogenetycznym obu układów: immunologicznego i neurohormonalnego (Pierpaoli 1977).

Obecnie nie budzi wątpliwości fakt, że rozwój układu immunologicznego pozostaje pod kontrolą genetyczną. Można wysunąć przypuszczenie, że hormony zarówno w ewolucji, jak i w ontogenezie spełniają rolę korekcyjną w stosunku do genomu w aspekcie adaptacji do wpływów środowiska zewnętrznego. Układ hormonalny w rozwoju filogenetycznym przechodzi stopniowo pod ścisłą kontrolę ewolucyjnie nowszych struktur ośrodkowego układu nerwowego, który koordynuje wszystkie czynności organizmu. Stąd wniosek, że funkcjonowanie układu immunologicznego jest zależne od zaprogramowania mózgu w czasie embriogenezy na poziomie podwzgórze—przysadka.

UKŁAD WEWNĄTRZWDZIELNICZY A UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Zmiany w narządach limfatycznych pod wpływem hormonów

Grasica

Usunięcie nadnerczy. Powoduje ono fizjologiczny niedorozwój grasicy (niedobór tymocytów korowych), połączony ze wzrostem jej masy. Adrenalectomia przeprowadzona w pierwszym dniu po naświetleniu promieniami X zakłóca normalną regenerację grasicy, wywołując gwałtowny przyrost masy części korowej, natomiast przeprowadzona w 3—4 dni po naświetleniu pobudza aktywność mitotyczną komórek limfoidalnych i nabłonkowych grasicy (Ahlqvist 1976).

Glukokortykoidy. Podawanie glukokortykoidów powoduje inwolucję grasicy. Następuje zwyrodnienie jąder komórek limfatycznych, a kora zawiera głównie komórki nabłonkowe. Histologiczny obraz rdzenia i kory sprawia wrażenie odwróconego. Jest to prawdopodobnie skutkiem ucieczki limfocytów do szpiku (Ahlqvist 1976).

Mineralokortykoidy. Powodują one zanik grasicy. Przede wszystkim działają na komórki siateczkowo-śródbłonkowe (Ahlqvist 1976).

Usunięcie gonad. U obu płci powoduje ono powiększenie grasicy. Uważa się, że wpływ gonad nie może być jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za naturalną inwolucję grasicy po osiągnięciu dojrzałości. Pozbawienie gonad powoduje dalszy wzrost grasicy powiększonej wskutek usunięcia nadnerczy (Ahlqvist 1976; Chiodi 1975). U szczurów, którym usunięto gonady w 24 godziny po naświetleniu promieniami X, nie wykazano zmian w regeneracji grasicy. Zabieg ten wykonany 49 dni przed naświetleniem powoduje zmiany przerostowe i wzrost liczby mitoz w śródbłonku grasicy. Wzrasta po tym liczba dużych tymocytów kory, ale ich indeks mitotyczny pozostaje bez zmian (Ahlqvist 1976). Usunięcie jąder indukuje transformację blastyczną korowych limfocytów pochodzących ze szpiku. Wpływ ten jest prawdopodobnie wywierany za pośrednictwem komórek siateczki (Castro 1974).

Estrogeny. Powodują u szczurów inwolucję grasicy. Ich podawanie wywołuje przerost nadnerczy. Sugeruje to, że wpływ estrogenów na grasice może być zależny od wydzielania hormonów nadnerczy. Dawki wielokrotnie przewyższające fizjologiczne stężenie tych hormonów we krwi powodują rozpad limfocytów grasicy, zanik płatów i wzrost ilości tłuszczu w komórkach grasicy oraz pyknozę jąder tymocytów i rozplem komórek śródbłonkowych (Ahlqvist 1976; Chiodi 1975).

Progestyny. Progesteron jako jedyny z hormonów gonad powoduje powiększenie grasicy. Progesteron i pregnandiol mają działanie tymolizyczne. U szczurów pozbawionych nadnerczy i u samic z usuniętymi jajnikami podawanie progesteronu nie wywołuje tymolizy, nasila natomiast tymolizę indukowaną estradiolem. Progesteron hamuje kataboliczny i przeciwzapalny wpływ kortyzolu, ale nie zmniejsza jego wpływu ty-

molitycznego. Jest wiązany przez szczurze tymocyty *in vitro*, ale nie wpływa (w przeciwieństwie do kortyzonu) na pobieranie glukozy przez te komórki (Ahlqvist 1976, Pandian 1971).

Androgeny. Testosteron powoduje zmniejszenie masy grasicy i hamuje repopulację grasicy przez limfocyty korowe po naświetleniu promieniami X. Wywołuje on wzrost liczby komórek tłuszczowych i hamuje aktywność komórek limfoidalnych. Działanie testosteronu na tymocyty jest prawdopodobnie spowodowane zakłóceniem symbiozy limfo-epitelialnej w korze grasicy. Duże dawki testosteronu wywołują znaczne zmniejszenie rozmiarów i masy grasicy oraz skłonność do martwicy (Ahlqvist 1976, Chiodi 1975).

Neurotransmitery. Podawanie królikom i szczurom noradrenaliny pobudza rozwój grasicy. Codzienne wzrastające dawki adrenaliny wywołują u noworodków króliczych takie objawy, jak po usunięciu grasicy: zmniejszenie wielkości narządu, obniżenie liczby krążących limfocytów T, spadek masy ciała oraz niedorozwój węzłów chłonnych i śledziony. Adrenalina podnosi aktywność mitotyczną tymocytów *in vitro* (prawdopodobnie za pośrednictwem cAMP) (Ahlqvist 1976; Bevan 1978).

Hormony tarczycy. Usunięcie tarczycy powoduje spadek masy grasicy bez widocznych zmian histologicznych. Podawanie tyroksyny nasila wzrost limfatyczny występujący wskutek kastracji. Podawanie tyreotropiny (TSH) i tyroksyny przyspiesza regenerację grasicy po naświetleniu promieniami X (Ahlqvist 1976).

Przytarczyce. Usunięcie przytarczyc powoduje obniżenie masy grasicy. Po podaniu parathormonu (PTH) następuje powrót do normy (Ahlqvist 1976).

Insulina. Podawanie insuliny wywołuje niewielki wzrost masy grasicy u szczurów (Ahlqvist 1976).

Hormony przysadki. Wczesne badania sugerują powiązanie akromegalii z rozrostem limfatycznym (powiększenie rdzenia grasicy). Powiększeniu przysadki towarzyszy przerost kory i rdzenia grasicy. U młodych i dojrzałych płciowo królików występuje dodatnia korelacja między rozmiarami przysadki i rdzenia grasicy. Grasica po usunięciu przysadki ulega zmniejszeniu, a po podaniu STH jej masa powraca do normy (Ahlqvist 1976; Comsa 1982; Gisler 1971; Pandian 1971).

Podwzgórze. Uszkodzenie podwzgórza powoduje podwyższenie auto-transformacji tymocytów *in vitro* (Ahlqvist 1976; Filipp 1973).

Szyszynka. Po usunięciu szyszynki następuje przyspieszenie naturalnej inwolucji grasicy. Jest to prawdopodobnie spowodowane wzrostem wydzielania hormonów przez jądra i nadnercza (Ahlqvist 1976).

Węzły chłonne

Hormony kory nadnerczy. Farmakologiczne zahamowanie biosyntezy sterydów nadnerczy powoduje przerost grudek węzłów chłonnych u szczura. U królików i myszy wcześniej uczulonych krwinkami barana ekstrakt

nadnerczy indukuje wtórną odpowiedź immunologiczną i zmiany histologiczne w węzłach chłonnych (zanik parenchymy i zmiany w centrach rozrodczych oraz zapadanie się przestrzeni parakortykalnych) (Besedovsky, Sorokin 1977). Zmiany takie wywołać można również przez podawanie kortyzonu i kortykosteronu. Dezoksykortykosteron i kortykotropina (ACTH) były nieefektywne u zwierząt pozbawionych nadnerczy (Ahlqvist 1976). U królików kortyzon wywołuje obniżenie liczby limfocytów w centrach rozrodczych węzłów chłonnych bez widocznego obumierania komórek. Na podstawie dodatkowych badań z naświetleniem promieniami X uważa się, że spadek liczby limfocytów jest spowodowany zmniejszeniem napływu komórek ze szpiku do centrów rozrodczych. Zmiany wywołane przez kortykoidy obejmują również przeniesienie małych limfocytów ze strefy „coronal follicular” do strefy „marginal follicular”. Zjawisko to interpretowane jest jako przyspieszenie dojrzewania komórek. Podawanie mineralokortykoidów powoduje wzrost masy węzłów (Ahlqvist 1976).

Usunięcie gonad. U różnych szczepów myszy z hypoplastyczną tkanką limfoidalną i obniżoną odpowiedzią na krwinki barana zabieg ten indukuje tworzenie się olbrzymich centrów rozrodczych bez zdolności do rekonstrukcji (Ahlqvist 1976; Castro 1974; Comsa 1982).

Progestyny. Pregnenolon wywołuje wzrost masy węzłów chłonnych (Ahlqvist 1976; Comsa 1982).

Androgeny. Testosteron w niewielkim stopniu podwyższa masę węzłów chłonnych i zmienia w nich skład komórek w czasie odpowiedzi immunologicznej (Ahlqvist 1976; Comsa 1982; Pierpaoli, Maestroni 1978).

Neurotransmitery. Podawanie adrenaliny noworodkom królików i szczurów prowadzi do niedorozwoju węzłów chłonnych (Ahlqvist 1976, Giron 1980).

Hormony tarczycy. Podawanie tyroksyny powoduje u szczurów i świnek morskich powiększenie węzłów chłonnych i intensywne uwalnianie się dużych limfocytów T z węzłów chłonnych (Ahlqvist 1976).

Insulina. Podawanie insuliny wywołuje powiększenie węzłów chłonnych. Nie występuje ono u zwierząt z usuniętą przysadką, co sugeruje możliwość wpływu STH na ten proces (Ahlqvist 1976).

Hormony przysadki. U myszy Sell-Back o niedorozwiniętej przysadce, mających słabo rozwinięte węzły chłonne i niedobór komórek tworzących łyśinki, STH powoduje wzrost ilości tych komórek i podwyższa transformację blastyczną komórek węzłów pod wpływem antygenów grasiczozależnych (Ahlqvist 1976; Comsa 1982).

Śledziona

Hormony kory nadnerczy. Kortyzon powoduje obniżenie liczby limfocytów w centrach rozrodczych śledziona (Ahlqvist 1976).

Neurotransmitery. Podawanie adrenaliny noworodkom królików i szczurów prowadzi do niedorozwoju śledziona (Ahlqvist 1976).

Hormony gonad. Testosteron obniża zawartość witaminy C w śledzionie (Ahlqvist 1976).

Tyroksyna. Podanie tyroksyny i TSH powoduje przerost miazgi białej śledziony (Ahlqvist 1976).

Hormony przysadki. Usunięcie przysadki hamuje odpowiedź komórek śledziony myszy na krwinki barana (Ahlqvist 1976; Comsa 1982).

Szpik kostny

Glukokortykoidy. Nie mają wpływu na szpikowe prekursorzy komórek produkujących przeciwciała (Ahlqvist 1976; Comsa 1982).

Androgeny. Przyspieszają regenerację komórek pnia (Ahlqvist 1976; Eidinger, Garret 1972).

Receptory dla hormonów wykryte na limfocytach

Komórki układu limfoidalnego są komórkami docelowymi dla wielu hormonów. Podobnie jak komórki innych tkanek, których czynność jest regulowana hormonalnie, mają one receptory dla hormonów (Ahlqvist 1976; Bennet 1978). Zarówno w komórkach zrębu narządów limfatycznych (komórki siateczkowo-śródbłonkowe grasicy, komórki zrębu węzłów chłonnych), jak i w samych limfocytach wykryto swoiste miejsca wiązania na błonie i receptory cytoplazmatyczne dla wielu hormonów i mediatorów (Galant 1978; Marx 1974; McLachlan 1981; Passwel i wsp. 1979; Pochet 1979; Saxon 1977). W wielu przypadkach nie wiadomo jeszcze, czy są to receptory powierzchniowe czy cytoplazmatyczne; stwierdzono tylko specyficzne wiązanie określonych substancji przez komórki (Arrenbrecht 1974; Giron 1980; Liewendahl 1976). Wiadomo jednak, że receptory alfa-adrenergiczne są zlokalizowane w błonie limfocytów i komórek zrębu węzłów chłonnych. Działanie mediatorów alfa- i beta-adrenergicznych jest związane z aktywacją cyklicznej adenylowej. Prawdopodobnie regulatory humoralne tego rodzaju związane są przez specyficzne miejsca na błonie komórek (Bevan 1978; Galant 1978; Lefkowitz 1978). Kortyzol jest wiązany w cytoplazmie i stamtąd przekazywany do jądra komórek docelowych (Ahlqvist 1976). Możliwe, że receptory dla pozostałych hormonów sterydowych są zlokalizowane również w cytoplazmie (McLachlan 1981). Nie wszystkie komórki wrażliwe na hormony sterydowe wiążą je *in vitro*. Limfocyty grasicy odznaczające się dużą wrażliwością na testosteron, który silnie hamuje pobieranie przez nie glukozy, nie wiążą hormonu *in vitro*. Przypuszcza się, że efekt testosteronu wywierany jest w tym przypadku pośrednio przez działanie na komórki siateczkowo-śródbłonkowe (Claman 1972). Liczba receptorów na komórkach nie jest stała. Zależy ona od poziomu specyficznego hormonu, jak również jego antagonistów i innych substancji o charakterze regulacyjnym, np. liczbę receptorów beta-adrenergicznych obniżają nie tylko katecholaminy beta-adrenergiczne, ale i kortyzol (Besedowsky, Sorokin 1977). Na-

tomiast 6-hydroksytryptamina i tyroksyna podwyższają ich liczbę. Liczba receptorów alfa-adrenergicznych obniża się przy wysokim poziomie kortyzolu (Galant 1978; Passwel i wsp. 1979). Liczba receptorów dla substancji hormonalnie czynnych zależna jest także od rodzaju komórki. Limfocyty T i B różnią się liczbą receptorów glukokortykoidowych (Lippman 1977; Pochet 1979), a odrębne subpopulacje limfocytów T mają różną liczbę receptorów dla histaminy (Saxon 1977). Liczba receptorów zależna jest również od stopnia pobudzenia komórki (McMillan i wsp. 1976).

Wpływ hormonów na komórki limfoidalne

Wykazano znaczne różnice we wrażliwości komórek na działanie hormonów w zależności od ich pochodzenia, funkcji i stopnia pobudzenia (Ahlqvist 1976; Cohen, Gershon 1975). Czynniki hormonalnie aktywne regulują zarówno liczebność różnych populacji komórkowych, jak i ich reakcję na stymulację antygenem i mitogenami (Ablin i wsp. 1974; Cooper i wsp. 1977; Fauci, Dale 1974; Fauci 1978; Gisler 1971; Maino 1974; Williamson 1979; Yu 1977). Większość dotychczasowych badań dotyczyła efektów wywoływanych przez duże, wielokrotnie przekraczające fizjologiczne, dawki hormonów. Stosunkowo niewiele prac z ostatnich lat przyniosło informacje o wpływie niskich stężeń hormonów na komórki, a zatem o roli tych substancji w warunkach fizjologicznych.

Kortykosterydy w dawkach wielokrotnie przekraczających fizjologiczne są znanymi immunosupresorami i mają własności cytostatyczne (Ahlqvist 1976; Comsa, Leonhardt 1979; Fabris i wsp. 1971; Fan 1978; Yu 1977). Wykazano ogólną zależność wrażliwości komórek na ich działanie od stadium mitotycznego. Największa wrażliwość przypada na fazę przedreplikacyjną. Stymulacja antygenem obniża wrażliwość komórek na sterydy (Fan 1978; Yu 1977). W sprzeczności z cytostatycznymi własnościami hormonów sterydowych pozostaje całkowita niewrażliwość szpikowych prekursorów plazmacytów na traktowanie glukokortykoidami (Ahlqvist 1976). Stężenia sterydów potrzebne do 50% zahamowania pobierania glukozy przez tymocyty ustalono we wzrastającym szeregu: 17-alfa-etylo-19-nor-testosteron, 17-alfa-etylo-testosteron, dezoksykortykosteron, 17-alfa-metylo-testosteron, 19-nor-testosteron, kortykosteron, testosteron, hydrokortyzon, kortyzon (Ahlqvist 1976).

Wpływ hormonów na odpowiedź immunologiczną

Hormony nadnerczy

Usunięcie nadnerczy. Podwyższa ono skłonność do anafilaksji i reakcji Arthusa. Zwiększa wytwarzanie przeciwciał. Myszy immunizowane krwinkami barana po zabiegu usunięcia nadnerczy produkują więcej przeciwciał 19S i mają opóźnioną fazę produkcji przeciwciał 7S. Sugeruje to, że normalny poziom hormonów nadnerczy jest konieczny do przerwania

produkcji przeciwciał IgM lub zmiany produkcji IgM na IgG. Brak nadnerczy wzmacnia odpowiedź myszy na krwinki barana i powoduje odwracalne zmiany w dystrybucji limfocytów T w organizmie (Ablin i wsp. 1974; Cohen 1971; Eidinger, Garret 1972).

Kortykosterydy. Kortyzon (w dawkach stosowanych w farmakologii) podany przed antygenem jest supresorem syntezy przeciwciał. Podany po nim daje znacznie słabszy efekt. Kortyzol skraca czas biologicznego przeżycia przeciwciał. Prednizolon obniża reakcje skórnej anafilaksji (Ahlqvist 1976; Besedowsky 1977a; Hellig, Waldek 1974; Pierpaoli, Maestroni 1978; Yu 1977). Pojedyncza wysoka dawka hydrokortyzonu hamuje wytwarzanie komórek tworzących łyśinki w odpowiedzi na obcogatunkowe krwinki czerwone w grasicy, śledzionie, szpiku i węzłach chłonnych (Ahlqvist 1976; Comsa 1982; Dracott, Smith 1979a, b) oraz obniża poziom IgG i IgM w surowicy (Ahlqvist 1976). Stwierdzono ścisłą korelację między supresją wytwarzania przeciwciał a aktywnością śledzionowych komórek tworzących łyśinki. Długotrwała terapia kortykosterydami powoduje obniżenie całkowitej ilości IgG we krwi oraz ich stężenia w szpiku (Ahlqvist 1976; McMillan i wsp. 1976). W tych samych warunkach obniża liczbę obwodowych limfocytów T i powoduje zachwianie proporcji między komórkami T-supresorowymi i pomocniczymi na korzyść supresorów oraz obniża odpowiedź przeciwciał 19S i 7S (Haynes 1978; Katz 1979; Tolone i wsp. 1978). Kortykosterydy hamują również reakcje kontaktowego zapalenia skóry (Olafssen i wsp. 1983).

Jakkolwiek stosunkowo niewiele badań przeprowadzono z użyciem niskich dawek kortykosterydów, przyniosły one jednak więcej informacji o roli tych hormonów w warunkach fizjologicznych. Wydaje się, że zbliżono się do wyjaśnienia mechanizmu ich przeciwwzapalnego działania. Stwierdzono, że hydrokortyzon wiąże się z otrzewnowymi komórkami tucznymi *in vitro*, wzmacniając stymulację cyklazy adenylowej przez prostaglandynę E₂. Skutkiem tego jest zahamowanie wydzielania histaminy. Mechanizm tego zjawiska może polegać na wzmocnieniu interakcji receptor—cyklaza lub na intensyfikacji wiązania Ca⁺⁺ przez błonę komórkową (Ambrose 1970; Schleimer i wsp. 1982). Kortykosterydy w małych dawkach stymulują odpowiedź immunologiczną (Maor 1974). Kortyzol w stężeniu 0,1—1,0 µg/ml krwi jest niezbędny do jej indukcji. Sugeruje się, że odpowiednio niski poziom kortyzolu jest sygnałem zezwalającym, bez którego nie następuje reakcja na kontakt z antygenem. Dawka 70 µg/ml kortyzolu w ogóle nie wpływa na reakcję immunologiczną. Dawki wyższe od 320 µg/ml krwi działają immunosupresyjnie (Ambrose 1970). W ostatnim czasie wykazano, że kompetycja antygenowa jest zjawiskiem zależnym od poziomu kortykosteronu we krwi. Po podaniu pierwszego antygeny poziom hormonu wzrasta do stężenia, w którym ma on działanie immunosupresyjne. Po usunięciu nadnerczy zjawisko kompetycji nie występuje (Besedowsky, Sorkin 1977). Mineralokortykoidy indu-

kują lub wzmagają stany zapalne. Ponadto mają działanie o wiele słabsze od glukokortykoidów i występują w niższych stężeniach w organizmie (Ahlqvist 1976; Comsa, Leonhardt 1979).

Wpływ kortykosterydów na przeszczep allogeniczny. Wyniki badań nad wpływem usunięcia nadnerczy na czas przeżycia przeszczepów są całkowicie sprzeczne. U myszy zaobserwowano przyspieszenie odrzucania przeszczepu skóry lub brak wpływu zabiegu na reakcję przeciw przeszczepowi (Castro, Hamilton 1972; Ahlqvist 1976; Mc Grath 1978). U szczurów, które nie produkują kortyzolu, brak nadnerczy nie wpływa w ogóle lub przedłuża przeżycie przeszczepu (Bilder 1976; Comsa, Leonhardt 1979; Comsa 1982). Sugeruje się, że różnica ta spowodowana jest różnym składem hormonów sterydowych u szczurów i myszy (Bathman 1971; Comsa 1982). U królików po podaniu kortyzonu odrzucenie przeszczepu jest opóźnione (Ahlqvist 1976). Po dokładnym zbadaniu wpływu różnych dawek kortykosterydów na czas przeżycia przeszczepów, okazało się, że wszystkie badane hormony mogą być zarówno immunostymulatorami, jak i immunosupresorami, zależnie od dawki. Kortyzol w bardzo niskich dawkach (0,1—1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ krwi) działa stymulująco. W stężeniu 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nie wywiera żadnego wpływu, a stężenie 320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ daje efekt supresji. Dla aldosteronu ustalono stężenie 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jako przyspieszające odrzucenie przeszczepu skóry. Dawka 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nasila ten proces. Dla kortykosteronu odpowiednie dawki wynoszą 130 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 2,5—5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Dezoksykortykosteron nawet w stężeniu 5,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ jest immunostymulatorem (Ambrose 1970; Besedovsky 1977; Comsa, Leonhardt 1979).

Hormony gonad

Płeć a odpowiedź na antygeny. Samice odpowiadają wyższym poziomem przeciwciał niż samce, są lepszymi producentami przeciwciał i silniej reagują na albuminę bydlęcą (Ahlqvist 1976; Horne 1972). Kastracja młodych myszy powoduje podwyższenie poziomu przeciwciał przeciw antygenom grasiczo-niezależnym (Ahlqvist 1976). Odpowiedź na syntetyczne dwuniciowe kwasy nukleinowe nie potęguje się po kastracji i podawaniu androgenów samicom. U kastrowanych samców, które otrzymywały wysokie dawki estrogenu, wzrastała ilość antygeny wiązane przez przeciwciała (Ahlqvist 1976). Usunięcie grasicy powoduje wzmocnienie wpływu estrogenów na odpowiedź grasiczo-zależną (Chiodi 1975). Zarówno fazy produkcji przeciwciał 19S, jak i 7S są silniej wyrażone u samic niż u samców w odpowiedzi na antygeny w wysokim stopniu grasiczo-zależne. Usunięcie jąder wzmacnia wczesną fazę produkcji 19S do poziomu podobnego jak u samic (Castro 1974; Eidinger, Garret 1972). Hormony płci wpływają na wielkość grasicy. Pozbawienie jąder powoduje zmniejszenie jej masy. Usunięcie grasicy w piątym miesiącu życia szczura wzmacnia odpowiedź na antygeny grasiczo-niezależne, ale znosi wyżej opisane efekty kastracji (Chiodi 1975). U zwierząt naświetlonych śmier-

telną dawką promieni X, z przeszczepioną śledzioną i szpikiem, kastracja podwyższa odpowiedź na te antygeny. Odpowiedź na obcogatunkowe krwinki pozostaje u nich niezmieniona. Przyczyną tej różnicy jest prawdopodobnie niewrażliwość procesu produkcji tymozyny na promienionowanie jonizujące (Hooper 1975). Wzmocnienie fazy 19S odpowiedzi humoralnej na antygeny grasiczo-zależne może być spowodowane przyspieszeniem dojrzewania limfocytów w grasicy (Eidinger, Garret 1972). Podwyższenie miana przeciwciał w odpowiedzi na antygen grasiczo-niezależny wskutek usunięcia grasicy jest przypuszczalnie spowodowane usunięciem komórek hamujących syntezę przeciwciał (Chiodi 1975).

Sterydy gonad w zakażeniach. Estryna powoduje dawko-zależny wzrost przeciwciał w zakażeniu *E. coli*. Usunięcie jajników powoduje dalszy wzrost ich poziomu. Testosteron zmniejsza śmiertelność w zakażeniach pałeczkami jelitowymi (Ahlqvist 1976). Estradiol hamuje rozwój doświadczalnej gruźlicy i kity u królików (Feigen i wsp. 1978). Samice szczurów wcześniej zaczynają odrzucenie *Nippostrongylus brasiliensis*, ale proces ten przebiega u nich wolniej niż u samców. Pozbawienie jajników przyspiesza jego przebieg (Waddel 1971). Estrogen wykazuje działanie ochronne w toksoplazmozie (Kittas, Henry 1979).

Sterydy gonad i alloprzeszczep. Przy słabej niezgodności H-2 u kastrowanych samców myszy odrzucenie przeszczepu skóry następuje wcześniej niż u normalnych zwierząt. Przeszczepienie jąder samicom pozbawionym jajników opóźnia odrzucenie przeszczepu skóry. U samców z wszczepionymi gonadami żeńskimi efekt ten jest mniej wyraźny (Kongshavn 1970). U myszy, które otrzymywały surowicę antytymocytarną (ATS), kastracja powoduje szybsze odrzucenie przeszczepu skóry (Kittas, Henry 1979). Estrogeny powodują przedłużenie przeżycia przeszczepu skóry u myszy, szczurów i królików. Progesteron i testosteron pozostają bez wpływu na proces odrzucania takich przeszczepów (Ahlqvist 1976; Bilder 1976; Pavia i wsp. 1979).

Hormony tarczycy

Usunięcie tarczycy u nowo narodzonych szczurów wpływa na obniżenie odpowiedzi komórek tworzących łyśinki. Obniża ono również wrażliwość komórek śledziony na fitohemaglutyninę i opóźnia odrzucanie przeszczepów skóry (Bathman 1971; Fabris 1973). Odpowiedź przeciwciał na krwinki barana pozostaje niezmieniona (Comsa 1982). Przy niedoczynności tarczycy zwiększa się oporność na podawanie histaminy i acetylocholino i zmniejsza się podatność na anafilaksję (Ahlqvist 1976). Podanie tyroksyny znosi efekty usunięcia tarczycy i obniża śmiertelność w zakażeniu pałeczką wąglika oraz zwiększa wrażliwość świnek morskich na szczepionkę BCG (Ahlqvist 1976; Comsa 1982). Wpływ tarczycy na reakcje odpornościowe jest prawdopodobnie wywierany za pośrednictwem kory nadnerczy i grasicy. Oba narządy ulegają uwstecznieniu po jej usunięciu (Comsa, Leonhardt 1977).

Insulina

Podawanie insuliny powoduje wzrost odpowiedzi na krwinki barana i wzmoczenie wbudowywania tymidyny przez uczulone komórki śledziony i węzłów chłonnych. W przebiegu cukrzycy zahamowana jest odpowiedź proliferacyjna limfocytów na fitohemaglutyninę bez zaburzenia proporcji między komórkami T i B. U szczurów z usuniętą trzustką i z cukrzycą przeszczepy skóry przeżywają dłużej (Ahlqvist 1976). Insulina podnosi aktywność enzymów glikolitycznych w komórkach aktywowanych mitogenami oraz hamuje proliferację komórek pod wpływem konkanawaliny A (Diaz-Espada, Lopez-Alarcon 1982).

Parathormon, kalcytonina i Ca^{++}

Parathormon i kalcytonina regulują zewnątrzkomórkowy poziom wapnia. Parathormon podnosi poziom jonów Ca^{++} , a kalcytonina ma działanie antagonistyczne. U myszy przy wysokim poziomie wapnia przed podaniem antygeny liczba komórek produkujących przeciwciała przeciw krwinkom barana jest obniżona. Jeśli poziom wapnia jest wysoki w czasie podawania antygeny, to efekt ten jest odwrotny. Liczba komórek produkujących przeciwciała obniża się, jeśli poziom jonów wapnia jest wysoki w ciągu 24 godzin po podaniu antygeny. Komórki tworzące łyśinki w odpowiedzi pierwotnej są niezależne od wapnia przez pierwsze 24 godziny po podaniu antygeny. W odpowiedzi wtórnej usunięcie jonów Ca^{++} w czasie do 6 godzin po podaniu antygeny podwyższa stosunek IgM do IgG (Braun 1970; Diamantenstain, Odenwald 1974; Maino 1974). Usunięcie przytarczyc przedłuża przeżycie przeszczepu skóry u szczura (Ahlqvist 1976).

Aminy biogenne i inne transmitery

Acetylocholina, noradrenalina, imidiazol i propranolol obniżają poziom wewnątrzkomórkowy cAMP. Adrenalina, histamina, prostaglandyny, atropina, teofilyna i izoproterenol są antagonistami wyżej wymienionych substancji. Substancje obniżające wewnątrzkomórkowy poziom cAMP stymulują wydzielanie mediatorów zapalnych, immunologiczną lizę limfocytów T, produkcję interferonu i przeciwciał oraz uwalnianie hydrolazy lizosomalnej z neutrofilii. Czynniki podnoszące poziom cAMP hamują tworzenie rozetek z krwinkami barana, aktywność mitotyczną ludzkich limfocytów oraz produkcję MIF.

Komórki śledziony myszy produkujące przeciwciała zatrzymują się w kolumnie z sefarozą zawierającą histaminę, adrenalinę i prostaglandynę E_2 . U myszy uczulonych krwinkami barana wewnątrzkomórkowy cAMP wykazuje ujemną korelację w stosunku do fazy proliferacji komórek. U uczulonych świnek morskich produkcja przeciwciał 7S jest poprzedzona wzrostem poziomu acetylocholiny i histaminy oraz spadkiem poziomu serotoniny (Ahlqvist 1976; Giron 1980).

Hormony przysadki

Usunięcie przysadki powoduje obniżenie odpowiedzi przeciwciał IgM i IgG (Ahlqvist 1976; Gisler, Schenkel-Hulliger 1971a, b). Podanie prolaktyny i somatotropiny przywraca normalny poziom przeciwciał (Gisler, Schenkel-Hulliger 1971a, b). Zwierzęta z usuniętą przysadką wykazują zahamowanie reakcji kontaktowego zapalenia skóry i z opóźnieniem odrzucają przeszczep skóry (Ahlqvist 1976; Comsa i wsp. 1975; Comsa 1982). Podanie kortykotropiny (ACTH) powoduje skrócenie przeżycia przeszczepów skóry u szczurów z usuniętą przysadką i grasicą (Comsa i wsp. 1975; Marx 1974). U zdrowych myszy ACTH nieznacznie opóźnia odrzucenie przeszczepu (Ahlqvist 1976), a u królików nie wpływa na ten proces (Ahlqvist 1976). Podanie somatotropiny powoduje cofnięcie się skutków usunięcia przysadki na odpowiedź humoralną (Ahlqvist 1976), stymuluje aktywność mitotyczną limfocytów T i B oraz produkcję tymozyny. Niedobór somatotropiny powoduje redukcję komórek tworzących łyśinki przeciw *E. coli* i przeciw krwinkom barana oraz obniża poziom IgA i IgM, a podwyższa poziom IgG₁. Podobny wpływ na produkcję przeciwciał ma tyreotropina (Comsa 1982; Gisler 1971; Nagy i wsp. 1983). Prolaktyna hamuje odpowiedź proliferacyjną limfocytów na fitohemaglutyninę i reakcje nadwrażliwości kontaktowej. W okresie laktacji jest zahamowane wyrzucanie *N. brasilliensis* u szczura. Prolaktyna odgrywa prawdopodobnie dużą rolę w procesie nabywania kompetencji immunologicznej. Jej niedobór daje podobne efekty jak usunięcie przysadki (Karmali 1974; Kelly 1973; Nagy 1978; Nagy i wsp. 1983).

Podwzgórze

Działanie czynników wydzielanych przez część nerwową przysadki nie było bezpośrednio badane. Istnieje wiele prac dotyczących wpływu uszkodzenia podwzgórze na rozwój odpowiedzi immunologicznej. Ich wyniki zostały przedstawione w pierwszej części niniejszego opracowania.

PODSUMOWANIE

Przez wiele lat badań uzyskano bardzo znaczną ilość informacji na temat regulacji czynności układu odpornościowego przez ośrodkowy układ nerwowy i system wydzielania dokrewnego. Materiał ten stanowi podstawę do szczegółowych badań mechanizmów kierujących przekazywaniem informacji między tymi trzema układami regulacyjnymi organizmu na poziomie komórkowym i subkomórkowym. Dokładne poznanie wzajemnych zależności w ich funkcjonowaniu umożliwi poznanie przyczyn leżących u podłoża wielu chorób autoalergicznym i niedoborów immunologicznych oraz zaburzeń pośrednio lub bezpośrednio wpływających na powstawanie nowotworów. Badania te mają duże znaczenie również dla rozwoju transplantologii i w leczeniu chorób wieku starczego.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ НЕЙРОГОРМОНАЛЬНОЙ
И ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ СИСТЕМОЙ

Резюме

Представлено современное состояние исследований на тему функциональных связей между нейрогормональной и иммунологической системой.

FUNCTIONAL RELATIONS BETWEEN NEUROHORMONAL
AND IMMUNOLOGICAL SYSTEMS

Summary

Present day state of investigations on functional relations between neurohormonal and immunological systems was introduced.

<http://rcin.org.pl>

PIŚMIENNICTWO

1. Aanerund S., Lillehaug J., Matre R.: Effects of hydrocortisone and protein synthesis inhibitors on FcIgG receptors on cultured fetal rat brain cells. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1983, 70, 46—49.
2. Ablin R. J., Bruns G. R., Guinan P., Buch I. M.: The effect of estrogen on the incorporation of ³H—thimidine by PHA—stimulated human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, 1974, 113, 705—707.
3. Ahlqvist J.: Endocrine influences on lymphatic organs, immune responses, inflammation and autoimmunity. *Acta Endocrinol.*, 1976, *supp.* 206, 9—136.
4. Ambrose C. T.: The essential role of corticosteroids in the induction of the immune response *in vitro*. [W:] *Hormones and the immune response*. Red.: G. E. W. Wolstenholme, J. Knight, Ciba Found. Study Group No 36, Churchill, London 1970, 110—114.
5. Arrenbrecht S.: Specific binding of growth hormone to thymocytes. *Nature (Lond.)*, 1974, 252, 255—264.
6. Bathman A.: Immunosuppressive properties of corticosteroids. *Eur. Surg. Res.*, 1971, 3, 40—51.
7. Bennet J. P.: Serotonin synaptic receptors in the mammalian central nervous system. *Fed. Proc.*, 1978, 37, 187—201.
8. Berczi I.: Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. *Acta Endocrinol.*, 1981, 98, 506—517.
9. Besedowsky H. O.: Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunol.*, 1977, 7, 323—337.
10. Besedowsky H. O., Sorkin E.: Network of immunoendocrine interaction. *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 27, 176—192.
11. Besedowsky H. O., Del Rey A., Sorkin E.: Antigenic competition between horse and sheep red blood cells as a hormone dependent phenomenon. *Clin. Exp. Immunol.*, 1979, 37, 106—113.
12. Bevan J. A.: Norepinephrine and the presynaptic control of adrenergic transmitter release. *Fed. Proc.*, 1978, 37, 187—194.
13. Bilder G. E.: Effect of endocrine manipulation on graft rejection. *Immunol. Comm.*, 1976, 5, 163—169.
14. Braun W.: Suppression and enhancement of antibody levels by alteration of Ca⁺⁺ levels. *Nature (Lond.)*, 1970, 226, 945—948.

15. Castro J. E.: The hormonal mechanism of immunopotentiality in mice after orchidectomy. *J. Endocrinol.*, 1974, 62, 311—327.
16. Castro J. E., Hamilton D. N. H.: Adrenalectomy and orchidectomy as immunopotentiating procedures. *Transplantation*, 1972, 13, 614—623.
17. Chiodi H.: The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology*, 1975, 96, 10—23.
18. Claman H. N.: Corticosteroids and lymphoid cells. *New Engl. J. Med.*, 1972, 24, 388—397.
19. Cohen J. J.: Hydrocortisone resistant graft versus host cells and processes in the hemolytic antibody response. *J. Exp. Med.*, 1971, 133, 1061—1078.
20. Cohen J., Gershon R. K.: The role of cortisone sensitive thymocytes in DNA synthetic responses to antigen. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1975, 249, 451—461.
21. Comsa J.: Hormonal coordination of the immune response. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1982, 92, 115—137.
22. Comsa J., Leonhardt H.: Mécanisme de l'influence de la thyroïde sur le rejet d'allogreffe chez le rat. *J. Physiol. (Paris)*, 1977, 73, 36A.
23. Comsa J., Leonhardt H.: Influence of the adrenal cortex on allograft rejection in rats. *Res. Exp. Med.*, 1979, 175, 51—62.
24. Comsa J., Leonhardt H., Schwartz J. A.: Influence of thymus — corticotropin — growth hormone on the rejection of skin allografts in the rats. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1975, 249, 387—401.
25. Cooper D. A., Petts W., Luckhurst E., Penny R.: The effect of acute and prolonged administration of prednisolone and ACTH on lymphocyte subpopulations. *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 28, 467—473.
26. Daum J. A.: Possible role of involvement of the central nervous system in graft rejection. *Transplantation*, 1979, 27, 223—228.
27. De Micheli P.: The effect of catecholamines blocking drugs on the canine peripheral blood flow. *Brit. J. Pharmacol.*, 1975, 53, 495—502.
28. Diamantstein T., Odenwald M. V.: Control of immune response *in vitro* by calcium ions. I. The antagonistic action of calcium ions on cell proliferation and cell differentiation. *Immunology*, 1974, 27, 531—541.
29. Diaz-Espada F., Lopez-Alarcon L.: Mitogen induced changes in glycolytic enzymes of mouse lymphocytes: influence of insulin on cell activation *in vitro*. *Immunology*, 1982, 46, 705—709.
30. Dracott B. N., Smith C. E. D.: Hydrocortisone and the antibody response in mice. I. *Immunology*, 1979a, 38, 429—433.
31. Dracott B. N., Smith C. E. D.: Hydrocortisone and the antibody response in mice. II. *Immunology*, 1979b, 38, 434—444.
32. Eidinger D., Garret T. L.: Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *J. Exp. Med.*, 1972, 136, 1098—1116.
33. Fabris N.: Immuno-depression in thyroidectomized animals. *Clin. Exp. Immunol.*, 1973, 15, 601—612.
34. Fabris N., Pierpaoli W., Sorkin E.: Hormones and the immunological capacity. IV. *Clin. Exp. Immunol.*, 1971, 9, 227—240.
35. Fan P. T.: Effect of corticosteroids on the human immune response. *Transplantation*, 1978, 28, 266—273.
36. Fauci A. S.: Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. *Immunology*, 1978, 28, 669—678.
37. Fauci A. S., Dale D. C.: The effect of *in vivo* hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 1974, 53, 240—249.

38. Feigen C. A., Fraser R. C., Peterson N. S.: Sex hormones and the immune response. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1978, 57, 488—491.
39. Filipp G.: Mechanism of suppressing anaphylaxis through electrolytic lesion of the tuberal region of the hypothalamus. *Ann. Allergy*, 1973, 31, 272—281.
40. Galant S. P.: Decreased beta-adrenergic receptors on polymorphonuclear leucocytes after adrenergic therapy. *New Engl. J. Med.*, 1978, 229, 933—937.
41. Giron L. T.: Lymph nodes: a possible site for sympathetic neuronal regulation of immune response. *Ann. Neurol.*, 1980, 8, 520—529.
42. Gisler R. H.: Hormonal regulation of the immune response. II. *Cell Immunology*, 1971, 2, 646—650.
43. Gisler R. H., Schenkel-Hulliger L.: Hormonal regulation of the immune response. I. *Cell Immunol.*, 1971a, 2, 534—538.
44. Gisler R. H., Schenkel-Hulliger L.: Hormonal regulation of the immune response. III. *Cell Immunol.*, 1971b, 2, 651—654.
45. Haynes B. F.: The differential effect of *in vivo* hydrocortisone on the kinetics of subpopulations of human peripheral blood thymus-derived lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 1978, 61, 703—711. <http://rcin.org.pl>
46. Hellig G., Waldek J. F.: Effect of cortisol on the primary immune response to sheep erythrocytes *in vivo* by mouse spleen cells. *J. Vet. Res.*, 1974, 41, 29—33.
47. Hooper J. S.: Purification and properties of bovine thymosin. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1975, 249, 125—132.
48. Horne C. H.: The effect of age, sex, pregnancy and progesterone on rat serum proteins. *J. Endocrinol.*, 1972, 54, 47—56.
49. Jankovic B. P.: The embryonic lympho-neuro-endocrine relationship. *Clin. Immunopathol.*, 1981, 18, 108—116.
50. Jennsen H. L., Eckert R., Mix E., Schulz U., Schnitzler S.: Histamine receptor bearing lymphocytes. *Acta Biol. Med. Germ.*, 1982, 41, 625—641.
51. Karmali R. A.: Prolactin and the immune response. *Lancet*, 1974, 2, 106—113.
52. Katz P.: The effects of corticosteroids on immunoregulation in sarcoidosis. *Cell Immunol.*, 1979, 42, 303—330.
53. Keller S. E.: Suppression of lymphocyte stimulation by anterior hypothalamic lesions in the guinea pig. *Cell Immunol.*, 1980, 52, 334—341.
54. Kelly J. D.: The suppression of rejection of *Nippostrongylus brasiliensis* in Lewis strain rats treated with ovin prolactin. 1973, 24, 551—560.
55. Kittas C., Henry L.: Effect of sex hormones on the immune system of guinea pigs and the development of toxoplasmic lesions in nonlymphoid organs. *Clin. Exp. Immunol.*, 1979, 36, 16—19.
56. Kongshavn P. A. L.: Sex differences in survival of H-2 incompatible skin grafts in mice treated with antithymocyte serum. *Nature (Lond.)*, 1970, 226, 451—453.
57. Lefkowitz R. J.: Identification and regulation of alpha- and beta-adrenergic receptors. *Fed. Proc.*, 1978, 57, 123—127.
58. Liewendahl K.: Triiodothyronine binding to lymphocytes from euthyroid subject and a patient with peripheral resistance to thyroid hormone. *Acta Endocrinol.*, 1976, 83, 64—74.
59. Lippman M.: Glucocorticoid receptors in purified subpopulations of human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.*, 1977, 118, 1977—1981.
60. Maino V. C.: The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. *Nature (Lond.)*, 1974, 251, 324—328.

61. Maor D.: Participation of hormone in the early stages of the immune response. *Acta Endocrinol.*, 1974, 75, 205—221.
62. Marx S. J.: Calcitonin receptors on cultured human lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, 6812—6823.
63. McGrath M. A.: Histamine and 5-hydroxytryptamine inhibition of transmitter release mediated by H₂ and 5-hydroxytryptamine receptors. *Fed. Proc.*, 1978, 37, 187—189.
64. McLachlan S. M.: Acetylcholine receptor antibody synthesis in lymphocyte cultures. *J. Clin. Lab. Immunol.*, 1981, 5, 137—145.
65. McMillan R., Longmire R., Yelenosky R.: The effect of corticosteroids on human IgG synthesis. *J. Immunol.*, 1976, 116, 1592—1595.
66. Nagy E.: Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol.*, 1978, 89, 530—539.
67. Nagy E., Berczi I.: Prolactin and contact sensitivity. *Allergy*, 1981, 36, 429—431.
68. Nagy E., Berczi I., Friesen H. G.: Regulation of immunity in rats by lactogenic and growth hormones. *Acta Endocrinol.*, 1983, 351—357.
69. Olafsson J. H., Granerus G., Roupe G.: Effect of antihistamine (H₁ and H₂), cortisone and beta-adrenergic stimulator on murine contact sensitivity and histamine metabolism. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.*, 1983, 70, 174—177.
70. Pandian M. R.: Effect of growth hormone on the metabolism of the thymus and the immune response against sheep erythrocytes. *J. Exp. Med.*, 1971, 134, 1095—1101.
71. Passwel J. H., Dayer J. M., Merler E.: Increased prostaglandin production by human monocytes after membrane receptor activation. *J. Immunol.*, 1979, 123, 115—118.
72. Pavia C., Siiteri P. K., Perlman J. D., Stites D. P.: Suppression of murine allogenic cell interactions by sex hormones. *J. Rep. Immunol.*, 1979, 1, 33—38.
73. Pierpaoli W.: Interdependence between neuroendocrine programming and the generation of immune recognition in ontogeny. *Cell Immunol.*, 1979, 38, 578—582.
74. Pierpaoli W., Maestroni G. J.: Pharmacological control of the hormonally modulated immune response. *Immunology*, 1978, 34, 419—422.
75. Pochet R.: Distribution of beta-adrenergic receptors on human lymphocyte subpopulations. *Clin. Exp. Immunol.*, 1979, 39, 578—582.
76. Riley V.: Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. *Science*, 1981, 212, 1100—1103.
77. Saxon A.: Histamine receptor leucocytes (HRL). *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, 28, 394—402.
78. Schleimer R. P., MacGlashan D. W., Gillespie E., Lichtenstein L. M.: Inhibition of basophil histamine release by antiinflammatory steroids. *J. Immunol.*, 1982, 129, 1632—1636.
79. Strom T. B.: Cholinergic augmentation of lymphocyte mediated cytotoxicity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, 1330—1334.
80. Tolone G., Bonasera L., Tolone C.: Influence of hydrocortisone on the modulation of the inflammatory response. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 1978, 59, 366—372.
81. Tsokos G. C., Christian C. B., Balow J. E.: Concanavalin-induced suppressor cells: characterization on the basis of corticosteroid and radiation sensitivity. *Immunology*, 1982, 47, 85—90.
82. Van Dijk H., Jacobsen Geels H. E. L.: Evidence for the involvement of cor-

- ticosterone in the ontogeny of the cellular immune apparatus of the mouse. *Immunology*, 1978, 35, 637—641.
83. Waddel A. H.: The influence of sex on intestinal immunological reactions. *Res. Vet. Sci.*, 1971, 12, 396—402.
 84. Williams J. M.: Sympathetic innervation of murine thymus and spleen. *Brain Res. Bull.*, 1980, 6, 83—87.
 85. Williamson H. O.: Cyclic variations in white cell subpopulations in the human menstrual cycle: correlations with progesterone and estradiol. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1979, 13, 246—252.
 86. Yu D. T. Y.: Effect of corticosteroids on lymphocyte activation. *Blood*, 1977, 49, 873—877.

Adres autorki: Zakład Chirurgii Transplantacyjnej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Chałubińskiego 5, 02-004 Warszawa

<http://rcin.org.pl>

JANUSZ SZYMAŚ

DIAGNOSTIC VALUE OF DEMONSTRATING GLIAL
FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN IN HUMAN ASTROCYTOMAS *

Department of Pathology, School of Medicine, Poznań

<http://rcin.org.pl>

The isolation and localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the cytoplasm of astrocytes and application of immunohistochemical techniques to formalin-fixed and paraffin-embedded tissue provide a new valuable tool for neuropathological study.

Immunohistochemical localization of GFAP has been applied to study neuroglial differentiation in a developing brain (Eng, De Armond 1982), to delineate the astrocytic reaction to brain injury (Dahl et al. 1981), brain uedema (Szymaś, Hossmann 1984) and in the diagnosis of human (Deck et al. 1978; Eng, Rubinstein 1978; Valasco et al. 1980) as well as experimental tumors of the central nervous system (Conley 1979).

The aim of this paper is comparison of detailed immunohistochemical localization of GFAP in all subgroups of human astrocytomas with results of other staining and impregnation methods as well as electron microscopy findings used today for classification and grading of astrocytomas.

MATERIAL AND METHODS

One hundred seven human astrocytomas were investigated: 15 were fibrillary, 12 protoplasmic, 15 gemistocytic, 25 anaplastic, 35 pilocytic, 3 giant cell astrocytomas and 2 cases were xanthoastrocytomas.

Specimens were obtained during surgery, placed immediately after removal in 4% formaldehyde, diluted in phosphate-buffered saline (PBS) for 12 hours, then dehydrated and embedded in paraffin. Sections 5 μ m thick were deparaffinated in xylene, rehydrated in a graded ethanol

* Supported by the governmental Grant PR-06. A preliminary report was presented at the 4th Hungarian-Polish Neuropathological Symposium on Astrocytes in Balatonszemes, May 8—10, 1983.

series and rinsed in phosphate-buffered saline. Alternate sections were stained with HE and PTAH, impregnated after Cajal and processed for immunohistochemical visualisation of GFAP (Sternberger 1979). For the latter purpose, sections were treated with 0,3% hydrogen peroxide in anhydrous methanol for 30 min to block endogenous peroxidase activity. Subsequently, incubations with the following reagents were performed at ambient temperature:

— commercially available normal swine serum (Dako, Copenhagen, Denmark), diluted 1 : 20 in PBS;

— rabbit antiserum directed against GFAP, diluted 1 : 50 in PBS. This serum was prepared by immunizing rabbits with antigen from human white matter obtained at autopsy;

— commercially available swine anti-rabbit Ig (Dako), diluted 1 : 40 in PBS;

— soluble peroxidase-anti-peroxidase complex (Dako), diluted 1 : 100 in PBS.

Between each incubation the sections were shortly rinsed with PBS. Nonspecific binding of immunoglobulin to the cytoplasm of astrocytes was prevented by absorption of GAP sera with unsolubilized normal human serum proteins (Singh et al. 1979). At the end of each incubation step, the sections were rinsed in Tris buffer, pH 7,6 and peroxidase activity was visualized by immersing the sections in 0,01% hydrogen peroxide and freshly prepared 0,05% 3-3-diamino-benzidine tetrachloride (DAB, Serva, Heidelberg, FRG) in 0,1 M Tris buffer. Thereafter, the sections were mounted for histological examination.

A complete series of control sections was prepared by omitting anti-GFAP serum or by using anti-GFAP serum previously absorbed by purified GFAP. In the latter case, complete absorption of anti-GFAP serum was confirmed by radioimmunoassay. In some animals, control sections were prepared by omitting one of the four incubation steps, respectively. Pre-treatment of sections with picric acid for removal of formalin pigment did not interfere with GFAP staining.

For electron microscopic study, small tissue samples were taken from different areas of 52 tumors immediately after their removal from the cranial cavity. They were fixed in Karnovsky's solution (1965) and post-fixed in osmium tetroxide, then dehydrated and embedded in Epon resin. Semithin and ultrathin sections were cut in the OmU₃ ultramicrotome. The semithin sections were stained with toluidine blue, ultrathin ones were counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Electron microscopic pictures were made in JEM 7A and OPTON 10A microscopes.

The tumors were classified according to the International Histological Classification of Tumors of the Central Nervous System (Zülch 1979).

RESULTS

Fibrillary astrocytoma (15 cases)

Hematoxylin and eosin staining demonstrated tumors of moderate cellularity. The cell nuclei were slightly hyperchromatic and isomorphic. Mitotic figures were extremely rare. The cytoplasm was delicately stained with eosin. Focally macro- et microcysts were formed. The border of tumors was usually not sharp and tumor cells were intermingled with reactive glial cells.

In electron microscopy (7 cases), the astrocytes presented multiple cellular processes and scanty cytoplasm. The processes and the perikarya were full of filaments of 8—10 nm in diameter. PTAH staining demonstrated glial fibrils and numerous cytoplasmic processes. In Cajal impregnation, the metallic deposits visualized astrocytic cells with many processes.

<http://rcin.org.pl>

GFAP immunostaining resulted in dark brown deposits in the perikarya and in the processes of numerous tumor cells (Fig. 1a, b).

Protoplasmatic astrocytoma (12 cases)

This type of tumor in HE staining was found to contain more numerous cells than fibrillary tumors and consisted of stellate cells with delicate processes, forming a fine-web matrix and small microcysts. The borders of tumors were relatively diffuse.

Ultrastructurally the tumors (5 cases), contained astrocyte-like cells of fibrillary or protoplasmic type, with predominance of the latter. Tumor cells like protoplasmic astrocytes contained only a few glial filaments. PTAH staining revealed that these small, stellate cells were nonfibrillary in this staining method. Only some areas of fibrous astrocytes were demonstrated to contain intracytoplasmic glial fibrils. Impregnation after Cajal resulted in slightly diffuse metallic deposits on the perikarya in the majority of tumor cells.

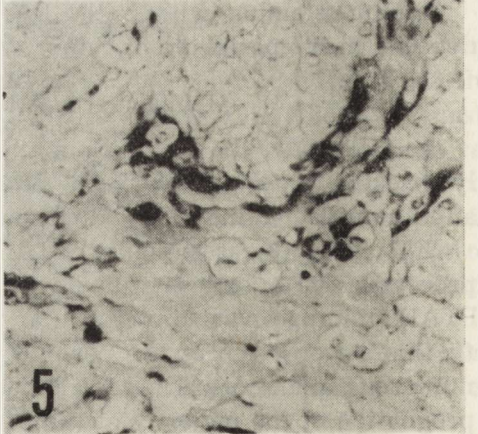
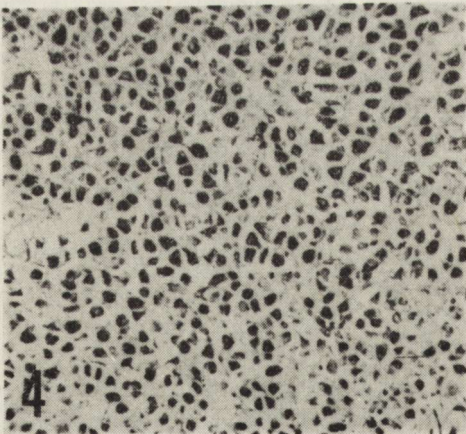
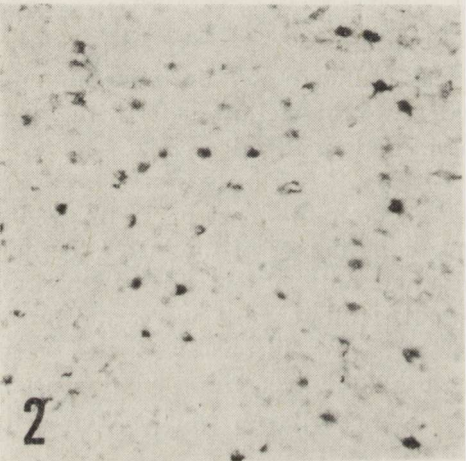
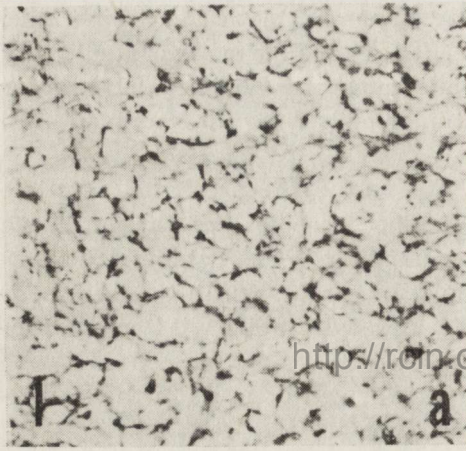
Immunostaining with anti-GFAP serum resulted in slightly brown deposits in the perikarya of tumor cells (Fig. 2).

Gemistocytic astrocytoma (15 cases)

In HE study, the well circumscribed tumors were composed of closely packed, globoid cells with prominent, eccentrically located nuclei and abundant, eosinophilic cytoplasm.

EM study (8 cases) confirmed the presence of cells with short blunt processes and cytoplasm filled with bundles of compact glial filaments. PTAH staining revealed nonfibrillary cells (Fig. 3). Only occasionally scanty fibers were seen at the periphery of a few cells. Processes were not numerous and short. The Cajal method revealed a distinct metallic impregnation of the majority of tumor cells.

The reaction with anti-GFAP serum resulted in strong immunostaining of tumor cells with predominance of the larger ones. Focally, the small, undifferentiated cells remained unstained (Fig. 4).



Anaplastic astrocytoma (25 cases)

In HE staining this subgroup of astrocytoma was represented by highly cellular and sharply demarcated tumor. Tumor cells exhibited pink cytoplasm with irregular hyperchromatic nuclei and frequent intranuclear inclusions of cytoplasm. Giant cells and mitotic figures were also observed. Vascular endothelial proliferation was a common feature but necrosis and cyst formation were rare.

Electro-microscopically (11 cases), two types of cells were distinguished: "light" ones without intracytoplasmic filaments, and "dark" ones with some bundles of them. In PTAH staining all cells remained nonfibrillar. Cajal impregnation revealed distinct metallic deposits in some, especially large and giant, cells.

GFAP immunostaining visualized that some cells, particularly larger and giant ones, showed a positive reaction or only a part of the cytoplasm was positive in this method (Fig. 5).

Pilocytic astrocytoma (35 cases)

In this subgroup 17 tumors were cerebellar, 5 hemispheric and 13 optic gliomas.

In HE study two types of histological pattern were distinguished: solid and spongy. Fusiform cells predominated in the solid part of the tumor. They possessed unusually long, bipolar processes, which tended to form parallel bundles. Rosenthal fibers represented a degeneration feature in this part of tumor. Perikarya and processes of fusiform cells were strong-

Fig. 1. Fibrillary astrocytoma. Positive immunostaining of perikarya and processes of tumor cells. PAP—GFAP. a) $\times 80$, b) $\times 350$

Ryc. 1. Gwiaździak włókienkowy. Dodatni odczyn immunohistochemiczny w perykariach i wypustkach komórek guza. GFAP—PAP. a) Pow. $80 \times$, b) Pow. $350 \times$

Fig. 2. Protoplasmatic astrocytoma. Immunostaining deposits mark perikarya and some delicate processes of tumor cells. PAP—GFAP. $\times 160$

Ryc. 2. Gwiaździak protoplazmatyczny. Dodatni odczyn immunohistochemiczny wyznacza perykaryony i nieliczne delikatne wypustki komórek guza. GFAP—PAP. Pow. $160 \times$

Fig. 3. Gemistocytic astrocytoma. Nonfibrillary tumor cells. PTAH. $\times 450$

Ryc. 3. Gwiaździak tuczno komórkowy. Komórki guza bez włókien glejowych. PTAH. Pow. $450 \times$

Fig. 4. Gemistocytic astrocytoma. Strong immunostaining of tumor cells. Cells with abundant cytoplasm stain intensely. Small cells remain unstained. PAP—GFAP. $\times 120$

Ryc. 4. Gwiaździak tuczno komórkowy. Wyraźny odczyn immunohistochemiczny w komórkach guza. Komórki z obfitą cytoplazmą intensywnie zabarwione. Niezabarwione małe komórki. GFAP—PAP. Pow. $120 \times$

Fig. 5. Anaplastic astrocytoma. Only a part of cytoplasm of giant, polymorphic cells are positive. PAP—GFAP. $\times 400$

Ryc. 5. Gwiaździak anaplastyczny. Częściowo dodatni odczyn w cytoplazmie olbrzymich polimorficznych komórek. GFAP—PAP. Pow. $400 \times$

ly positive in PTAH staining, which revealed numerous processes and glial fibers. The Cajal method impregnated slightly the tumor cells. Only Rosenthal fibers were heavily impregnated.

GFAP immunostaining was accentuated in fusiform cells, especially in their processes (Fig. 6). Rosenthal fibers reacted strongly as solid coarser masses or only at their periphery (Fig. 7).

In EM examination (21 cases), the solid part of the tumor was composed of cells resembling fibrillary astrocytes. They contained abundant bundles of glial fibers in their processes. Rosenthal fibers contained fibrillary material only at their periphery.

The spongy part of the tumor, i.e. sometimes the predominant part of the tumor, was composed of small stellate cells characterized by a tendency to form small and larger cysts. Granular bodies represented a form of degeneration of the tumor cells. In EM pictures the cells resembled protoplasmic astrocytes with scanty glial filaments. The stellate cells appeared nonfibrillary in PTAH staining and negative in Cajal impregnation.

GFAP immunostaining was also positive only in cells with more abundant cytoplasm. In Zülch's granular bodies a ringlike distribution of immunostaining was observed.

Subependymal giant cell astrocytoma (3 cases*)

The tumors were composed of bizarre cells, usually with a large cytoplasm and a chromatin-rich nucleus with nucleoli. Sometimes, the nuclei were more vesicular, with one nucleolus resembling that of the neuron. Occasionally, the cells were multinuclear. Tumor cells radiated around the vessels to which they were attached with long stout processes. Less often a conspicuous arrangement in long streams was noted.

PTAH staining revealed numerous thick glial fibers at the margins of the cell. In the Cajal method tumor cells were negative. EM study was not performed. Large tumor cells did not stain for GFAP, except for an occasional positivity of the cell periphery (Fig. 8).

Pleomorphic xanthoastrocytoma (2 cases**)

Both tumors were located superficially in the brain with extensive involvement of cerebral cortex and leptomeninges. Tumors were highly cellular with marked pleomorphism, including bizarre giant cells. Mito-

* I wish to express my thanks to Prof. Dr. n.e. K. J. Zülch (Head, of The Reference Center of the WHO for Histological Classification of Tumors of the Central Nervous System. Max-Planck-Institute for Brain Research Cologne, F.R.G) for providing 3 cases of subependymal giant cell astrocytoma.

** I am most grateful to Dr. J. Alwasiak (Oncological Department of Academy of Medicine, Łódź) for providing 1 case of pleomorphic xanthoastrocytoma.

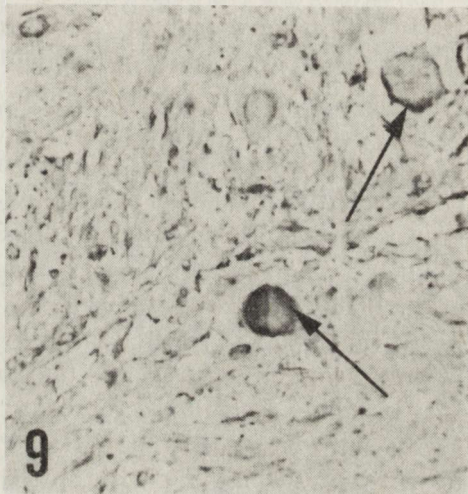
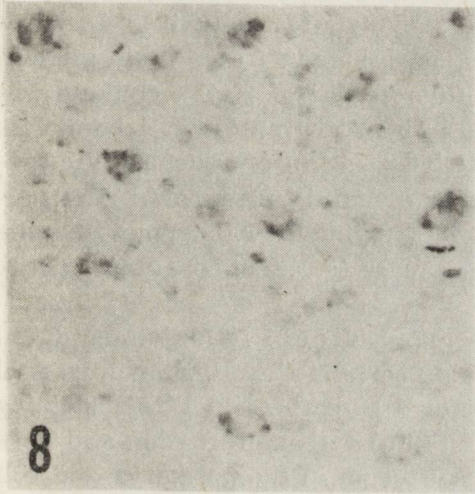
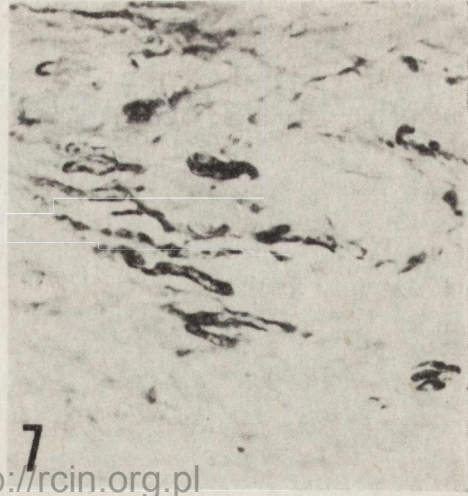
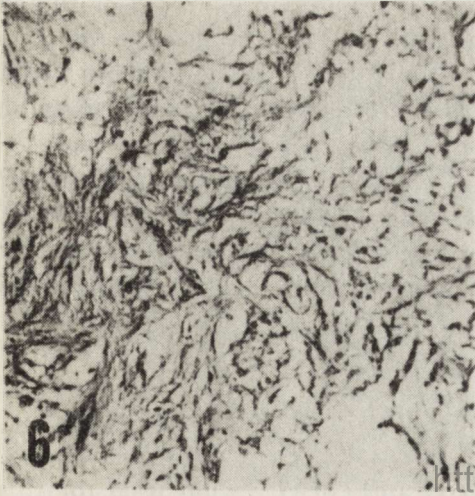


Fig. 6. Pilocytic astrocytoma. Immunostaining of fusiform cells and Rosenthal fibers. PAP—GFAP $\times 80$

Ryc. 6. Gwiaździak pilocytarny. Odczyn immunohistochemiczny w komórkach wrzecionowatych i we włóknach Rosenthala. GFAP—PAP. Pow. $80 \times$

Fig. 7. Wall of a cystic pilocytic astrocytoma. Evidence of GFAP is present only at the periphery of Rosenthal fibers. PAP—GFAP. $\times 480$

Ryc. 7. Ściana jamistego gwiaździka pilocytarnego. GFAP—dodatni odczyn widoczny tylko na obwodzie włókien Rosenthala. GFAP—PAP. Pow. $480 \times$

Fig. 8. Subependymal giant cell astrocytoma. Immunostaining positivity is seen only at the periphery of larger tumor cells. PAP—GFAP. $\times 120$

Ryc. 8. Podwysięciółkowy gwiaździk olbrzymiokomórkowy. Dodatni odczyn immunohistochemiczny na obwodzie dużych komórek guza. GFAP—PAP. Pow. $120 \times$

Fig. 9. Pleomorphic xanthoastrocytoma. Rim positivity for GFAP immunostaining at the periphery of bizarre giant cells (arrows) filled with lipid droplets. PAP—GFAP. $\times 250$

Ryc. 9. Żółtako-gwiaździk pleomorficzny. Dodatni odczyn histochemiczny w postaci rąbka na obwodzie dziwacznych komórek olbrzymich (strzałki) wypełnionych kroplami lipidów. GFAP—PAP. Pow. $250 \times$

tic figures were frequent. Prominent lipid droplets in giant larger tumor cells represented a characteristic feature. In abundant eosinophilic cytoplasm no fibrils could be demonstrated with PTAH staining. In Cajal impregnation only large and bizarre giant cells revealed slight metallic deposits.

Tumor cells were variably positive in immunostaining with anti-GFAP serum and especially large and giant cells contained large amounts of GFAP. The cells with lipids in their cytoplasm showed positivity for GFAP only in the peripheral lipid-free cytoplasmic margin (Fig. 9). EM study was not performed.

DISCUSSION

The method for obtaining GFAP and anti-GFAP serum used for this study has been previously published (Szymaś, Morkowski 1984). Anti-GFAP serum was capable of labelling astrocytes in frozen brain sections of adult mouse when either immunofluorescence or PAP technique was used. Its identity with anti-GFAP sera obtained from other laboratories has been proven (Szymaś, Morkowski 1984) and in consequence the specificity of the presently used anti-GFAP serum, is unequivocal. The present report confirms the usefulness of applying GFAP immunostaining for diagnosis of human astrocytomas as suggested by other authors (Deck et al. 1978; Velasco et al. 1980).

In the group of fibrillary astrocytoma results of PTAH staining, Cajal impregnation and GFAP immunostaining correlated well. Numerous glial filaments in electron microscopic pictures and fibres in PTAH staining corresponded to heavy metallic deposits in Cajal impregnation and dark brown immunostaining with anti-GFAP serum in the perikarya and cell processes.

In protoplasmic astrocytomas, the predominant cellular forms resembled protoplasmic astrocytes. In EM they showed only a few glial filaments in the cytoplasm. This finding corresponded with negative PTAH staining, Cajal impregnation and GFAP immunostaining.

A distinct pattern was noted in the gemistocytic astrocytomas. In EM study, the cytoplasm of tumor cells was filled with glial filaments, negative in PTAH staining. On the contrary, the Cajal method and GFAP immunostaining revealed their distinct positivity. However, the latter favoured the larger and giant tumor cells.

In anaplastic astrocytomas PTAH staining did not visualize glial filaments in "dark" tumor cells well distinguishable electron-microscopically, because of the content of glial filaments. EM pictures correlated well with GFAP immunostaining. Tumor cells, predominantly larger ones,

reacted only partially. This may correspond to only a few bundles of glial filaments visualised by electron microscopy.

Strong GFAP-positive large and giant cells, despite their polymorphism, may represent the nonproliferating or even regressing component of the neoplasm. Strong immunostaining of tumor cells resembling gemistocytic astrocytes, indicates, that the cells contain a large amount of GFAP and may be well differentiated. This was additionally supported by the studies on incorporation of labelled nucleic acid precursors; these have shown that gemistocyte-like tumor cells in gliomas multiply slowly (Hoshino et al. 1979). Following dexamethasone treatment, the morphology of astrocytic tumors was also characterized by extreme polymorphism and the presence of giant cells, exhibiting strong cytoplasmic GFAP immunostaining (Szymaś, Hossmann 1984). The inhibition of tumor growth by corticosteroids is a well known phenomenon (Wright et al. 1969; Wilson et al. 1972; Gambarini 1979; Hoshino 1979). Poor GFAP immunostaining of the small, less mature cells in highly anaplastic areas of gemistocytic and anaplastic astrocytomas may indicate that the cells represent immature cell forms, responsible for the growth of the tumor. GFAP appears during the development and maturation of neuroglia and may be a marker for astrocytic differentiation (Bignami, Dahl 1973). In the same, but inverted way, the present study shows a decrease in the number of positive cells in astrocytomas with increasing malignancy. This suggests, that the absence of GFAP in tumor cells of astrocytomas may indicate dedifferentiation and may be used for biological grading of astrocytomas. Although highly anaplastic, small cellular astrocytomas contained only some GFAP-positive cells, still their number may suffice for accurate histological diagnosis at the light microscopic level.

In unaltered brain and in reactive gliosis, such as present around gliomas GFAP was detectable in the perinuclear cytoplasm and cell processes (Szymaś, Hossmann 1984). Frequently, positively stained cell processes extended and became continuous with the perivascular glial membrane. The absence of pericapillary activity in differential diagnosis between reactive gliosis and low grade astrocytomas favours the later (Bignami et al. 1980; Velasco et al. 1980; Dahl et al. 1981).

Notwithstanding the high specificity of GFAP immunostaining for visualization of glial fibers in pilocytic astrocytoma, in Rosenthal fibers and in granular bodies, the present study demonstrated some discrepancies between only moderate GFAP-immunostained tumor cells in the solid part of pilocytic astrocytomas and abundant bundles of filaments seen in electron microscopy. One can suppose that in pilocytic astrocytomas the other types of intermediate filaments — vimentin — may also be present in tumor cells; recently these filaments have been localised in fibrous astrocytes of the cerebral white matter (Dahl et al. 1981).

The immunoperoxidase method for GFAP detection has proven to be of great help in identification of pleomorphic xanthoastrocytoma. This new, distinct form of astrocytomas, described first by Kepes et al. (1979), cannot be identified with other cytologic markers for astrocytes, such as PTAH staining or Cajal impregnability, because lipidisation obscures its positivity (Kepes 1979).

The origin of subependymal giant cell astrocytomas is obscure and has not been resolved by GFAP immunostaining. Giant cells were not stained for GFAP, only adjacent reactive astrocytes were positive. The GFAP-positivity of giant cells periphery represents probably the reaction in the processes of astrocytes, which closely surround these cells. The immunohistochemical studies can not confirm the astrocytic nature of this tumor, as believed by other authors on the basis of electron-microscopic studies (Ribadeau-Dumas et al. 1973; de Chadarevion, Hollenberg 1979).

Although PTAH staining is very useful for demonstration of astroglial fibers in normal and reactive astrocytes, its usefulness for diagnostic neurooncology is debatable because of the absence of PTAH positivity in gemistocytic and more malignant astrocytomas. The method was proved to be not specific for glial fibers as positive staining concerns fibrin, nuclei of all cells, elements of blood vessel walls and other intracytoplasmic fibers.

Good correlation has been noted between Cajal impregnation and GFAP immunostaining results. Cajal impregnation is a widely used method for frozen sections while for paraffin sections the method is used only by a few laboratories because of the ambiguity of its results. However, metallic impregnation can only visualize cell outlines and in more malignant astrocytomas microscopic pictures become illegible.

To summarise, in comparative studies with classical staining, impregnation and immunohistochemical methods with anti-GFAP serum, the latter are superior and most convenient one for demonstration of glial filaments, because of their specificity and sensitivity. Cytoplasm staining may be demonstrated in the absence of PTAH-positive fibrillary material. Demonstration of the presence or absence of GFAP in all subgroups of astrocytoma seems to contribute a fairly reliable criterion for classification of these tumours. It may be also helpful in establishing the degree of malignancy. Loss of GFAP favours the assumption that a dedifferentiation process takes place. The number of cells containing this protein is inversely proportional to the degree of anaplasia.

This procedure gives consistent results and is considerably more sensitive, while its results are less ambiguous than those of conventional PTAH staining and Cajal impregnation used up till now for neurooncological diagnosis of human astrocytomas.

WARTOŚĆ DIAGNOSTYCZNA BADANIA KWAŚNEGO BIAŁKA WŁÓKIENEK GLEJOWYCH (GFAP) W GWIAŻDZIAKACH U LUDZI

Streszczenie

Zbadano 107 ludzkich gwiaździaków, używając surowicy przeciwko kwaśnemu białku włókienek glejowych w celu ustalenia immunohistochemicznej jego lokalizacji w komórkach guza.

Badanie porównawcze wyników klasycznych metod barwienia, metod impregnacyjnych i metody immunohistochemicznej wykazało wyższość tej ostatniej do wykazania obecności włókienek glejowych. Dodatni odczyn dla GFAP w cytoplazmie można uzyskać w przypadku niewykazania włókienek glejowych w metodzie PTAH. Wyniki badań immunohistochemicznych potwierdza obecność filamentów glejowych w mikroskopie elektronowym.

Immunohistochemiczna metoda ujawnienia GFAP może być również pomocna do ustalenia stopnia złośliwości guza. Liczba glejowych komórek GFAP-dodatnich jest odwrotnie proporcjonalna do stopnia anaplazji.

Komórki olbrzymie, przeważnie silnie GFAP-dodatnie reprezentują nieproliferacyjny, albo nawet regresywny, komponent nowotworu.

Wyniki badania immunohistochemicznego GFAP miały stały charakter we wszystkich dużych grupach badanych guzów. Metoda ta wydaje się bardzo przydatna w neuroonkologicznym rozpoznawaniu gwiaździaków ludzkich.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ КИСЛОГО БЕЛКА ГЛИОЗНЫХ ФИБРИЛЛ (GFAP) В АСТРОЦИТОМАХ У ЛЮДЕЙ

Резюме

Исследовано 107 человеческих астроцитом применяя сыворотку против кислого белка глиозных фибрилл с целью установления его гистохимической локализации в клетках опухоли.

Сравнительное исследование результатов классических методов окраски, импрегнационных методов и гистохимического метода доказало преимущество последнего для проявления глиозных фибрилл. Положительную реакцию для GFAP можно получить в случае не проявления глиозных фибрилл методом PTAH. Результаты иммуногистохимических исследований подтверждают наличие глиозных филаментов в электронном микроскопе.

Имуногистохимический метод проявления GFAP может быть полезен также для определения злокачественности опухоли. Число глиозных GFAP-положительных клеток обратно пропорционально степени анаплазии. Гигантские клетки, по большей части сильно GFAP-положительны, представляют непролиферационный или даже регрессивный компонент опухоли.

Результаты иммуногистохимического исследования GFAP имели постоянный характер во всех больших группах исследованных опухолей. Кажется, что этот метод является очень хорошим и пригодным методом для невроонкологического диагноза человеческих астроцитом.

REFERENCES

1. Bignami A., Dahl D.: Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tracts of the newborn rat. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. Brain Res., 1973, 49, 393—402.

2. Bignami A., Dahl D., Rueger D. C.: Glial fibrillary acidic protein (GFA) in normal neural cells and in pathological condition. *Adv. Cell. Neurobiol.*, 1980, 1, 285—310.
3. Chadarévion J. P., Hollenberg R. D.: Subependymal giant cell tumor of tuberous sclerosis. A light and ultrastructural study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1979, 38, 419—433.
4. Conley F. K.: The immunocytochemical localization of GFA protein in experimental murine CNS tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1979, 45, 9—16.
5. Dahl D., Bignami A., Weber K., Osborn M.: Filament proteins in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration: localization of vimentin, the fibroblastic 100 Å filament protein in normal and reactive astrocytes. *Exp. Neurol.*, 1981, 73, 496—506.
6. Deck J. H. N., Eng L. F., Bigbee J., Moodcock S. M.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1978, 42, 183—190.
7. Eng L. F., DeArmond S. J.: Immunocytochemical studies of astrocytes in normal development and disease. In: *Advances in Cellular Neurobiology*. Eds. S. Fedoroff, L. Hertz, Academic Press, New York—London 1982, 145—171.
8. Eng L. F., Rubinstein L. J.: Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, 26, 513—522.
9. Gambarini A. G.: Glioma cell growth: effect of pituitary factor, hydrocortisone and serum. *Rev. Bras. Biol.*, 1979, 39, 671—676.
10. Hoshino T.: The cell kinetics of gliomas: its prognostic value and therapeutic implications. In: *Multidisciplinary Aspects of Brain Tumor Therapy*. Eds. P. Paoletti, D. Walker, G. Butti, R. Knerich. Elsevier (North-Holland Biomedical Press), 1979, 105—112.
11. Karnovsky M.: A formaldehyde — glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 1965, 27, 137.
12. Kepes J. J.: "Xanthomatous" lesions of the central nervous system: Definition, classification and some recent observations. In: *Progress in Neuropathology*. Ed. H. M. Zimmerman Raven Press, New York 1979, 179—213.
13. Kepes J. J., Rubinstein L. J., Eng L. F.: Pleomorphic xanthoastrocytoma. A distinctive meningocerebral glioma of young subjects with relatively favorable prognosis. *Cancer*, 1979, 44, 1839—1852.
14. Ribadeau-Dumas G. L., Poirier G., Escourolle R.: Etude ultrastructurale des lésions cérébrales de la sclérose tubéreuse de Bourneville. A propos d'un cas. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1973, 25, 259—270.
15. Singh G., Whiteside T. L., Dekker A.: Immunodiagnostic mesothelioma. Use of antimesothelial serum in an indirect immunofluorescent assay. *Cancer*, 1979, 43, 2288—2296.
16. Sternberger Z. A.: Immunocytochemistry. 2nd ed. J. Wiley and Sons, New York 1979.
17. Szymaś J., Hossmann K. A.: Effect of dexamethasone on glial fibrillary acidic protein in peritumorous edema of cats: A morphometric study. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1984, 62, 309—315.
18. Szymaś J., Morkowski S.: Anti-glial fibrillary acidic protein serum. Obtainment and implications. *Immunol. Pol.*, 1984, 9, 135—144.
19. Velasco M. E., Dahl D., Roessmann U., Gambetti P.: Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer*

- 1980, 45, 484—494.
20. Wilson Ch. B., Barker M., Hoshino T., Oliver A., Downie R.: Steroids induced inhibition of growth in glial tumors: a kinetic analysis. In: Steroids and Brain Edema. H. J. Reulen and K. Schürmann. Springer, Berlin—Heidelberg—New York 1972, 92—100.
 21. Wright R. L., Shaumba B., Keller J.: The effect of glucocorticosteroids on growth and metabolism of experimental glial tumors. *J. Neurosurg.*, 1969, 30, 140—145.
 22. Zülch K. J.: *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System. International Histological Classification of Tumours.* WHO. Geneva 1979.

Author's address: Department of Clinical Pathomorphology, Academy of Medicine, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań

<http://rcin.org.pl>

JANUSZ SZYMAŚ

OCENA ZNACZENIA DIAGNOSTYCZNEGO KWAŚNEGO BIAŁKA WŁÓKIENEK GLEJOWYCH W WYŚCIÓŁCZAKACH *

Zakład Patomorfologii Klinicznej, Akademia Medyczna, Poznań

Wyizolowanie kwaśnego białka włókienek glejowych (GFAP) (Eng i wsp. 1971) oraz przystosowanie technik immunohistochemicznych do badań materiału biopsyjnego utrwalanego w formalinie i zatapianego w parafinie (Sternberger i wsp. 1970) pozwoliło na wybiórcze jego uwidocznienie w preparatach histologicznych. Metodę tę zastosowano w badaniach rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (Bignami, Dahl 1973, 1975), reakcji odczynowych gleju (Bignami, Dahl 1976; Szymaś, Hossmann 1984) oraz rozrostów nowotworowych (Deck i wsp. 1978; Duffy i wsp. 1978; Velasco i wsp. 1980).

W badaniach elektronowo-mikroskopowych można wykazać w dojrzałych komórkach wyściółki materiał włókienkowy o cechach włókienek glejowych (Peters i wsp. 1976). Jednakże reakcje immunohistochemiczne wykazujące obecność GFAP, głównego — jeśli nie jedyne — składnika włókienek glejowych (Rueger i wsp. 1979), w komórkach dojrzałej wyściółki wypadają negatywnie (Ludwin i wsp. 1976). GFAP-dodatnie komórki wyściółki występują przejściowo w okresie płodowym (Roessmann i wsp. 1980) oraz w proliferującej odczynowo wyściółce (Szymaś, Hossmann 1984). Odczyn immunohistochemiczny na obecność GFAP wypada zmiennie w komórkach wyściółczaków, a dane z piśmiennictwa na ten temat są rozbieżne (Vraa-Jensen i wsp. 1976; Deck i wsp. 1978; van der Meulen i wsp. 1978; Duffy i wsp. 1979; Velasco i wsp. 1980). Liczba przebadanych przypadków jest jednakże niewielka, a stosowanie różnych klasyfikacji niewątpliwie utrudnia ujednoczenie wyników.

Celem przeprowadzonych badań była morfologiczna identyfikacja GFAP i określenie przydatności zastosowanej techniki immunohistochemicznej w diagnostyce histologicznej wyściółczaków.

* Praca wykonana w ramach Programu Rządowego PR-6.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 79 wyściółczakach. Poszczególne grupy przypadków wynosiły: *ependymoma (izomorphum)* — 33; *ependymoma anaplasticum* — 16; *ependymoma myxopapillare* — 12; *ependymoma papillare* — 4; *subependymoma* — 2; *choroid plexus papilloma* — 10. W klasyfikacji posłużono się nomenklaturą guzów ośrodkowego układu nerwowego przyjętą przez Światową Organizację Zdrowia (1979).

W mikroskopie świetlnym badano seryjne skrawki parafinowe guzów, barwione hematoksyliną i eozyną, kwaśną hematoksyliną fosforowo-wolframową (PTAH) w modyfikacji Clarka i Powersa (1976) oraz impregnowane metodą złotowo-sublimatową wg Cajala w jej modyfikacji dla skrawków parafinowych. Wykonano też reakcję immunohistochemiczną wg metody Sternbergera (1979) z użyciem kompleksu peroksydaza-antyperoksydaza. Surowicę anty-GFAP uzyskano wg metody opisanej uprzednio (Szymaś, Morkowski 1984). Dwadzieścia pięć wyściółczaków z przedstawionej powyżej grupy badano dodatkowo w mikroskopie elektronowym (*ependymoma izomorphum* — 14; *ependymoma anaplasticum* — 5; *ependymoma myxopapillare* — 2; *ependymoma papillare* — 1; *subependymoma* — 1; *choroid plexus papilloma* — 3 przypadki).

WYNIKI

Badania histopatologiczne i immunohistochemiczne

Ependymoma izomorphum (33 przypadki). Cechą wspólną tej grupy guzów, stwierdzoną w barwieniu H-E był cytologicznie niski stopień złośliwości. Odnosiło się to przede wszystkim do wyglądu jąder komórkowych, stosunku objętości jądra i cytoplazmy, braku mitoz, martwicy oraz rozrostów naczyń. W rozpoznaniu histologicznym kierowano się występowaniem rozet prawdziwych i rzekomych, tworzących charakterystyczne układy okołonaczyniowe oraz układów komórek przypominających rysunek skóry lamparta (Zülch 1956). Pozostałe cechy obrazu histologicznego guzów były zróżnicowane nie tylko w poszczególnych przypadkach, ale i różnych obszarach tych samych nowotworów, rutynowo badanych w kilku wycinkach. Część nowotworów charakteryzowała się nabłonkowopodobnym utkaniem o dużym zagęszczeniu komórkowym z niewielką ilością materiału włóknikowego oraz tworzeniem licznych kanałów, tworów tubularnych, a także struktur brodawkowych. Obecne były również pola o nieco mniejszym zagęszczeniu komórkowym, występujące zwłaszcza w otoczeniu naczyń i znamionujące się dość jednolitym utkaniem, nie wykazującym specjalnych układów. Prócz komórek wielobocznych występowały niekiedy liczne komórki wrzecionowate, co nadawało utkaniu histologicznemu wygląd włóknikowaty.

Barwienie PTAH uwidaczniało liczne włókienka w cytoplazmie i wypustkach komórek. Blearoblasty wybarwiały się wyraźnie w komórkach tworzących rozety oraz w komórkach utkania nabłonkowopodobnego. Brak ich było w polach o monotonnym utkaniu, w komórkach wielobocznych i wrzecionowatych.

W impregnacji wg Cajala w cytoplazmie komórek wyściółczaka występował słaby, homogenny, równomierny strąk; niekiedy w utkaniach okołonaczyniowych były zarysowane wypustki komórek. Silnie impregnowały się odczynowe astrocyty występujące w utkaniu nowotworowym i w jego otoczeniu.

Reakcja immunohistochemiczna na obecność GFAP była bardzo niejednorodna. Wypadała ona negatywnie lub słabo dodatnio (pojedyncze włókienka, wypustki) w komórkach utkania nabłonkowopodobnego nowotworu oraz w komórkach tworzących kanały i tubule o jednowarstwowym układzie (ryc. 1). Więcej komórek reagujących dodatnio stwierdzano w częściach nowotworu lub w nowotworach zbudowanych z komórek wielobocznych (ryc. 2). Wśród komórek tworzących układy okołonaczyniowe odczyn na GFAP był dodatni tylko w tych, które miały nóżkowatą wypustkę skierowaną do ściany naczynia (ryc. 3). Najsilniejsza reakcja ujawniała się w komórkach obszarów o umiarkowanym zagęszczeniu, z przewagą komórek wrzecionowatych (ryc. 4a, b). W reakcji z surowicą anti-GFAP wyraźnie uwidoczniły się także komórki astrocytopodobne, charakteryzujące się licznymi długimi wypustkami, przypominające także gemistocyty (ryc. 5).

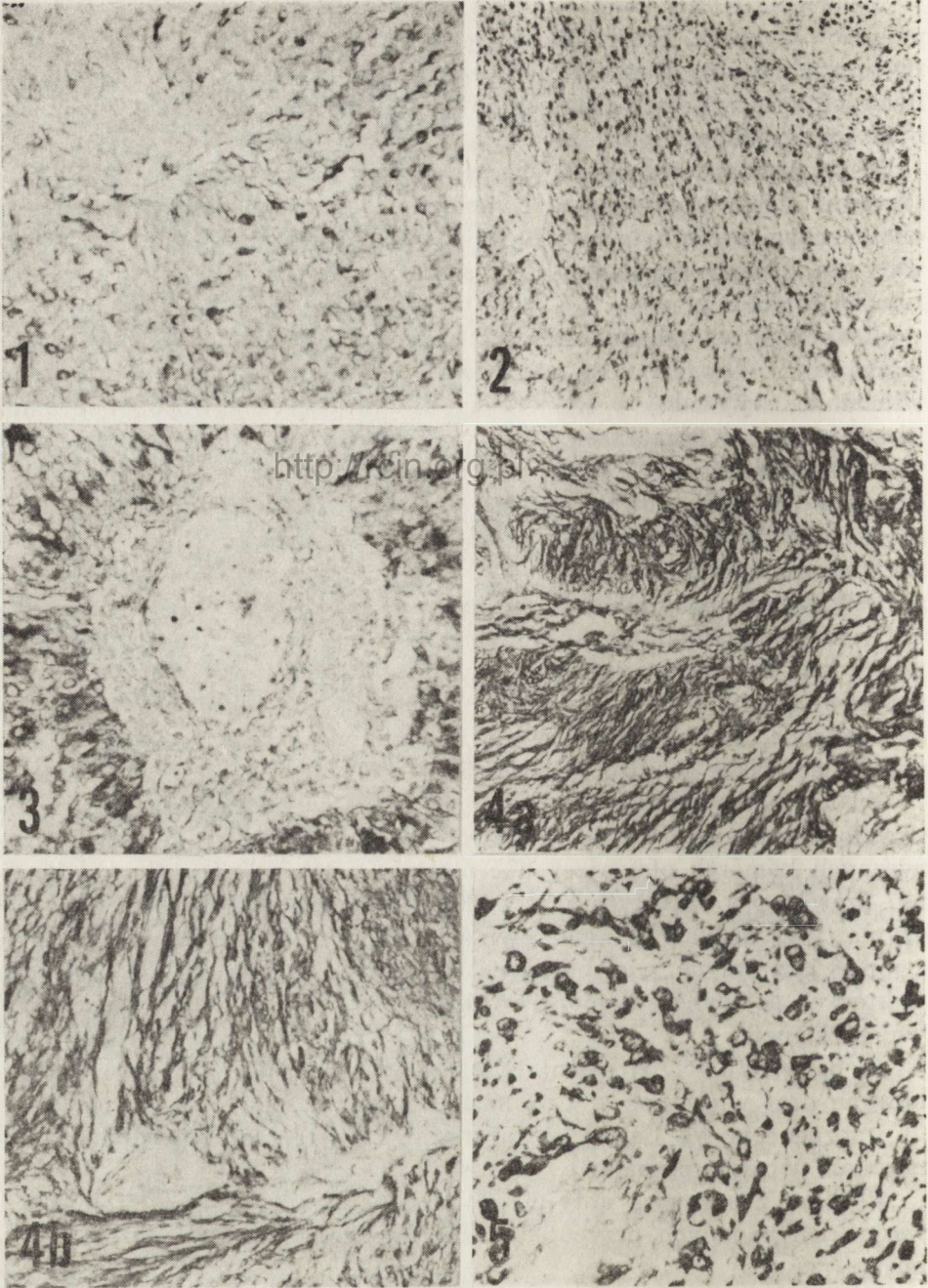
Ependymoma myxopapillare (12 przypadków). Barwienie H-E wykazywało, że nowotwory były zbudowane z kostkowych lub niskich cylindrycznych komórek otaczających centralnie położone naczynia krwionośne. Szeroki pas szklitych mas oddzielał komórki nowotworowe od naczynia. Występowały w nich również obszary o utkaniu litym złożonym z mniej kształtnych, wielobocznych komórek oraz pola ubogokomórkowe, w których pojedyncze komórki rozdzielały pokłady szklitej, bezpostaciowej substancji.

W barwieniu PTAH można było wykazać obecność wypustek komórkowych oraz włókienek w cytoplazmie komórek nowotworowych.

Impregnacja wg Cajala wykazywała skąpe ziarnistości rozsiane jednorodnie w całym preparacie.

Reakcja z surowicą anti-GFAP była silnie dodatnia w komórkach wszystkich badanych przypadków, uwidaczniając ich cytoplazmę i wypustki (ryc. 6).

Ependymoma papillare (4 przypadki). Charakterystyczną cechą obrazu mikroskopowego w barwieniu H-E było formowanie brodawkowatych struktur, obrzeżonych jedną warstwą komórek położonych na włóknistym, nie wykazującym proliferacji zrębie, zawierającym centralnie umiejscowione naczynie krwionośne.



Ryc. 1. Skąpa reakcja immunohistochemiczna w komórkach wyściółczaka o utkaniu nabłonkowopodobnym. PAP—GFAP. Pow. 100 ×

Fig. 1. Poor immunohistochemical reaction in the cells of the epithelioid ependymoma. PAP—GFAP. × 100

Barwienie PTAH wykazywało obecność wypustek zdążających w kierunku naczynia krwionośnego. W cytoplazmie i w wypustkach komórek nowotworowych wybarwiały się liczne włókienka. Dodatkowo barwiło się również włókniste podścielisko, wskazując na jego glejowy charakter.

Impregnacja według Cajala była ujemna we wszystkich strukturach badanej grupy wyściółczaków.

W reakcji immunohistochemicznej na GFAP komórki znajdujące się na powierzchni tworów brodawkowatych były ujemne (ryc. 7). Natomiast otoczenie nowotworu i jego włókniste podścielisko dawało odczyn dodatni.

Subependymoma (2 przypadki). Izomorficzne komórki o trudnych do prześledzenia granicach w barwieniu H-E zawierały regularnie zarysowane jądra z cienką błoną i niewielką zawartością chromatyny. Bogatowłókienkowe i skąpokomórkowe utkanie otaczało zagęszczone gniazda komórek nowotworu.

Barwienie PTAH wykazywało obecność włókienek zarówno w komórkach, jak i w zrębie. W impregnacji według Cajala stwierdzono pojedyncze lub skupione w niewielkich gniazdach małe gwiazdkowate komórki wyróżniające się obfitymi złogami w okołojądrowej cytoplazmie i w wypustkach dających się prześledzić na krótkich odcinkach.

W reakcji z surowicą anti-GFAP dodatnie były zarówno małe gwiazdkowate komórki przypominające astrocyty, jak i wydłużone komórki położone w charakterystycznym dla tego typu nowotworu skupiskach (ryc. 8).

Ependymoma anaplasticum (16 przypadków). Charakterystyczną cechą tej grupy nowotworów było obfitokomórkowe utkanie. Komórki były małe, anaplastyczne z hiperchromatycznymi zazwyczaj jądrami otoczonymi wąskim rąbkiem cytoplazmy. Komórki te tworzyły lite obszary utka-

Ryc. 2. Dodatnia reakcja immunohistochemiczna w izomorficznym wyściółczaku zbudowanym z wielobocznych komórek. PAP—GFAP. Pow. 60 ×

Fig. 2. Positive immunohistochemical reaction in isomorphous ependymoma composed of polygonal cells. PAP—GFAP. × 60

Ryc. 3. Obszar układów okołonaczyniowych w izomorficznym wyściółczaku. Silnie dodatni odczyn w wydłużonych, jednowypustkowych komórkach. PAP—GFAP. Pow. 200 ×

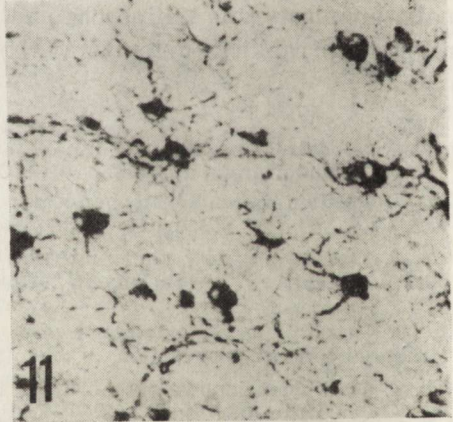
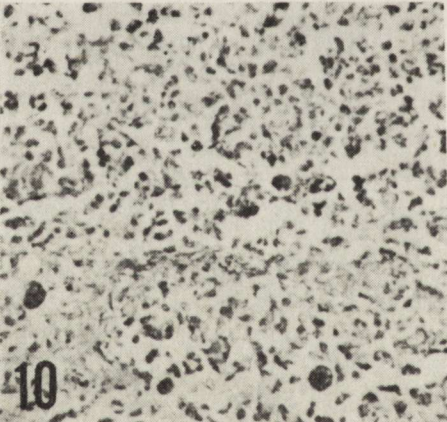
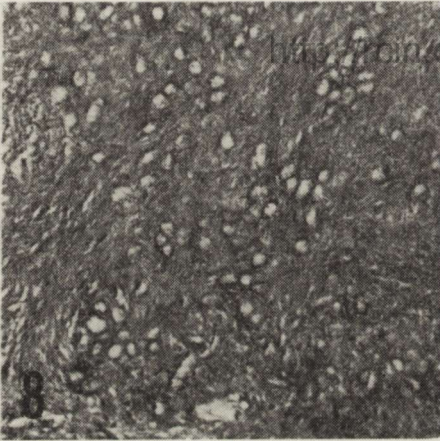
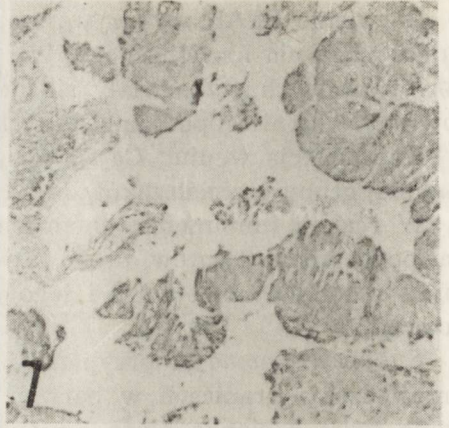
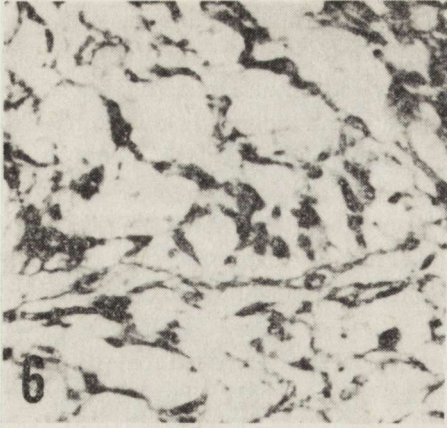
Fig. 3. Isomorphous ependymoma with perivascular cell arrangement. Strong immunohistochemical reaction in elongated unipolar cells. PAP—GFAP. × 200

Ryc. 4. Pola wrzecionowatokomórkowe izomorficznego wyściółczaka o silnie dodatnim odczynie. PAP—GFAP. a) Pow. 60 ×, b) Pow. 200 ×

Fig. 4. Fusiform-cell area in isomorphous ependymoma revealing strong immunohistochemical reaction. PAP—GFAP. a) × 60, b) × 200

Ryc. 5. Silnie GFAP-dodatnie komórki astrocytopodobne w utkaniu wyściółczaka. PAP—GFAP. Pow. 200 ×

Fig. 5. Astrocyte-like cells with strong immunohistochemical reaction in ependymoma. PAP—GFAP. × 200



Ryc. 6. *Ependymoma myxopapillare*. Silnie dodatni odczyn immunohistochemiczny w komórkach nowotworu. PAP—GFAP. Pow. 200 ×

Fig. 6. *Ependymoma myxopapillare*. Strong immunohistochemical reaction in tumor cells. PAP—GFAP. × 200

Ryc. 7. *Ependymoma papillare*. Ujemny odczyn z surowicą anti-GFAP w komórkach nowotworu. PAP—GFAP. Pow. 100 ×

Fig. 7. *Ependymoma papillare*. Negative immunohistochemical reaction in tumor cells. PAP—GFAP. × 100

nia, niekiedy widoczne były układy o cechach rozet rzekomych. W niektórych polach zaznaczał się polimorfizm komórkowy z obecnością komórek olbrzymich. W barwieniu PTAH nie stwierdzano zarówno wypustek komórkowych, jak i materiału włókienkowego w cytoplazmie.

W impregnacji wg Cajala w nacieku nowotworowym uwidoczniały się pojedyncze odczynowe astrocyty. Komórki nowotworowe nie impregnowały się.

Reakcja z surowicą anti-GFAP wypadła dodatnio w skąpej, bezwypustkowej cytoplazmie części małych, anaplastycznych komórek (ryc. 9) oraz w obszarach o zaznaczonym polimorfizmie (ryc. 10). Odczynowe GFAP-dodatnie astrocyty łatwo było odróżnić na podstawie ich charakterystycznego kształtu i wielkości (ryc. 11).

Choroid plexus papilloma (10 przypadków). W barwieniu H-E utkanie guzów charakteryzowało się obecnością brodawkowatych struktur, obrzeżonych jedną warstwą wysokich, cylindrycznych komórek. Były one oddzielone od zrębu naczyniowego pokładem tkanki łącznej. W reakcji immunohistochemicznej z surowicą anti-GFAP wszystkie struktury utkania były ujemne.

Badania mikroskopowo-elektronowe

Ependymoma izomorphum, papillare, myxopapillare (17 przypadków). Ultrastrukturalne cechy wymienionych typów wyściółczaka były podobne. Komórki guza wykazywały cechy biegunowego zróżnicowania, z tendencją do tworzenia rozet prawdziwych i okołonaczyniowych rozet rzekomych oraz liniowych układów pseudogruzołowych. W cytoplazmie komórek obecne były liczne filamenty o charakterze włókienek pośrednich. Również w obszarach guzów o litym układzie komórek z ultrastrukturalnymi cechami wyściółki oraz w obrębie układów pasmowatych z wrzecionowatymi komórkami były obecne liczne filamenty glejowe.

Ependymoma anaplasticum (5 przypadków). Komórki guza były nisko

Ryc. 8. *Subependymoma*. Wybitnie silny dodatni odczyn immunohistochemiczny w składowych utkania guza. PAP—GFAP. Pow. 200 ×

Fig. 8. *Subependymoma*. Remarkably strong immunohistochemical reaction in tumor components. PAP—GFAP. × 200

Ryc. 9. *Ependymoma anaplasticum*. Skąpa dodatnia reakcja z surowicą anti-GFAP. PAP—GFAP. Pow. 100 ×

Fig. 9. *Anaplastic ependymoma*. Weak positive reaction with anti-GFAP serum. PAP—GFAP. × 100

Ryc. 10. *Ependymoma anaplasticum*. Wyraźnie zaznaczony dodatni odczyn w komórkach olbrzymich. PAP—GFAP. Pow. 200 ×

Fig. 10. *Anaplastic ependymoma*. Strong positive reaction with anti-GFAP serum in giant tumor cells. PAP—GFAP. × 200

Ryc. 11. Odczynowe, GFAP-dodatnie astrocyty w otoczeniu anaplastycznego wyściółczaka. PAP—GFAP. Pow. 200 ×

Fig. 11. Reactive, GFAP-positive astrocytes in the surroundings of an anaplastic ependymoma. PAP—GFAP. × 200

zróznicowane i wykazywały tendencję do gromadzenia się wokół naczyń. Zanikała biegunowość komórek. Filamenty glejowe występowały w mniejszej ilości niż w poprzedniej grupie.

OMÓWIENIE

Kwaśne białko włókienek glejowych, stanowiące ich główny — jeśli nie jedyny — składnik białkowy, jest swoistym znacznikiem morfologicznym. O ile przydatność metody immunohistochemicznego wykazywania włókienek glejowych w dojrzałych reaktywnych i nowotworowych astrocytach jest bezsporna (Szymaś, Hossmann 1984; Szymaś 1985), o tyle interpretacja wyników reakcji w przypadku komórek wyściółki jest trudna, a dotychczasowe wyniki niejednoznaczne.

Dojrzałe komórki wyściółki nie zawierają produktów reakcji (Ludwin i wsp. 1976; Eng, Bigbee 1978), mimo że badania elektronowo-mikroskopowe wykazują obfity materiał włókienny o charakterze gliofilamentów w ich cytoplazmie (Peters i wsp. 1976). W przypadku wyściółczaków uzyskano rozbieżne wyniki. Van der Meulen i wsp. (1978) w 4 przypadkach wyściółczaków nie stwierdzili dodatniego odczynu z surowicą anti-GFAP. Dodatkowo mają reagować jedynie komórki podwyściółczaków oraz wyściółczaków zawierających fragmenty o cechach podwyściółczaka. Duffy i wsp. (1979) (10 przypadków), Velasco i wsp. (1980) (2 przypadki) stwierdzają, że kwaśne białko włókienek glejowych występuje w cytoplazmie i wypustkach nowotworowych komórek wyściółki. Vraa-Jensen i wsp. (1976) potwierdzili to spostrzeżenie w hodowli tkankowej wysoko zróżnicowanego wyściółczaka okolicy IV komory.

Wyniki uzyskane we własnych badaniach potwierdzają rozbieżne dane z piśmiennictwa. W grupie wyściółczaków o I/II^o biologicznej złośliwości nie uzyskano dodatniego odczynu z surowicą anti-GFAP w nabłonkowopodobnym typie utkania, natomiast duże ilości GFAP zawierały postaci wrzecionowato-komórkowe. Ze względu na różnorodny typ utkania w poszczególnych guzach można przypuszczać, że były one wszystkie GFAP-dodatnie. Nie wyjaśniony pozostaje brak korelacji między obfitym występowaniem włókienek pośrednich stwierdzonych we wszystkich komórkach guzów w badaniu elektronowo-mikroskopowym a zróżnicowanym odczynem GFAP w tych samych przypadkach. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na istnienie komórek o różnym stopniu zróżnicowania lub o różnym typie. Za pierwszą możliwością przemawiałby fakt, iż komórki wyściółki w okresie rozwoju płodowego są przejściowo GFAP-dodatnie (Roessmann i wsp. 1980), aby później, jako formy dojrzałe, stać się znowu GFAP-ujemne (Ludwin i wsp. 1976). Zjawisko to występuje mimo obecności w ich cytoplazmie włókiennego materiału o charakterze włókienek pośrednich (Peters i wsp. 1976). Na rzecz drugiej ewentualności przemawia stwierdzenie dwójakiego charakteru ko-

mórek wyściółki, występujących jako komórki nabłonkowopodobne i tanycyty. Te ostatnie, mniej znane, opisane zostały przez Horstmanna w 1954 r. Dotychczas ich funkcja nie jest w pełni poznana. Z badań Roesmanna i wsp. (1980) wynika, że nie są one, jak przyjmowano pierwotnie, postacią rozwojową komórek nabłonkowopodobnych, ale rozwijającym się niezależnie typem. Tanycyty są również w okresie płodowym przejściowo GFAP-dodatnie.

Friede i Pollak (1978) podali elektronowo-mikroskopowe kryteria dla podgrupy wyściółczaków, które nazwano *tanycytoma*. Główną składową ich utkania mają być komórki przypominające tanycyty. Własne badania immunohistochemiczne potwierdzają występowanie w grupie izomorficznych wyściółczaków utkania o typie nabłonkowopodobnym i o cechach *tanycytoma*, z całym szeregiem form pośrednich. Komórki *tanycytoma* były silnie GFAP-dodatnie. W naszych obserwacjach opartych zarówno na badaniach immunohistochemicznych, jak i elektronowo-mikroskopowych zwrócono też uwagę na obecność komórek określanych jako astrocytopodobne. Spostrzeżenie to mogłoby sugerować domieszkę gwiazdziaka w utkaniu wyściółczaków. Komponent ten występuje prawdopodobnie częściej niż wskazywałyby na to kazuistyczne doniesienia w piśmiennictwie (Kleihues i wsp. 1965). Odczynowo proliferujące astrocyty dawały się łatwo różnicować na podstawie kryteriów morfologicznych i zastosowanych technik specjalnych. Na podkreślenie zasługuje przydatność diagnostyczna reakcji immunohistochemicznej z surowicą anti-GFAP w przypadku wyściółczaka śluzowobrodawkowatego oraz anaplastycznego.

Barwienie PTAH, stosowane w badaniach wyściółczaków, dla wykazywania włókienek glejowych i blefaroblastów okazało się wysoce nieswoiste w konfrontacji z odczynem immunohistochemicznym znamionującym się wybiórczą swoistością w stosunku do włókienek glejowych. Niektórzy autorzy (Roessmann i wsp. 1980; Eng De Armond 1983) przypuszczają, że w komórkach wyściółki o ujemnym odczynie z surowicą anti-GFAP występuje inny typ włókienek pośrednich, których nie można zróżnicować w rutynowym badaniu elektronowo-mikroskopowym i w barwieniu metodą PTAH. Wiadomo, że metodą PTAH wybarwiają się również dodatnio włókienka w tkance mięśniowej, włóknik, jądra komórkowe oraz elementy ściany naczyniowej. Impregnacja wg Cajala wyznaczała wyraźnie odczynowe astrocyty. Ujemny wynik w przypadku komórek guza wskazuje na ich pochodzenie z wyściółki.

Pomimo że na podstawie rutynowego barwienia hematoksyliną i eozyną wszystkie podgrupy wyściółczaków można było rozpoznać, to odczyn immunohistochemiczny z surowicą anti-GFAP pozwalał na wykazanie przypadków różniących się między sobą zawartością GFAP w komórkach. Stwarzało to możliwość wyróżnienia w grupie *ependymoma isomorphum* postaci nabłonkowopodobnej, prawie całkowicie GFAP-ujem-

nej, oraz *tancytoma* o silnie GFAP-dodatnich komórkach. Istniał również szereg przypadków o pośrednich właściwościach ze zróżnicowaną zawartością GFAP w komórkach nowotworowych. Technika immunohistochemiczna okazała się też przydatna w diagnostyce różnicowej anaplastycznych postaci wyściółczaków i innych guzów, zwłaszcza podnamiotowych. Na podstawie przeprowadzonych badań jakościowych metoda immunohistochemiczna z surowicą anti-GFAP wydaje się najbardziej przydatna w określeniu stopnia biologicznej złośliwości nowotworu i prognozy. Jednakże będzie to wymagało wprowadzenia metod ilościowych i skorelowania wyników z przebiegiem klinicznym.

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЗНАЧЕНИЯ КИСЛОГО БЕЛКА ГЛИОЗНЫХ ФИБРИЛЛ (GFAP) В ЭПЕНДИМОМАХ

<http://rcin.org.pl> Резюме

Исследовано 79 случаев эпендимом при помощи иммуногистохимической реакции с сывороткой против кислого белка глиозных фибрилл, позволяющей селективно обнаружить глиозные фибриллы. Результаты были сопоставлены с другими применяемыми традиционно методами для диагностирования эпендимом в световом микроскопе.

Доказано, что в отдельных подгруппах эпендимом, а также в отдельных опухолях той же самой подгруппы содержание глиозных фибрилл неодинаково. Кроме того применяемая иммуногистохимическая техника позволяет отличить эпителиальное и танциганное строение, а также обнаружить астроцитарное строение в эпендимоммах. Эта техника может быть пригодна в дифференциальной диагностике анапластических субтенторных опухолей.

Кажется, что полученные результаты, из-за разного содержания GFAP в опухолях этой самой подгруппы, наиболее пригодны при определении степени злокачественности новообразования потому что они указывают на разную степень дифференциации и на разный тип клеток новообразования.

ESTIMATION OF DIAGNOSTIC VALUE OF GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP) IN EPENDYOMAS

Summary

Seventy nine ependymomas of various types were examined by means of immunohistochemical technique with anti-GFAP serum, permitting specific visualization of glial fibrils.

The immunohistochemical results were compared with those obtained by routine histological techniques for diagnosis of ependymomas in the light microscopy. It was demonstrated that content of glial fibrils in cellular cytoplasm varied remarkably not only in different types of ependymomas but also in particular tumors belonging to the same group. Immunohistochemical technique facilitated distinguishing epithelioid type of ependymoma from tancytoma as well as visualizing astrocytic components in ependymal tumors. Reaction was also useful in differential diagnosis of subtentorial tumors.

Due to variable content of GFAP in tumors of the same type, the result obtained suggest that immunohistochemical reaction may be most useful in estimation of biological malignancy degree, indicating varying differentiation of the neoplastic cells and/or their different cell types.

PIŚMIENNICTWO

1. Bignami A., Dahl D.: Differentiation of astrocytes in the cerebellar cortex and the pyramidal tract of the newborn rat. An immunofluorescent study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.*, 1973, 49, 394—402.
2. Bignami A., Dahl D.: Astroglial protein in the developing spinal cord of the chick embryo. *Dev. Biol.*, 1975, 44, 204—209.
3. Bignami A., Dahl D.: The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies to astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1976, 2, 99—111.
4. Clark G., Powers J. M.: A consistent phosphotungstic acid hematoxylin stain for glial fiber. *Stain Techn.*, 1976, 51, 227—229.
5. Deck J. H. N., Eng L. F., Bigbee J., Woodcock S. M.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1978, 42, 183—190.
6. Duffy P. E., Graf L., Rapport M. M.: Glial fibrillary acidic protein in gliomas using the immunoperoxidase method. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1978, 37, 610.
7. Duffy P. E., Graf L., Huang Y. F., Rapport M. M.: Glial fibrillary acidic protein in ependymomas and other brain tumors. *J. Neurol. Sci.*, 1979, 40, 133—146.
8. Eng L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351—354.
9. Eng L. F., Bigbee J. W.: Immunocytochemistry of nervous system specific antigens. [W:] B. W. Agranoff i M. H. Aprison (Wyd.) *Adv. Neurochem.*, 1978, 3, 43—98.
10. Eng L. F., DeArmond S. J.: Immunocytochemistry of the glial fibrillary acidic (GFA) protein. [W:] H. M. Zimmerman: *Progress in Neuropathology*. Raven Press, New York 1983, 5, 19—39.
11. Friede R. L., Pollak A.: The cytogenetic basis for classifying ependymomas. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1978, 37, 103—118.
12. Horstmann E.: Die Faser-Glia des Selachiergehirns. *Z. Zellforsch.*, 1954, 39, 588—617.
13. Kleihues P.: Gibt es in Gehirn echte Kompositionstumoren? *Z. Krebsforsch.*, 1965, 67, 262—271.
14. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain: An immunohistochemical study using horseradish peroxidase-labelled antibodies. *J. comp. Neurol.*, 1976, 165, 197—208.
15. Peters A., Palay S. L., Webster H. F.: *The fine structure of the nervous system*. Saunders Co., Philadelphia 1976.
16. Roessmann U., Velasco M. E., Sindely S. D., Gambetti P.: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development in immunocytochemical study. *Brain Res.*, 1980, 200, 13—21.
17. Rueger D. C., Huston J. S., Dahl D., Bignami A.: Formation of 100 A filaments from purified glial fibrillary acidic protein *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 1979, 135, 53—68.
18. Sternberger L. A.: *Immunocytochemistry*. John Wiley & Sons, New York 1979.
19. Sternberger L. A., Hardy P. H., Cuculis J. J., Mayer H. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 315—333.
20. Szymaś J.: Diagnostic value of demonstrating glial fibrillary acidic protein in human astrocytomas. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 23—35.

21. Szymaś J., Hossmann K.-A.: Effect of dexamethasone on glial fibrillary acidic protein in peritumorous edema of cats: A morphometric study. *Acta Neuropathol.* (Berl.), 1984, 62, 309—315.
22. Szymaś J., Morkowski S.: Surowica przeciwko kwaśnemu białku glejowemu. Uzyskanie i kontrola swoistości. *Immunol. Pol.*, 1984, 9, 135—144.
23. Van der Meulen J. D. M., Houthoff H. J., Ebels E. J.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1978, 4, 177—190.
24. Velasco M. E., Dahl D., Roessmann U., Gambetti P.: Immunohistochemical localisation of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer*, 1980, 45, 474—494.
25. Vraa-Jensen J., Herman M. M., Rubinstein L. J., Bignami A.: *In vitro* characteristic of a fourth ventricle ependymoma maintained in organ culture system: light and electron microscopy observation. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1976, 2, 349—364.
26. Zülch K. J.: *Biologie und Pathologie der Hirngeschwülste.* [w:] *Handbuch der Neurochirurgie.* Red.: W. Olivecrona, W. Tonnis. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.
27. Zülch K. J.: *Histological Typing of Tumours of the Central Nervous System.* International Histological Classification of Tumours. No 21. WHO. Geneva 1979.

Adres autora: Zakład Patomorfologii Klinicznej AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

EWA MATYJA, ELŻBIETA KIDA, TERESA PIÓREK

PRZYPADEK RAKOWATOŚCI OPON MIĘKKICH MÓZGU

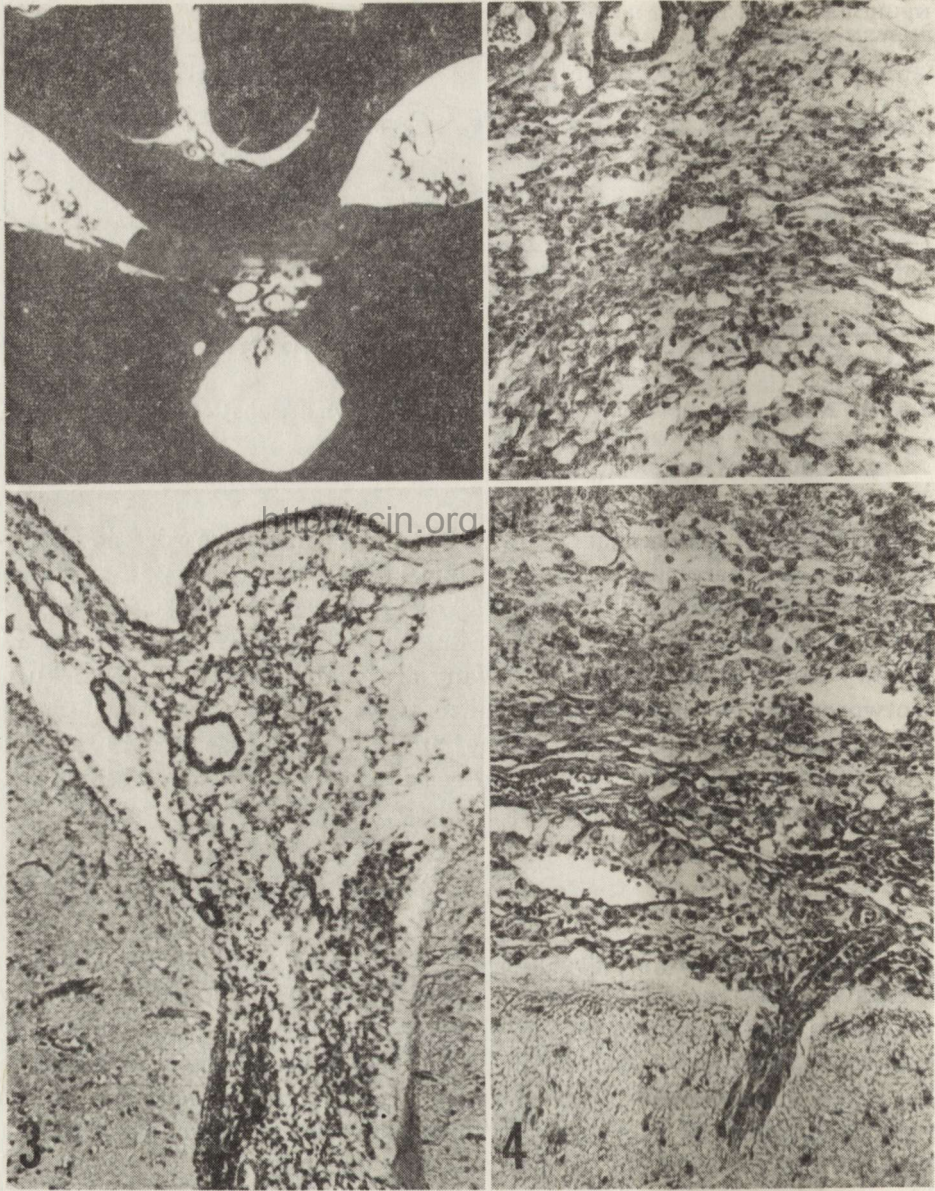
Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa
Klinika Neurologiczna II Wydziału Lekarskiego AM, Warszawa

<http://rcin.org.pl>
Najczęstszą przyczyną rakowatości opon mózgowo-rdzeniowych są przerzuty z gruczolakoraka sutka, płuc i żołądka (Fisher-Williams i wsp. 1955; Herman, Courville 1965; Gajkowski i wsp. 1970; Bramlet i wsp. 1976). Przedstawiony przypadek zasługuje na uwagę ze względu na nietypowy obraz kliniczny, spowodowany szczególną lokalizacją nacieku nowotworowego w ośrodkowym układzie nerwowym. Na podstawie dostępnej dokumentacji histopatologicznej można przypuszczać, że pierwotnym nowotworem narządowym był rak śluzowokomórkowy pęcherza moczowego, co stanowi niewątpliwą rzadkość.

OPIS PRZYPADKU

Chora W. W., lat 66, została przyjęta do Oddziału Neurologicznego Szpitala Czerniakowskiego w maju 1980 r. z powodu narastających od 2 tygodni bardzo silnych bólów głowy, zlokalizowanych w okolicy potylicznej, z towarzyszącymi nudnościami i wymiotami. Choroba rozpoczęła się przed 6 miesiącami opadnięciem prawej powieki górnej oraz podwójnym widzeniem. W tym samym czasie pojawił się krwimocz, z powodu którego chora przebywała w Oddziale Urologicznym Szpitala Wojewódzkiego, gdzie na podstawie cystoskopii i badania histopatologicznego rozpoznano raka śluzowokomórkowego pęcherza moczowego. Bóle głowy, które pojawiły się w czasie hospitalizacji w Oddziale Urologicznym były przyczyną skierowania chorej do Oddziału Neurologicznego.

Przy przyjęciu do Oddziału badaniem internistycznym nie stwierdzono istotnych odchyień od normy, węzły chłonne i wątroba niepowiększone, RR 125/80 mm Hg, czynność serca 88/min. W stanie neurologicznym stwierdzono zatarcie granic tarczy prawego nerwu wzrokowego i opadnięcie prawej powieki górnej z ograniczeniem ruchomości gałki ocznej



Ryc. 1. Naciek nowotworowy zlokalizowany w stropie komory III, poszerzenie układu komorowego. HE. Pow. lupowe

Fig. 1. Neoplastic infiltration at the roof of the III ventricle. Enlargement of the ventricular system. HE. Magn. glass

Ryc. 2. Bogatokomórkowe utkanie nacieku nowotworowego w stropie komory III. HE. Pow. 200 ×

Fig. 2. Cellular neoplastic infiltration from the roof of the III ventricle. HE. × 200

Ryc. 3. Naciek nowotworowy w oponach miękkich, szczególnie obfity w głębi rowka mózgowego. HE. Pow. 60 ×

Fig. 3. Neoplastic infiltration of leptomeninges, particularly rich in the depth of the cerebral sulcus. HE. × 60

ku gorze. Pozostałe nerwy czaszkowe bez zmian. W zakresie kończyn stwierdzono asymetrię odruchów (prawe żywsze od lewych) oraz dyskretną dysmetrię w kończynach górnych i dolnych. Objawy oponowe były nieobecne.

W badaniach dodatkowych poza krwinkomoczem i ropomoczem nie stwierdzono odchyień od normy. OB 15. Rtg czaszki, klatki piersiowej i kręgosłupa były bez zmian. Zapis EEG wykazywał dyskretne zmiany w okolicy czołowo-przedskroniowej prawej w postaci rozszianych fal theta o częstotliwości 6—7 Hz na tle prawidłowej czynności podstawowej. Badaniem ginekologicznym stwierdzono w przednim sklepieniu części pochwowowej wyczuwalne zgrubienie wielkości śliwki, macica i przydatki bez zmian.

Podczas pobytu w oddziale kilkakrotnie w ciągu doby występował nagle bardzo silny ból głowy z towarzyszącymi nudnościami, wymiotami, bradykardią, bez sztywności karku. Dolegliwości te trwały od kilku do kilkudziesięciu minut i ustępowały samoistnie lub po podaniu środków przeciwozrękowych. Pomiędzy napadami chora nie miała żadnych dolegliwości. W ciągu 2 tygodni stan chorej stopniowo pogarszał się, dołączyły się zaburzenia świadomości, na dzień oczu stwierdzono obustronne obecność tarczy zastoinowej. Obserwowano jeden napad uogólnionych drgawek. Z podejrzeniem ogniska przerzutowego w pniu mózgu, po konsultacji neurochirurgicznej, przesłano chorą do Kliniki Neurochirurgicznej AM. W wykonanym badaniu metodą tomografii komputerowej nie wykazano obecności przerzutów do mózgu, natomiast w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono obecność komórek nowotworowych.

Po 3 dniach pobytu w Klinice Neurochirurgicznej, z rozpoznaniem rakowatości opon mózgowo-rdzeniowych chora została ponownie przeniesiona do Oddziału Neurologicznego. Stan chorej był bardzo ciężki, utrzymywały się zaburzenia świadomości, pojawiła się duszność, przyspieszona czynność serca, niepokój oraz zaburzenia oddechowe z długimi okresami bezdechów. Stwierdzono obecność objawów oponowych. Wystąpiły objawy niewydolności nerek w postaci podwyższonego poziomu kreatyniny ($8,3 \text{ mg}^0/\text{o}$), mocznika ($138 \text{ mg}^0/\text{o}$) oraz potasu (8 mEq/l). Chora zmarła po 7-miesięcznym okresie choroby licząc od momentu pojawienia się pierwszych objawów neurologicznych. Rozpoznanie kliniczne: *Carcinomatosis meningium*.

Na sekcji ogólnej z istotnych zmian stwierdzono: brodawczakowaty guz pęcherza moczowego, obustronne wodonercze oraz obustronny guz jajników (dr Z. Kabulski). W obrazie mikroskopowym guz pęcherza wykazy-

Ryc. 4. Naciek nowotworowy w oponie miękkiej. Przewaga komórek o obfitej piankowatej cytoplazmie zawierającej substancje śluzowe. Mucykarmin. Pow. 200 ×
Fig. 4. Neoplastic infiltration in leptomeninges. Prevailing cells with abundant foamy cytoplasm containing mucous substances. Mucicarmin. × 200

wał cechy gruczolakoraka, częściowo brodawczakowatego. Przerzuty gruczolakoraka obecne były w utkaniu obu jajników (por. M. Kobuszewska-Farynowa).

Ogłędziny zewnętrzne mózgu wykazały nieznaczne zmleczenie opon miękkich, wyraźniejsze na przebiegu rowków naczyniowych oraz cechy obrzęku mózgu. Na przekrojach czołowych przez półkule mózgu widoczne było znaczne, symetryczne poszerzenie układu komorowego. W stropie komory III stwierdzono pasmo szarawej tkanki o obniżonej spoistości, zespolone z odnogami sklepienia.

Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z okolicy III komory, kory czołowej z oponami oraz mostu. Skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną, sudanem czarnym oraz mucykarminem.

W badaniu mikroskopowym stwierdzono obecność nieprawidłowej masy tkankowej w stropie komory III wciskającej się między odnogi sklepienia i górną powierzchnię wzgórza, odgraniczonej wyraźnie od otaczających struktur mózgu (ryc. 1). Naciek komórkowy łączył się obustronnie ze spletem naczyniówkowym, wnikając miejscami w jego zrąb, z pozostawieniem fragmentów spletu o prawidłowej budowie. Komórki nacieku były wtopione w bogaty zrąb łącznotkankowy z obfitą ilością naczyń o pogrubiałej przydanie. Występowały w nim dwa typy utkania: bogatokomórkowe z wyraźnym grupowaniem się komórek wokół naczyń krwionośnych oraz bardziej luźne w miejscach oddalonych od naczyń. Zwracał uwagę znaczny polimorfizm komórkowy. Przeważały komórki o owalnych lub wydłużonych jądrach ze znaczną zawartością chromatyny i zartartych granicach cytoplazmy (ryc. 2). Dość licznie występowały komórki o owalnych lub okrągłych jądrach położonych na obwodzie piankowatej, blad różowej cytoplazmy. Sporadycznie obserwowano figury podziałów komórkowych. Miejscami były widoczne nacieki z komórek jednojądrzastych i nielicznych komórek plazmatycznych. W otaczających strukturach mózgu obecne były cechy obrzęku.

W oponach miękkich oraz w przestrzeni podpajęczynówkowej występowały również nacieki nowotworowe, szczególnie obfite w głębi rowków (ryc. 3), nie przechodziły one na powierzchniowe warstwy kory. Charakter komórkowy nacieku był podobny do opisanego powyżej, z tym jednak, że w utkaniu przeważały komórki o obfitej piankowej cytoplazmie, zawierające substancje śluzowe (ryc. 4).

OMÓWIENIE

W opisanym przypadku występują obfite, bogatokomórkowe nacieki nowotworowe w oponach miękkich mózgu oraz splecie naczyniówkowym komory III. Jak wspomniano we wstępie, nie można z całą pewnością wypowiedzieć się co do lokalizacji ogniska pierwotnego nowotworu, chociaż przeprowadzone badania i obraz kliniczny wydają się przemawiać

za jego umiejscowieniem w pęcherzu moczowym. Nie można jednak wykluczyć, że rak rozwijał się pierwotnie w innym narządzie i dał rozległe przerzuty do pęcherza moczowego i jajników.

W obrazie klinicznym na pierwszy plan wysuwały się objawy wskazujące na napadowe występowanie wzrostu ciśnienia śródczaszkowego, sugerujące okresowe pojawianie się przeszkody w odpływie płynu mózgowo-rdzeniowego. Objawy te, łącznie z cechami uszkodzenia nerwu okoruchowego, mogły sugerować rozpoznanie pojedynczego ogniska przerzutowego zlokalizowanego w pniu mózgu. Tak zresztą brzmiało wstępne rozpoznanie kliniczne, które nie zostało potwierdzone badaniem tomograficznym mózgu. Stwierdzony w badaniu neuropatologicznym naciek nowotworowy w stropie komory III, łączący się ze splotem naczyńkowym i zamykający wejście do wodociągu Sylwiusza, wyjaśnił tę symptomatologię. Ta lokalizacja nacieku może również przemawiać za rozsiewem komórek rakowych za pośrednictwem splotu naczyńkowego, co uważane jest przez niektórych autorów za jedną z możliwych dróg zajęcia ośrodkowego układu nerwowego w przypadkach nowotworów narządowych (Dixon i wsp. 1946; Fisher-Williams i wsp. 1955; Stam 1960; Mc Millian 1962). W rakowatości opon mózgowo-rdzeniowych objawy oponowe mogą być nieobecne lub słabo zaznaczone (Little i wsp. 1974; Bramlet i wsp. 1976), pojawiając się zazwyczaj w przypadkach już zaawansowanych. Bóle głowy, zaburzenia świadomości, nudności, wymioty, objawy uszkodzenia nerwów czaszkowych, a zwłaszcza uszkodzenia nerwu III i VII oraz rzadziej objawy ogniskowe należą do typowego obrazu klinicznego (Grain, Karr 1955; Dinsdale, Taghavy 1964; Herman, Courville 1965; Bramlet i wsp. 1976). Obecność komórek nowotworowych w płynie mózgowo-rdzeniowym ułatwia postawienie prawidłowego rozpoznania (Spriggs 1954; Marks, Marrack 1960; Mc Millian 1962; Olson i wsp. 1974).

СЛУЧАЙ КАНЦЕРОМАТОЗА МЯГКИХ ОБОЛОЧЕК ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

Представлен случай 66-летней пациентки с диагностированным клинически и подтвержденным невропатологическим исследованием канцероматозом мягких оболочек головного мозга в течение адено—карциномы мочевого пузыря. Авторы обращают внимание на нетипичную симптоматику с преобладающими в клинической картине приступообразно выступающими симптомами внутричерепной гипертонии удерживающимися несколько минут (в пределах первого и второго десятка). Локализация опухолевых инфильтратов охватывающих не только мягкие оболочки головного мозга, а также свод и сосудистое сплетение третьего желудочка мозга и закрывающих отверстие водопровода мозга объясняет наблюдаемые клинические симптомы. Наличие обильного опухолевого инфильтрата в сосудистом сплетении может кроме того говорить в пользу возможности опухолевого

рассева в центральной нервной системе посредством сосудистых сплетений. Следует подчеркнуть редкость, с которой выступают метастатические изменения в центральной нервной системе в случаях первичной локализации рака в мочевом пузыре.

CASE OF CARCINOMATOSIS OF LEPTOMENINGES

Summary

The case is described of a 66-year-old female patient with clinically diagnosed and neuropathologically confirmed carcinomatosis of the leptomeninges in the course of adenocarcinoma of the urinary bladder. The authors call attention to the nontypical clinical symptomatology, with dominant attacks of intracranial hypertension lasting from several to a dozen or so minutes. Localization of the tumor infiltrations involving not only the leptomeninges, but also the roof and the choroid plexus of the third ventricle and closing the outlet of the aqueduct explains the observed clinical symptoms. The presence of abundant neoplastic infiltration in the choroid plexus may indicate, moreover, the possibility of tumour dissemination in the central nervous system by the intermediary of choroid plexuses. Noteworthy is the rare occurrence of metastases in the CNS in cases of primary cancer localization in the urinary bladder.

PIŚMIENNICTWO

1. Bramlet D., Giliberti J., Bender J.: Meningeal carcinomatosis (case report and review of the literature). *Neurology*, 1976, 3, 287—291.
2. Dixon Joly B. Y. G., Sutcliffe A., Kerr M., Sharpe E.: Meningitis carcinomatosa: A report on two cases. *Brain*, 1946, 69, 223.
3. Dinsdale H. B., Taghavy A.: Carcinomatosis of the meninges. *Can. Med. Assoc. J.*, 1964, 90, 505—512.
4. Fisher-Williams M., Bosanquet F. D., Daniel P. M.: Carcinomatosis of the meninges: a report of three cases. *Brain*, 1955, 78, 42—58.
5. Gajkowski K., Sieński W., Ptasiński J.: Dwa przypadki rakowatości opon mózgowo-rdzeniowych. *Neuropat. Pol.*, 1970, 2, 241—246.
6. Grain G. O., Karr J. P.: Diffuse leptomeningeal carcinomatosis: clinical and pathological characteristics. *Neurology*, 1955, 5, 706—722.
7. Herman D. L., Courville C. B.: Pathogenesis of meningeal carcinomatosis. Report of case secondary to carcinoma of cecum via perineural extension: with a review of 146 cases. *Bull. Los Angeles Neurol. Soc.*, 1965, 30, 107—117.
8. Little J. R., Dale A. J. D., Okazaki H.: Meningeal carcinomatosis. *Arch. Neurol.*, 1974, 30, 138—144.
9. Marks V., Marrack D.: Tumor cells in the cerebro-spinal fluid. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1960, 23, 194—201.
10. Mc Millian J. A.: Meningitis due to carcinomatosis: case with free carcinoma cells in cerebro-spinal fluid. *Br. Med. J.*, 1962, 1, 1452—1453.
11. Olson M. E., Chernik N. L., Posner J. B.: Infiltration of the leptomeninges by systemic cancer. *Arch. Neurol.*, 1974, 30, 122—138.
12. Spriggs A. J.: Malignant cells in cerebro spinal fluid. *J. Clin. Path.*, 1954, 7, 122—130.
13. Stam F. C.: Leptomeningeal carcinomatosis. *Psychiatr. Neurol. Neurochir.*, 1960, 63, 2—7.

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

BARBARA GAJKOWSKA, ANDRZEJ LOESCH, RYSZARD PLUTA

EFFECT OF HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON THE
HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSIAL SYSTEM OF THE RABBIT
I. THE SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI

Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warszawa

Mammals exposed to high ambient temperatures mobilise numerous physiological processes, especially thermoregulatory ones (Greenleaf et al. 1976; Szczepańska-Sadowska 1977). Some of the processes, for instance evaporative water loss, are of adaptive character, because, decreasing elevation of body temperature they enable survival in unfavourable environmental conditions (Taylor 1970). However, some physiological and metabolic changes caused by hyperthermia are undoubtedly harmful. These include: an increase in brain oxygen consumption (Mayer, Handa 1967; Nemoto, Frankel 1970; Carlsson et al. 1976), an increase in blood-brain barrier permeability (Mueller 1979), and thermally stimulated panting (Pleschka 1971). In such conditions ischemic-anoxic or hypoxic-anoxic cerebral ischemia may occur (Carlsson et al. 1976). Mueller (1979) emphasizes that under hyperthermia the brain may present not only cytotoxic but also vasogenic oedema. The studies by Kapuściński and Karczewski (1973) and Karczewski et al. (1973) imply that thermal panting of heat-stressed rabbits develops hypocapnia; then, by initiation of cerebral vasoconstriction and subsequent elevation of cerebral blood-flow, it results in brain tissue hypoxia. The above-mentioned observations imply that physiological consequences of heat stress are rather complicated and difficult to estimate.

Although there is abundant available information on the physiology of heat-stressed mammals, relatively little is known about the morphology of the hypothalamic areas involved in the thermoregulatory processes. The papers by Curé and Teyssier (1973) and Gajkowska (1980) carried out on rats belong to the scarce works concerning this problem. The scarcity of information in the literature on the ultrastructure of

the supraoptic and paraventricular nuclei of animals exposed to high ambient temperatures prompted the present study. In this paper special attention is given to the endocrine neurons.

MATERIAL AND METHODS

The nucleus supraopticus (SON) and n. paraventricularis (PVN) of 12 adult Albino rabbits of both sexes weighing between 2.6 and 3.6 kg were investigated. Ten animals were exposed to experimental heat stress. The details of experimental procedure were described previously (Pluta 1984). Controls were three animals kept in normal conditions (reared at 18–20°C and fluctuating humidity of the air). Each experimental animal was singly placed in a cylindrical lucid chamber (90 × 40 × 40 cm) and exposed for 3 h to high ambient temperature maintained at 38–39°C. Air of the same temperature and relative humidity ranging between 45 and 60% was passed through this chamber. For ultrastructural purposes, samples from the SON and PVN were taken immediately after the 3 h exposure to high ambient temperature and 3, 6, 24, 48, and 72 h after application of the heat stress. Both the normal and the experimental animals were anesthetized with intravenous vetbutal in 40 mg/kg doses, and next perfused through the left cardiac ventricle with 300 ml of 0.9% sodium chloride at room temperature, followed by 1 l of aldehyde fixative at 4°C. The fixative consisted of 4% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer at pH 7.4. The time from the opening of the chest to the beginning of the fixation procedure never exceeded 2 min and the total perfusion time was 15–20 min. The SON and PVN were removed and placed in the same cold fixative overnight. Next the specimens were rinsed in 0.2 M sodium cacodylate buffer, post-fixed in 2% OsO₄ (in the same buffer), and then dehydrated in ethanol and embedded in Epon. Ultrathin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and subsequently examined using an JEM-7A electron microscope.

RESULTS

Control rabbits

There were no marked differences between the ultrastructural features of the SON and PVN endocrine neurons. In general, the cell body of SON and PVN neurons was occupied by a large nucleus with a rounded or oval contour. A conspicuous, dense spheroidal nucleolus was also found there. The pattern of granular endoplasmic reticulum was characterized by numerous slender profiles (Fig. 1a). The Golgi complex, however, was prominent in both SON and PVN perikarya; it contained rather flattened saccules (Fig. 1a, b). In the Golgi region dense cored

neurosecretory granules (NSG), and small smooth or coated vesicles were frequently present. Particular abundance of NSG has been noted in some PVN perikarya (Fig. 1b). Dense bodies, multivesicular bodies, and numerous mitochondria were distributed throughout the cytoplasm in the SON and PVN somata.

Heat-stressed rabbits

There are no conspicuous differences between the alterations revealed in SON and PVN neurons, and thus the description below concerns both hypothalamic areas.

Directly after heat stress most of the SON and PVN perikarya did not display major deviations from the controls. However, in SON there were perikarya that contained numerous NSG (Fig. 2a), and others free of them (Fig. 2b). In PVN a few perikarya disclosed numerous microvacuoles, extensively dilated and partially degranulated cisternae of endoplasmic reticulum, as well as some swollen mitochondria (Fig. 1c).

Rabbits 3 h after heat stress. In both investigated nuclei there were perikarya that contained NSG (Fig. 3a, b). In perikarya of SON electron-dense NSG were present close to the Golgi region or in the vicinity of the extensive Golgi complex. Numerous NSG of lower density were also present in the other cytoplasmic areas. In the perikarya multivesicular bodies and short and slightly dilated cisternae of granular endoplasmic reticulum were noted (Fig. 3a).

The NSG-containing neurons in the PVN exhibited similar features. They revealed, however, more frequently dense lysosomal bodies (Fig. 3b). In both investigated nuclei there were also present perikarya devoid of NSG (Fig. 4a, b). The SON perikarya were characterized by granular, frequently large, electron-lucent vacuoles, and a poorly developed Golgi complex (Fig. 4a). While the PVN neurons exhibited an extensive Golgi complex, abundant ergastoplasm with flattened cisternae, and densely packed cytoplasmic polyribosomes (Fig. 4b).

Rabbits 6 h after heat stress. In both hypothalamic nuclei there were neurons with swollen perikarya. It was especially well noticeable in SON. In some neurons the undilated cisternae of granular endoplasmic reticulum zonally distributed throughout the swollen cytoplasm and the scarcity of other organelles was striking. However, in spite of the very weakly developed Golgi complex, small dense bodies and slender mitochondria were also found in the perikarya (Fig. 5a). In PVN, some perikarya contained numerous electron-lucent agranular vacuoles (Fig. 5b), therefore, they were similar to those observed in SON of rabbits 3 h after heat stress. At the same time, there also were abundant perikarya in NSG (Fig. 5c). Thus, they did not differ from the controls in this respect.

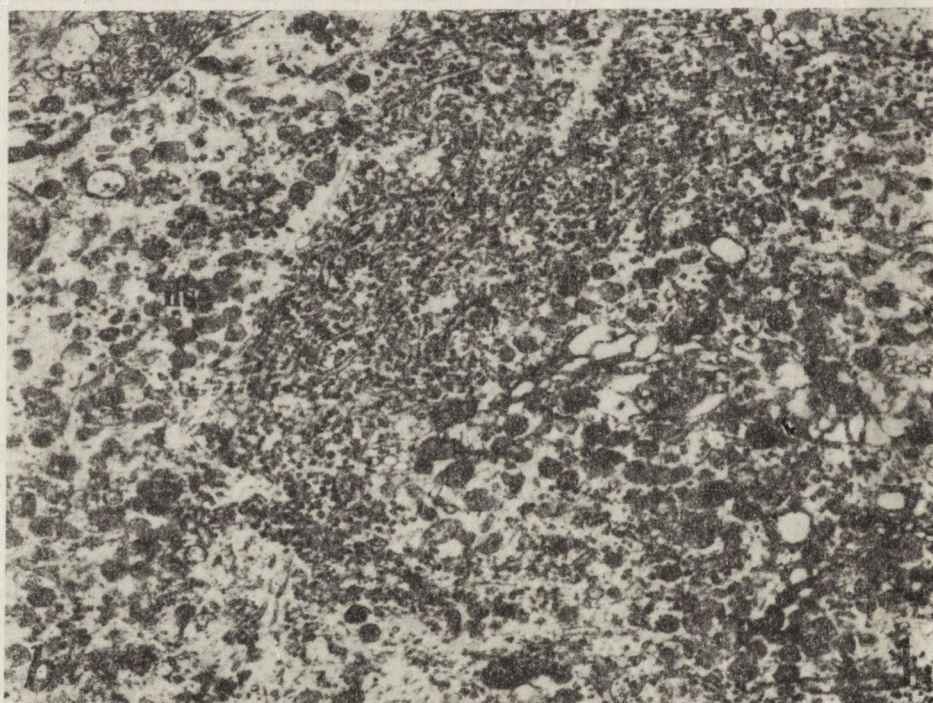
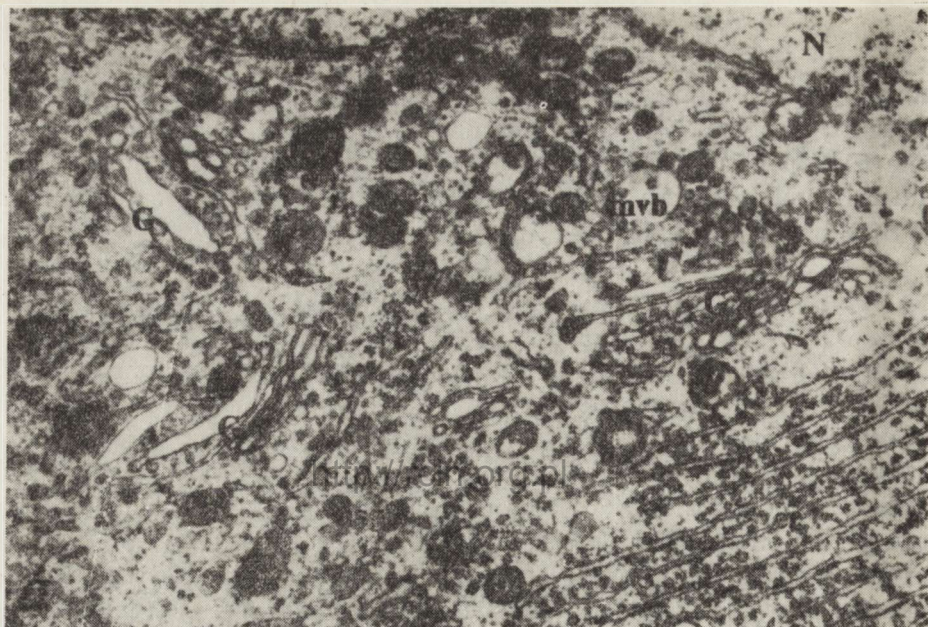


Fig. 1a—b. Control rabbit. *1a.* SON. Neuron: N — nucleus, G — Golgi complex, er — granular endoplasmic reticulum, db — dense bodies, mvb — multivesicular bodies, nsg — neurosecretory granules, m — mitochondria. $\times 14\,000$. *1b.* PVN. Neuron with abundant neurosecretory granules (nsg). G — Golgi complex, er — granular endoplasmic reticulum. $\times 9\,000$

Ryc. 1a—b. Królik kontrolny. *1a.* SON. Neuron: N — jądro, G — kompleks Golgiego, er — siateczka śródplazmatyczna ziarnista, mvb — ciało wielopęcherzykowe, nsg — ziarnistości neurosekrecyjne, m — mitochondria. Pow. $14\,000 \times$. *1b.* PVN. Neuron wypełniony ziarnistościami neurosekrecyjnymi (nsg), G — kompleks Golgiego, er — siateczka ziarnista. Pow. $9\,000 \times$

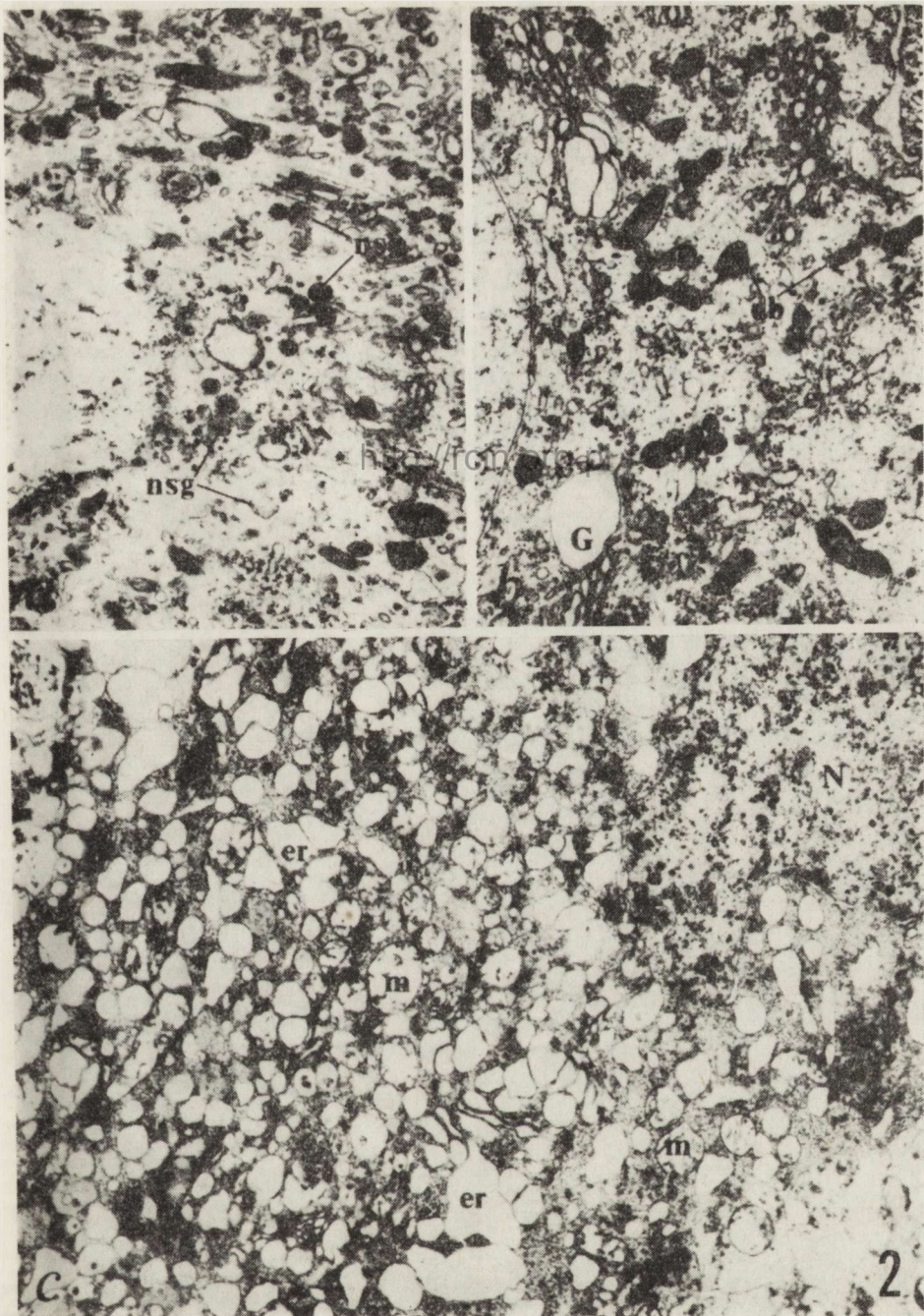


Fig. 2a—c. Rabbit directly after heat stress. 2a. SON. Perikaryon containing neurosecretory granules (nsg). $\times 9000$. 2b. SON. Perikaryon free of neurosecretory granules. G — Golgi complex, db — dense bodies, er — granular endoplasmic reticulum. $\times 10\ 000$. 2c. PVN. „Microvacuolated” perikaryon devoid of neurosecretory granules, er — granular endoplasmic reticulum, m — mitochondria. $\times 9000$

Ryc. 2a—c. Królik bezpośrednio po stresie cieplnym. 2a. SON. W perykarionie widoczne ziarnistości neurosekrecyjne (nsg). Pow. $9000 \times$. 2b. SON. W perykarionie brak ziarnistości neurosekrecyjnych. G — kompleks Golgiego, db — ciała gęste, er — siateczka ziarnista. Pow. $10\ 000 \times$. 2c. PVN. „Mikrowakuolizacja” perykarionu pozbawionego ziarnistości neurosekrecyjnych. N — jądro, er — siateczka ziarnista, m — mitochondria. Pow. $9000 \times$

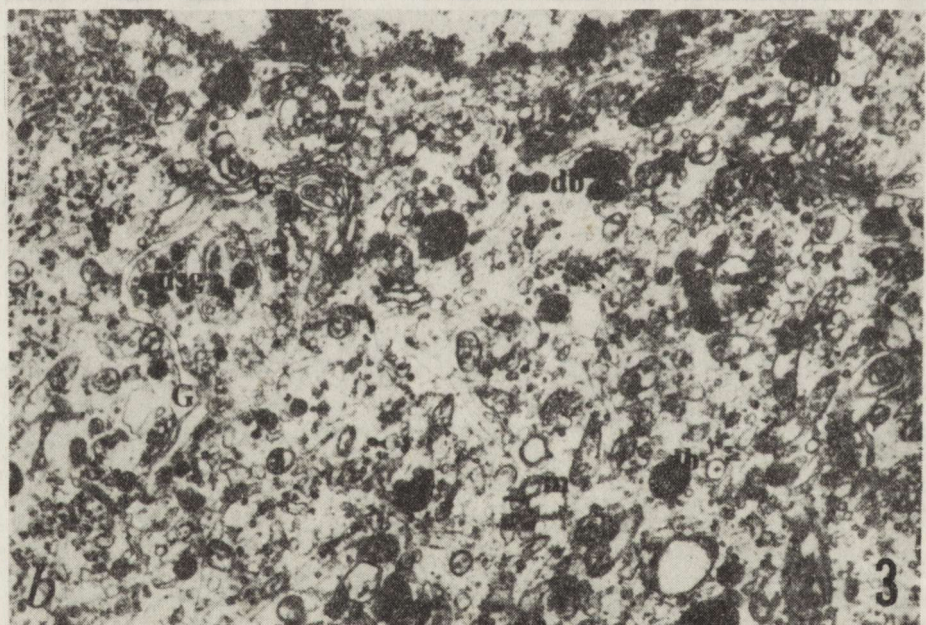
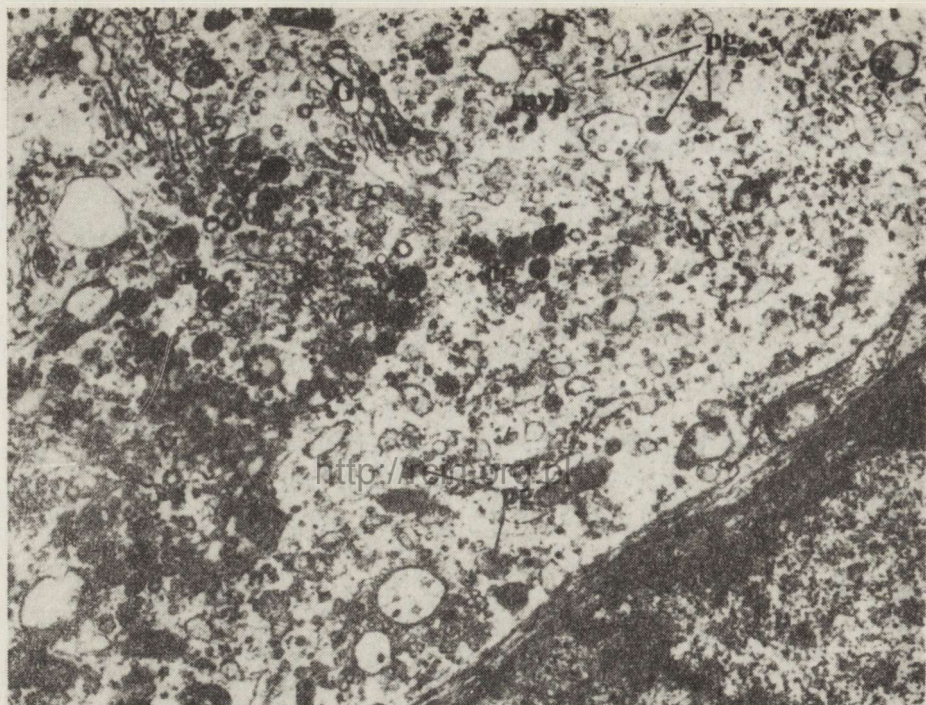


Fig. 3a—b. Rabbit 3 h after heat stress. *3a.* SON. Neuron: „dense” granules (dg), close to the Golgi region (G), while „pale” ones (pg) in the other cytoplasmic areas. En — endothelial cell, er — granular endoplasmic reticulum, mvb — multi-vesicular bodies. $\times 12\ 000$. *3b.* PVN. Neuron: G — Golgi complex, nsg — neurosecretory granules, db — dense bodies, m — mitochondria. $\times 10\ 000$

Ryc. 3a—b. Królik 3 godz. po stresie cieplnym. *3a.* SON. W neuronie widoczne ziarnistości „gęste” (dg) w regionie kompleksu Golgiego (G) i „jasne” (pg) w innych obszarach cytoplazmy. En — komórka endotelium, er — siateczka ziarnista, mvb — ciała wielopęcherzykowe. Pow. $12\ 000 \times$. *3b.* PVN. Neuron: G — kompleks Golgiego, nsg — ziarnistości neurosekrecyjne, db — ciała gęste, m — mitochondria. Pow. $10\ 000 \times$

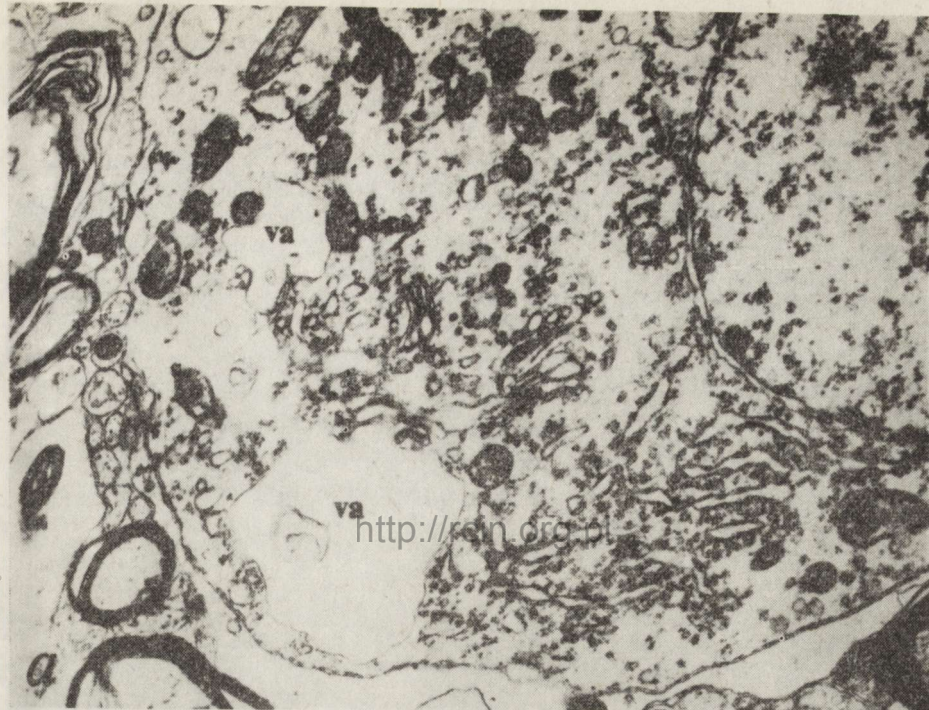


Fig. 4a—b. Rabbit 3 h after heat stress. *4a.* SON. Perikaryon free of neurosecretory granules; note agranular vacuoles (va), G — Golgi complex, er — granular endoplasmic reticulum. $\times 12\ 000$. *4b.* PVN. Perikaryon almost devoid of neurosecretory granules, note extensive Golgi complex (G) and abundant ergastoplasm (er). $\times 10\ 000$

Ryc. 4a—b. Królik 3 godz. po stresie cieplnym. *4a.* SON. W perykarionie pozbawionym ziarnistości neurosekrecyjnych widoczna wakuola (va), G — kompleks Golgiego, er — siateczka ziarnista. Pow. $12\ 000 \times$. *4b.* PVN. W perykarionie nieliczne ziarnistości neurosekrecyjne, bardzo rozwinięty kompleks Golgiego (G) i obfita siatka ziarnista (er). Pow. $10\ 000 \times$

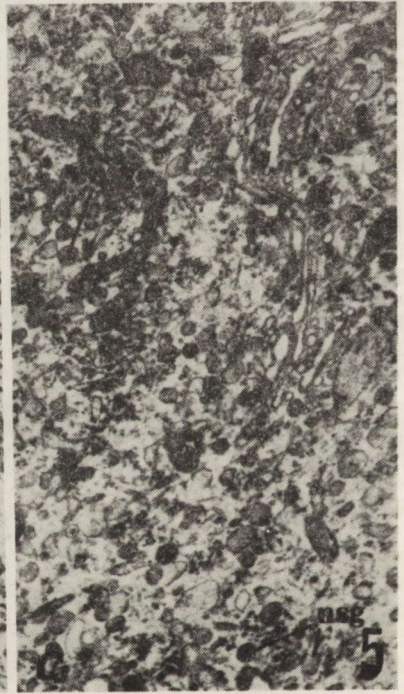
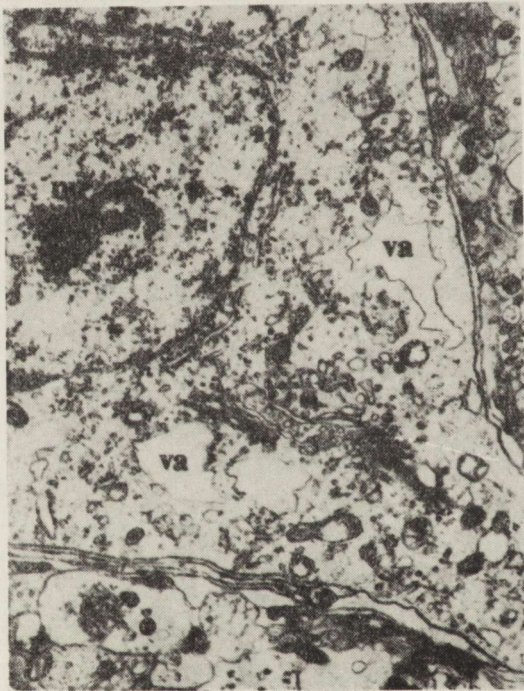
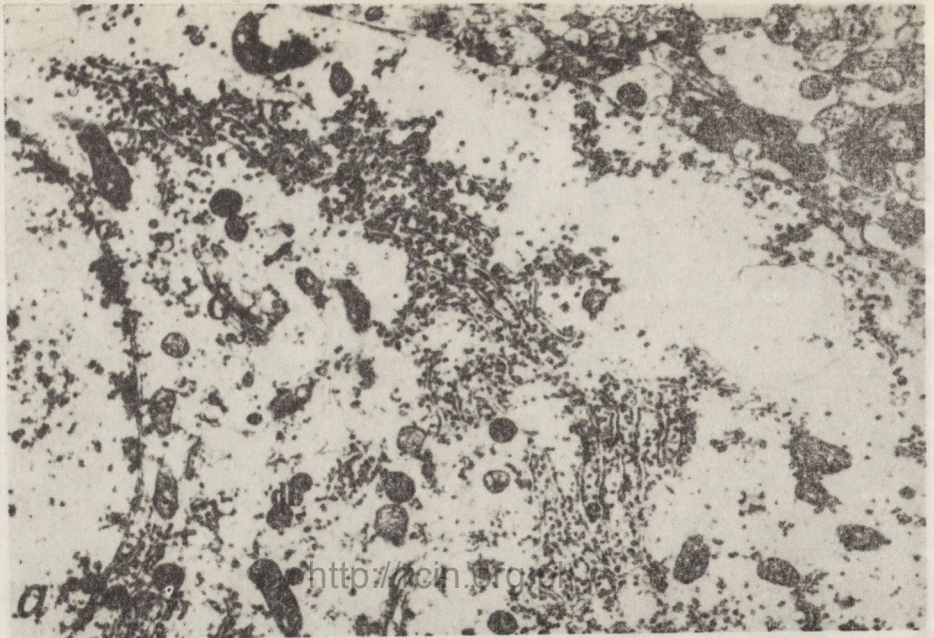


Fig. 5a—c. Rabbit 6 h after heat stress. *5a.* SON. Swollen perikaryon, G — Golgi complex, er — granular endoplasmic reticulum, db — dense bodies, m — mitochondria. $\times 8000$. *5b.* PVN. Note agranular vacuoles (va) in perikaryon, nu — nucleolus. $\times 7000$. *5c.* PVN. Perikaryon with abundant neurosecretory granules (nsg), G — Golgi complex. $\times 8000$

Ryc. 5a—c. Królik 6 godz. po stresie cieplnym. *5a.* SON. Obrzmiały perykarion, G — Golgiego kompleks, er — siateczka ziarnista, db — ciała gęste, m — mitochondria. Pow. 8000 \times . *5b.* PVN. W perykarionie widoczne puste wakuole (va), nu — jąderko. Pow. 7000 \times . *5c.* PVN. Perykarion wypełniony ziarnistościami neurosekcyjnymi (nsg), G — kompleks Golgiego. Pow. 8000 \times

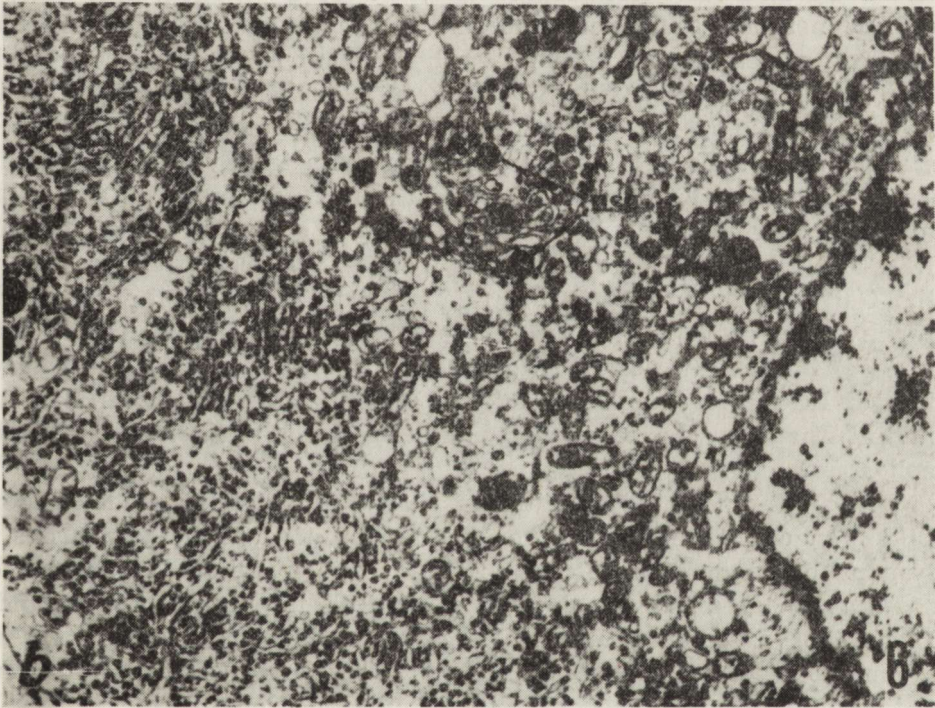
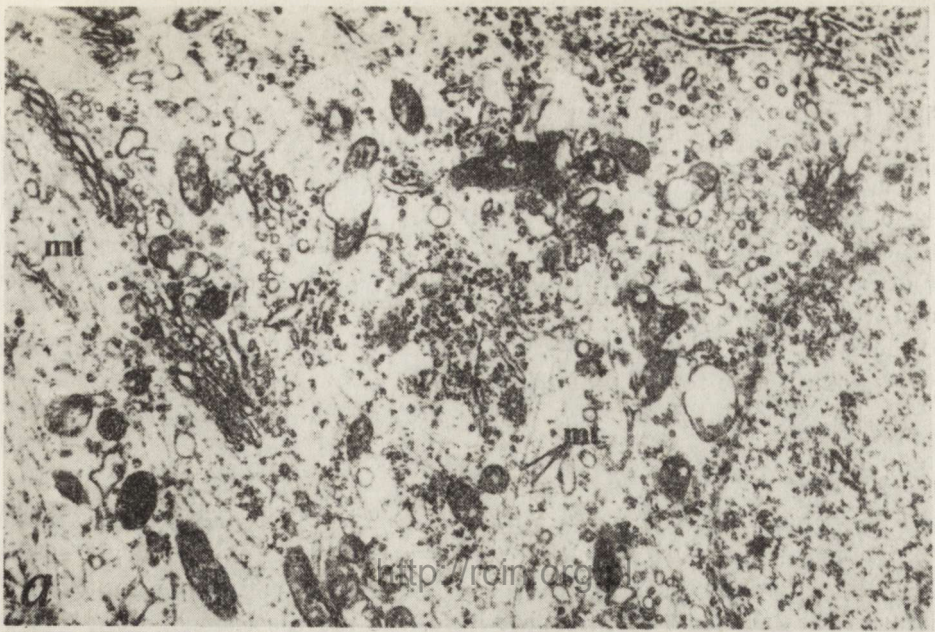


Fig. 6a—b. Rabbit 24 h after heat stress. *6a.* SON. Perikaryon free of neurosecretory granules, note numerous microtubules (mt), N — nucleus. $\times 9000$. *6b.* PVN. Perikaryon exhibits extensive ergastoplasm (er) and Golgi complex (G), in the vicinity of the latter some neurosecretory granules (nsg). $\times 9000$

Ryc. 6a—b. Królik 24 godz. po stresie cieplnym. *6a.* SON. W perykarionie brak ziarnistości neurosekrecyjnych, widoczne liczne mikrotubule (mt), N — jądro. Pow. $9000 \times$ *6b.* PVN. W perykarionie obfita siateczka ziarnista (er) i kompleks Golgiego (G), w jego obszarze kilka ziarnistości neurosekrecyjnych (nsg). Pow. $9000 \times$

Rabbits 24 h after heat stress. In SON and PVN some neurons were still swollen and resembled those described above. But the features of the majority of perikarya were comparable to those of the controls. The SON perikarya, however, were more frequently devoid of NSG and contained numerous microtubules (Fig. 6a). On the other hand, extensive granular endoplasmic reticulum as well as the Golgi complex, and numerous NSG occupying mainly the Golgi region characterized PVN neurons (Fig. 6a, b).

Rabbits 48 h and 72 h after heat stress. In SON and PVN the neurons were comparable to those of the controls.

DISCUSSION

The present study showed that in rabbits exposed to high ambient temperature the SON and PVN endocrine neurons exhibited alterations. However, some alterations that concern certain perikarya in the PVN neurons are difficult to interpret here, the more so, since, alongside endocrine neurons, some non-endocrine perikarya including parvocellular ones are present in this area of the hypothalamus (Clementi, Ceccarelli 1970). Therefore, the possibility cannot be excluded, that significantly altered perikarya as, for instance those "microvacuolated" in PVN of heat-stressed rabbits did not have an endocrine character. Even so, the discussion on the ultrastructural features of the rest perikarya has a few points of support. These concern: a) the findings of perikarya that contain NSG and other ones devoid of them, b) the NSG location either close to the Golgi region or also in other cytoplasmic areas, as it was clearly perceived in some PVN neurons from controls and heat-stressed animals, c) the presence of large, electron-lucent vacuoles in the perikarya free of NSG; these appeared only in heat-stressed animals, and d) the finding of swollen perikarya also exhibiting scarcity of cytoplasmic organelles.

The appearance of NSG within perikarya is a significant factor identifying endocrine neurons. Although, the identification of the neurons in respect to the hormone content is not possible without application of specific cytochemical or electrophysiological techniques (Vandesande, Dierickx 1975; Brimble, Dyball 1976; Tasso et al. 1977). Unfortunately, no attempts have been made in the present study for cytochemical differentiation of vasopressin- and oxytocin-producing neurons.

As to the finding of NSG, however, the fluctuations in the NSG amounts were noted in SON and PVN perikarya in the present experimental conditions. The diversity of perikarya in respect to the NSG occurrence is mentioned by numerous authors. According to Zambrano and De Robertis (1966), Eneström (1967) and Sloper (1972) the NSG depletion is due to an increased activity of the neurons. This interpreta-

tion, however, is not wholly in keeping with the studies by Morris and Dyball (1974) based on morphometric analysis of SON and PVN perikarya during and after experimentally induced hypersecretion (saline treatment) in rats. These studies proved that the total number of NSG remained unchanged within the active perikarya, while the increase in the ratio of "dense" (immature) to "pale" (mature) NSG was significant. Thus, the authors indicate fluctuations in mutual proportions of the "immature" or of less "mature" granules during stimulation. These, however, are parallelly correlated with the significant changes in granular endoplasmic reticulum extension (Morris, Dyball 1974).

In heat-stressed rabbits both "dense" and "pale" NSG were easily noticeable. Moreover, the location of "dense" NSG close to the Golgi region was evident (Fig. 3a). Thus, the finding may support the hypothesis of the "immature" character of the granules. At the same time it indicates an increase in the production of neurosecretory material in heat-stressed rabbits. In their ultrastructural studies on the perikarya of endocrine neurons Yuki take et al. (1977) distinguished as many as four phases of the secretory cycle. According to the authors, the predominant location of NSG close to the Golgi region strongly suggests that the perikaryon is in the granule production phase. At the same time, the abundant occurrence of NSG that are limited not only to the Golgi region but also involve other cytoplasmic areas indicates that the perikarya are prepared to granule transportation. Perikarya with such features were also observed here, especially in the PVN from the controls and heat-stressed rabbits (Fig. 1b and 5c).

No doubt, however, numerous perikarya in SON and PVN of rabbits 6 h after heat stress were either devoid of NSG or contained them in very moderate amounts. This suggests that greater numbers of NSG were transported to the neurohypophysis. Thus, two phases of the secretory cycle were mainly observed in the present experiment: a phase of NSG production (NSG-containing perikarya), and a phase of NSG transportation (NSG-free perikarya). From the fact that during the course of the experiment the perikarya free of NSG were more and more frequently observed in SON and PVN nuclei, it may be concluded that the functional cycles of individual (certain) neurons tend to be synchronous.

On the other hand, there was a coincidence between the phenomena of NSG depletion and the appearance of large, electron-lucent vacuoles in the perikarya. Considering the possible osmotic disturbances, studies on nervous cells of some vertebrates or invertebrates indicate an increase in plasmalemma permeability for Na^+ during overheating (Gorman, Marmor 1970; Začevic, Levitan 1980). This finally leads to swelling of the cells owing to local osmotic changes (Tosteson 1964). It is worth to mention the opinion of Yoshimura et al. (1973) concerning cell re-

sponse to the stress situation. They claimed that vacuolization of cell organelles in defined physiological states might reflect a "negative" biological cell reaction leading to metabolic disturbances. In this respect, the findings of swollen perikarya in SON 6 h after heat stress and "microvacuolated" ones in PVN (directly after heat stress) may have a similar significance.

The striking point here is that similar abnormalities have also been widely found within various areas of the central nervous system of mammals during or after severe oxygen deprivation and cerebral ischaemia (McGee-Russel et al. 1970; Schneider, Dralle 1973; Jenkins et al. 1981). Finally, it is also noteworthy that experimental conditions as described in the present paper produce a significant increase in body temperature including the anterior hypothalamus (Pluta, personal communications).

In conclusion, it is evident that application of high ambient temperature in rabbits evokes fine structural changes within the hypothalamic SON and PVN endocrine neurons. It seems that most of the unfavourable influences on the physiology of neurons were overcome in the rabbits 24 h after heat stress. The majority of changes are linked with an increased neuronal activity leading to an increased production and transportation of neurosecretory material.

WPŁYW WYSOKIEJ TEMPERATURY
NA UKŁAD PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWY KRÓLIKA
I. JĄDRO NADWZROKOWE I JĄDRO PRZYKOMOROWE

Streszczenie

Badano ultrastrukturę neuronów jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) podwzgórza królika po 3-godzinnej ekspozycji na wysoką temperaturę otoczenia (38–39°C). Wycinki z jąder podwzgórza pobierano bezpośrednio oraz po 3, 6, 24, 48 i 72 godz. po eksperymencie. W neuronach jądra SO i PV królików poddanych stresowi zaobserwowano różnice w zawartości ziarnistości neurosekrecyjnych (NSG).

Duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych (NSG) o „gęstym” i „jasnym” rdzeniu, spotykana w okolicy aparatu Golgiego i w innych obszarach cytoplazmy, świadczy o wzmożonej aktywności tych neuronów. Obserwowano także wiele neuronów pozbawionych NSG. Można sądzić, że w tych neuronach następuje szybki transport materiału neurosekrecyjnego do przysadki.

W nielicznych neuronach obserwowano nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej będące prawdopodobnie reakcją na stres cieplny. Perykaryony neuronów PV ulegały „mikrowakuolizacji” (bezpośrednio po stresie), a niektóre neurony SO wykazywały obrzmienie cytoplazmy (w 6 godz. po stresie). Po 24, 48 i 72 godz. po eksperymencie nie stwierdzono istotnych nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej neuronów SO i PV.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ
 НА ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНУЮ СИСТЕМУ КРОЛИКА
 I. НАДЗРИТЕЛЬНОЕ ЯДРО И ОКОЛОЖЕЛУДОЧКОВОЕ ЯДРО

Резюме

Авторы исследовали ультраструктуру нейронов надзрительного ядра (SO) и околожелудочкового ядра (PV) гипоталамуса кролика после трехчасовой экспозиции на высокую температуру внешней среды (38—39°C). Сегменты из ядер гипоталамуса авторы брали потчас же и спустя 3, 6, 24, 48 и 72 часа после эксперимента. В нейронах ядра SO и PV кроликов подвергнутых стрессу они наблюдали различия в содержании нейросекреторных грануляций (NSG).

Большое количество нейросекреторных грануляций (NSG) с „густой” и „светлой” сердцевиной встречаемое в области аппарата Гольджи и в других областях цитоплазмы свидетельствует об усиленной активности этих нейронов. Встречено также много нейронов лишенных NSG; можно предполагать, что в этих нейронах наступает быстрый транспорт нейросекреторного материала в гипофиз.

В немногочисленных нейронах наблюдались аномалии ультраструктурного строения являющиеся вероятно реакцией на тепловой стресс. Перикарионы нейронов PV подлежали „микровакуолизации” (непосредственно после стресса), а некоторые нейроны SO обнаруживали набухание цитоплазмы (в 6 часов после стресса). Наблюдения веденные спустя 24, 48 и 72 часа после эксперимента не проявили никаких аномалий в ультраструктурном строении нейронов SO и PV.

REFERENCES

1. Brimble M. J., Dyball R. E.: Contrasting pattern changes in the firing of vasopressin and oxytocin secreting neurons during osmotic stimulation. *J. Physiol. (London)*, 1976, 263, 189—190.
2. 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. Neurochemistry*, 1976, 26, 1001—1006.
3. Clementi F., Ceccarelli B.: The fine structure of rat hypothalamic nuclei. In: *The Hypothalamus*, Eds. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini. Academic Press, New York 1970, 17—67.
4. Curé M., Teyssier M.: Données histologiques et cariométriques sur l'appareil hypothalamo-neurohypophysaire du rat exposé chroniquement à une ambiance thermique chaude. *Comptes Rendus Soc. Biol. (Paris)*, 1973, 167, 1135—1138.
5. Eneström S.: Nucleus supraopticus. A Morphological and experimental study in the rat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1967, 189, 1—99.
6. Gajkowska B.: Effect of high environmental temperature on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 1—13.
7. Gorman A. L. F., Marmor M. F.: Temperature dependence of the sodium-potassium permeability ratio of molluscan neurone. *J. Physiol. (London)*, 1970, 210, 913—917.

8. Greenleaf I. E., Kozłowski S., Nazar K., Kaciuba-Uściłko H., Brzezińska Z., Ziemia A.: Ion-osmotic hyperthermia during exercise in dogs. *Am. J. Physiol.*, 1976, 230, 74—79.
9. Jenkins L. W., Pawlishock J. T., Lewelt W., Miller J. D., Mecker D. P., Becker D. P.: The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981, 55, 205—220.
10. Kapuściński A., Karczewski W. A.: The effects of hyperventilation on the cerebral blood flow in normo- and hyperthermic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, 73—41, 11—1—22.
11. Karczewski W. A., Karczewska E., Rycembel Z.: Thermal polypnoea: response of phrenic nerve activity to hyperthermia and hyperventilation. *IRCS Medical Science*, 1973, 73—12, 12—1—10.
12. McGee-Russel S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischaemic cell change in rat brain. *Brain Res.*, 1970, 20, 193—200.
13. Meyer J. S., Handa I.: Cerebral blood flow and metabolism during experimental hyperthermia. *Minn. Med.*, 1967, 50, 37—44.
14. Morris J. F., Dyball R. E. J.: A quantitative study of the ultrastructural changes in the hypothalamo-neurohypophysial system during and after experimentally induced hypersecretion. *Cell Tissue Res.*, 1974, 149, 525—535.
15. Mueller S. M.: Increased blood-brain barrier permeability during hyperthermia in the awake rat. *Trans. Ann. Neurol. Assoc.*, 1979, 104, 81.
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. Pluta R.: Zmiany temperatury mózgu i wybranych okolic ciała królika oraz jego zachowania w podwyższonej temperaturze otoczenia. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 435—444.
19. Schneider H., Dralle J.: Ultrastructural changes in the rat spinal cord after temporary occlusion of the thoracic aorta. *Acta neuropath. (Berl)*, 1973, 26, 301—315.
20. Sloper J. C.: The validity of current concepts of hypothalamo-neurohypophyseal neurosecretion. *Progr. Brain Res.*, 1972, 3, 131—239.
21. Szczepańska-Sadowska E.: Physiological mechanism suppressing thirst and enhancing vasopressin release in hyperthermia. *Studia Societatis Scientiarum Torunensis*, PWN, Warsaw 1977, 3, 1—11.
22. Tasso F., Rua S., Picard D.: Cytochemical duality of neurosecretory material in the hypothalamo-posthypophysial system of the rats as related to hormonal content. *Cell Tissue Res.*, 1977, 180, 11—29.
23. Taylor C. R.: Dehydration and heat: effects on temperature regulation of East African ungulates. *Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 1136—1140.
24. Tosteson D. C.: Regulation of cell volume by sodium and potassium transport. In: *The Cellular Functions of Membrane Transport*. Eds: J. F. Hoffman, N. J. Englewood Cliffs. Prentice—Hall, 1964, 89.
25. Vandesande F., Dierickx K.: Identification of the vasopressin producing and the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res.*, 1975, 164, 153—162.
26. Yoshimura F., Harumiya K., Soiji T., Yokoyama M., Kumagai T.: Possible reversion of pituitary „Thyroidectomy cells” into their original acidophils in rats. *Endocrinol. Jap.*, 1973, 20, 249—262.

27. Yukitake Y., Taniguchi Y., Kurosumi K.: Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and the formation of Herring bodies in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell Tissue Res.*, 1977, 177, 1—8.
28. Zečević D., Levitan H.: Temperature acclimation effects on membrane physiology of an undefined snail neuron. *Am. J. Physiol.*, 1980, 239, C47—C—57.
29. Zambrano D., De Robertis E.: The secretory cycle of supraoptic neurons in the rat. A structural-functional correlation. *Z. Zellforsch.*, 1966, 73, 414—431.

Authors' address: Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa

<http://rcin.org.pl>

ANDRZEJ LOESCH, BARBARA GAJKOWSKA, RYSZARD PLUTA

EFFECT OF HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON THE
HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSIAL SYSTEM OF THE RABBIT
II. THE NEUROHYPOPHYSIAL AXONS

Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System,
Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa

The thermoregulatory processes linked with thermoregulatory centres in the brain are directly affected by ion-osmotic changes (Nielsen 1974; Greenleaf et al. 1976). For instance, extracellular hyperosmolality (without elevation of Na^+) in physically exercised dogs induces an extensive increase in body temperature (Kozłowski et al. 1980). It is known that plasma concentration of arginine vasopressin is directly proportional to plasma osmotic pressure as well as blood volume (Dunn et al. 1973). Basing on physiological examination of men exposed to short-term hyperthermia (10 min, 60°C), Kozłowski et al. (1972) suggested that the volume-regulated mechanisms controlling vasopressin secretion were activated by reduced volume of the central blood flow followed by shift of the blood into the skin vessels.

A significant phenomenon in heat stress is that water loss by thermoregulatory evaporation can greatly exceed renal water loss (Taylor 1970). As regards the possible association between heat stress and the mechanisms controlling body temperature and body hydration, Doris and Baker (1981) claim that centrally released arginine vasopressin does not normally produce inhibition of evaporative water loss and consequent elevation of body temperature. Moreover, it has been demonstrated that the link between elements sensitive to changing body fluids osmolality and elements controlling evaporative water loss is not provided by the release of arginine vasopressin into the general circulation or at central neural sites (Doris, 1982). However, it has been demonstrated that centrally acting arginine vasopressin affects thermoregulatory mechanisms (Kasting et al. 1980). Thus, there are indications that in rabbits intraventricular infused arginine vasopressin consistently produces hyperthermia (Lipton, Glyn 1980).

Parallel studies (Gajkowska et al. 1985) on the supraoptic and paraventricular nuclei of heat-stressed rabbits indicate fine structural changes within the perikarya of endocrine neurons. No doubt some of them are linked with an increased production of neurosecretory material. In the present paper, the results of the study on neurohypophysial axons of rabbits exposed to high ambient temperature are reported.

MATERIAL AND METHODS

The neurohypophysial axons of 12 adult Albino rabbits of both sexes, weighing between 2.6 and 3.6 kg were investigated. Ten animals were exposed to experimental heat stress. The details of experimental procedure have been described previously (Pluta 1984; Gajkowska et al. 1985). Controls were three animals in normal conditions. For ultrastructural purposes, neurohypophysis samples from experimental animals were taken immediately after the 3 h exposure to high ambient temperature (38–39°C) and 3, 6, and 24 h after application of heat stress. The specimens both from controls and experimental animals were subjected to the same preparation as described previously (Gajkowska et al. 1985), and were examined in a JEM-7A electron microscope.

RESULTS

Control rabbits

The neurohypophysial axons of control rabbits were abundant in dense-cored neurosecretory granules (NSG) which displayed uniform electron density. The axons also contained typically clustered electron-lucent microvesicles mostly found at the axon terminals. (Fig. 1).

Heat-stressed rabbits

Directly after heat stress the majority of sectioned profiles of the axons displayed a reduced numbers of NSG. On the other hand, the profiles exhibited an increased amount of electron-lucent microvesicles. The microvesicles were dispersed between the NSG or occupied the profiles of axons devoid of NSG (Fig. 2).

In rabbits 3 h after heat stress the changes were more pronounced. Some axons did not contain any NSG, but displayed decreased density of their axoplasm (Fig. 3a, b). The majority of axons, however, showed numerous NSG and swollen mitochondria (Fig. 3a).

In rabbits 6 h after heat stress the observed alterations were more pronounced. Some axon terminals were swollen and exhibited only clusters of microvesicles and mitochondria (Fig. 4a). Autophagic vacuoles within the axon profiles associated with NSG were occasionally found (Fig. 4b).

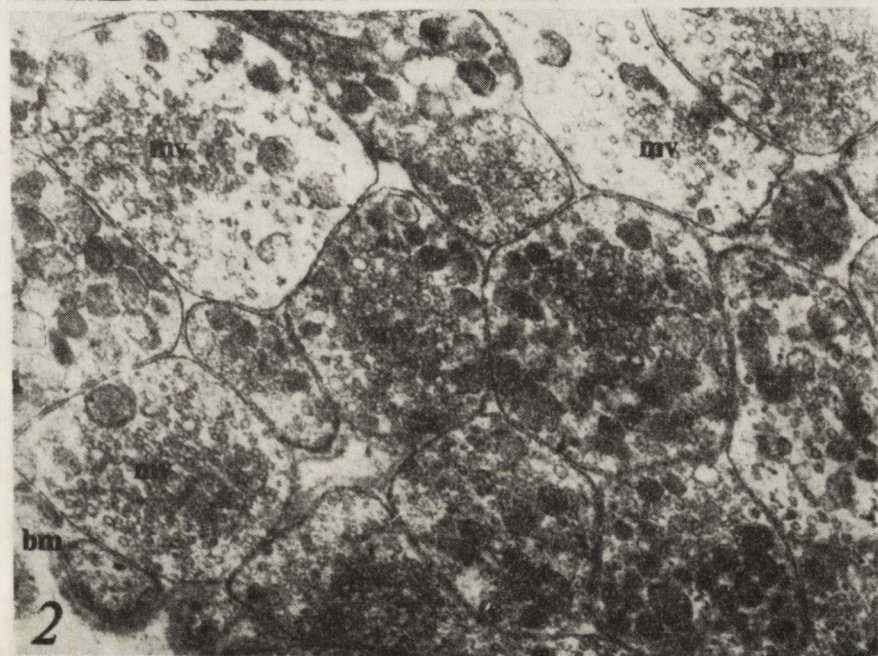
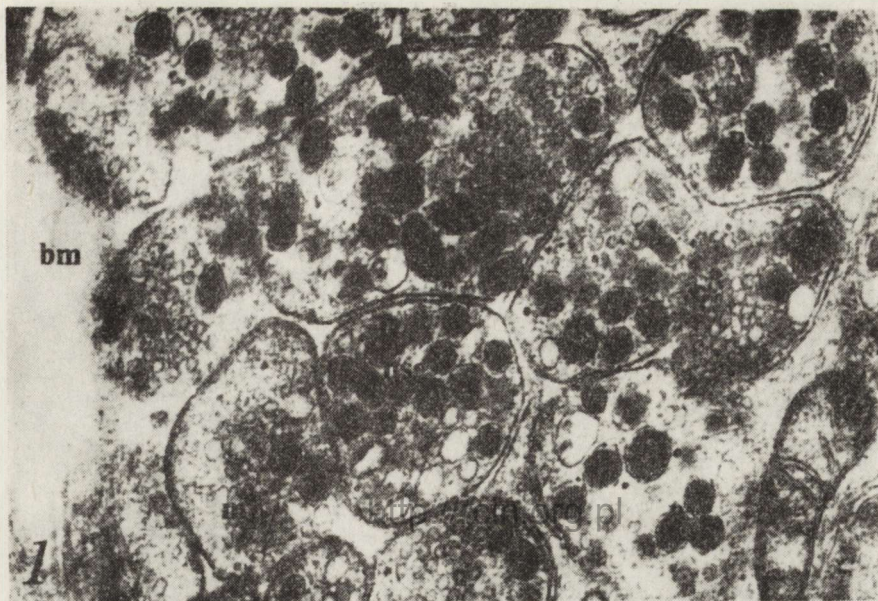


Fig. 1. Control rabbit. Neurosecretory granules (nsg) and clusters of microvesicles (mv) in the axons; bm — basement membrane of blood vessel. $\times 35\ 000$

Ryc. 1. Królik kontrolny. W aksonach ziarnistości neurosekrecyjne (nsg) i skupiska mikropecherzyków (mv); bm — błona podstawna naczyń krwionośnych. Pow. $35\ 000 \times$

Fig. 2. Rabbit directly after heat stress. Abundance of microvesicles (mv) in the axons; bm — basement membrane of blood vessel. $\times 15\ 000$

Ryc. 2. Królik bezpośrednio po stresie cieplnym. Obfitość mikropecherzyków w aksonach (mv); bm — błona podstawna. Pow. $15\ 000 \times$

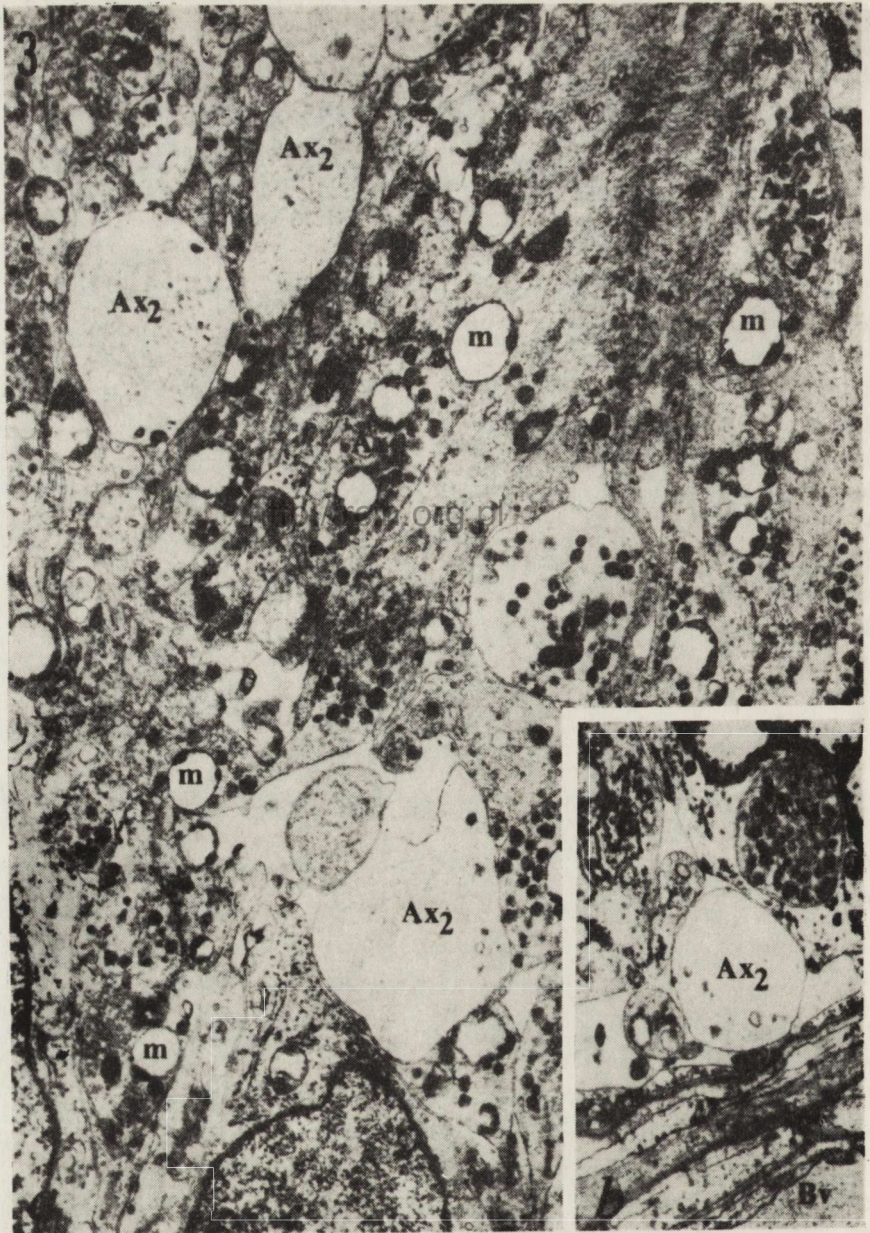


Fig. 3a—b. Rabbit 3 h after heat stress. 3a. Granulated (Ax_1) and degranulated (Ax_2) axons; m — swollen mitochondria. $\times 9000$. 3b. At perivascular area the Ax_1 axon filled with neurosecretory granules, while the Ax_2 axon devoid of them; Bv — blood vessels. $\times 9000$

Ryc. 3a—b. Królik 3 godz. po stresie cieplnym. 3a. Aksony z ziarnistościami (Ax_1) oraz pozbawione ziarnistości (Ax_2); m — obrzmiałe mitochondria. Pow. 9000 \times . 3b. Obszar przynaczyniowy, Ax_1 — akson wypełniony ziarnistościami, Ax_2 — akson pozbawiony ziarnistości; Bv — naczynie krwionośne. Pow. 9000 \times

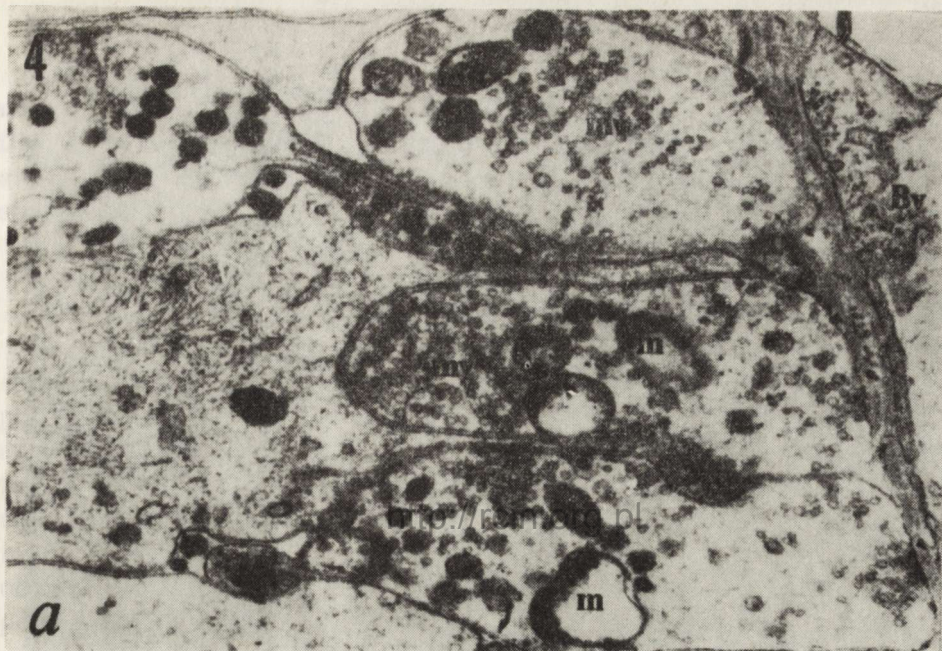


Fig. 4a—b. Rabbit 6 h after heat stress. *4a.* Profiles of axon terminals contain microvesicles (mv) and numerous mitochondria (m) Bv — blood vessel. $\times 22\ 000$.
4b. Autophagic vacuoles within the axon profile. $\times 25\ 000$

Ryc. 4a—b. Królik 6 godz. po stresie cieplnym. *4a.* Profile zakończeń aksonalnych zawierających mikropęcherzyki (mv) i liczne mitochondria (m). Bv — naczynie krwionośne. Pow. $22\ 000 \times$. *4b.* Wakuola autofagowa wewnątrz aksonu. Pow. $25\ 000 \times$



Fig. 5a—b. Rabbit 24 h after heat stress. *5a.* Numerous profiles of the neurohypophysial axons (Ax) devoid of neurosecretory granules; P — pituitocyte. $\times 10\,000$. *5b.* Membranous structures (arrows) within degenerated axons. $\times 9\,000$

Ryc. 5a—b. Królik 24 godz. po stresie cieplnym. *5a.* Liczne profile aksonów (Ax) neuroprzysadki pozbawione ziarnistości neurosekrecyjnej; P — pituicyt. Pow. $10\,000 \times$. *5b.* Błoniaste struktury (strzałki) wewnątrz aksonów pozbawionych ziarnistości. Pow. $9\,000 \times$

The spectrum of progressive alterations in the neurohypophysis was no doubt best displayed in the rabbits 24 h after heat stress. Axon profiles were completely devoid of NSG and microvesicles or contained a few granules (Fig. 5a). Within degranulated axons some membranous structures were found (Fig. 5b).

DISCUSSION

The present results indicate that application of high ambient temperature in rabbits evokes ultrastructural alterations in the neurohypophysis. These include a progressive diminution of NSG resulting in the appearance of degranulated axons. Owing to this the observed preterminal or terminal parts of certain axons exhibited only electron-lucent axoplasmic background. The findings, indicate a physiological involvement of neurohypophysial axons in the processes related to the effects of high ambient temperatures. The question here is, whether the appearance of degranulated axons is the result of an increased release of neurosecretory material.

Physiological data indicate that in mammals heat stress causes a change in the neurohypophysial hormone elaboration, so that the vasopressin secretion is significantly increased (Forsling, Ullmann 1977; Szczepańska-Sadowska 1977). Here, it was ascertained that numerous axons, especially in animals 24 h after heat stress, did not contain NSG. Therefore, it is likely that there was a coincidence between these alterations and the increased vasopressin secretion. Unfortunately, the differentiation between axons associated with vasopressin secretion and those that are not is at present impossible. Nevertheless, a discussion on the problem of increased activity of the axons seems to be reasonable in this paper.

Axons devoid of NSG, but containing some membraneous structures have been noted in chronically dehydrated rats (Polenov et al. 1975). Similarly, degranulated axons were widely observed in poikilothermic vertebrates, especially during reproduction (Diepen 1962; Polenov 1974). According to Polenov et al. (1975) this kind of ultrastructural expression, defined as "light" type of physiological degeneration, is due to the hyperfunction of the hypothalamo-neurohypophysial system and local osmotic disturbances.

On the basis of ultrastructural investigations of the pathological human neurohypophysis Seyama et al. (1980) believe that the degranulated type of axon dilatations represents "intra-axonal pools of readily releasable hormones". On the other hand, the finding of agranulated axons in the neurohypophysis of homozygous Brattleboro rats, which cannot synthesize vasopressin (though the supraoptic and paraventricular neurons are chronically hyperactive) indicates that the absence of NSG

within the axons does not have to be connected with the process of neurohormone release (Tasso, Rua 1978). However, the studies by Norström (1975) strongly suggest the existence of two rates of neurophysin transport velocity as well as granular and extra-granular location of neurosecretory material. Immunocytochemical and morphometric studies on the hypothalamo-neurohypophysial system of long thirsting animals favours the hypothesis that vasopressin is transported in free form in the axoplasm when the animals are stressed (Krisch 1975, 1976).

In the present study we did not detect any other alterations characteristic of an increased activity of neurohypophysial axons, such as increased polymorphism of NSG together with the appearance of optically empty ones or the occurrence of tubular proliferation of axoplasmic reticulum, as for instance those observed in water deprived rats (Loesch 1983a). Only an increased amounts of microvesicles and sporadical occurrence of autophagic vacuoles were perceived in the rabbits directly, and 6 h after exposure to high ambient temperatures, respectively. Thus, the features perceived were not sufficiently clear so that they could significantly be recognized as the expression of several phases of a cyclic activity of the axons. Therefore, we may suppose that, under hyperthermic stress, a violent and progressive release of neurosecretory material (into circulation) from respective axons is evoked.

There are some indications based on ultrastructural characteristics of paraventricular endocrine neurons in various functional states that the periodicity of granule formation within the cell body of the neurons may at the same time be one of the factors controlling axonal flow of neurosecretory material (Yukitake et al. 1977). In this connection it may be suspected that in the course of the present experiment there was a further considerable synchrony of secretory cycles of the cell perikarya. A reflection of this in the neurohypophysis could not have been so much the phenomenon of axon degranulation itself, as its general spectrum, especially in animals that already had been withdrawn from high ambient temperature.

In conclusion, it is difficult to ascertain whether the described features in heat-stressed rabbits are direct results of primary signals coming from thermoregulatory centres or of some other here undefined physiological (pathological?) factors as, for example, possibly less or more developed cerebral ischaemia (Kapuściński, Karczewski 1973; Karczewski et al. 1973; Carlsson et al. 1976). However, even if considering the influence of factors like cerebral ischaemia (and physiological changes linked with it) on the occurrence of such and not another ultrastructural picture, it is worth mentioning that in ischaemic animals the alterations are widely spread and some of them concern several phases of increased activity of the neurohypophysial axons (Loesch 1983b). Nevertheless, it is suggested here that the progressive occurrence of axons free of NSG,

is mainly linked with an increased vasopressin secretion. In these abnormal conditions as described in the present paper, the increase in vasopressin secretion may be of considerable value for survival in that it can help in limitation of renal water loss and consequently prevent dehydration of the animals.

Finally, an important fact that should be taken into account is the well-known phenomenon of mobilization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (CRF-ACTH-adrenal) under stress circumstances. Thus, vasopressin has been proposed as being involved in the pituitary ACTH response to "neurological" stress (Mangili et al. 1966). For instance, in animals with chronic lesions of the hypothalamus an inverse correlation has been found between the release of ACTH and the severity of diabetes insipidus (McCann, Brobeck 1954). Moreover, there are some indications that vasopressin is released in amounts sufficient to stimulate ACTH only in rather severe stress, which can cause release of larger quantities of vasopressin released by injection of hypertonic saline into the carotid (Nichols, Gullemin 1959).

WPLYW WYSOKIEJ TEMPERATURY
NA UKŁAD PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWY KRÓLIKA
II. CZĘŚĆ NERWOWA PRZYSADKI

Streszczenie

Badano ultrastrukturę aksonów przysadki królika po 3-godzinnej ekspozycji na wysoką temperaturę (48—39°C). Wycinki z części nerwowej przysadki pobierano bezpośrednio, 3, 6 i 24 godz. po eksperymencie. Zaobserwowano postępujące zmniejszanie się ilości aksonów zawierających ziarnistości neurosekrecyjne. W 24 godz. po eksperymencie obserwowano liczne aksony pozbawione ziarnistości wypełnione jedynie elektronowo-jasną aksooplazmą. Obserwacje te wskazują na szybkie wydzielanie materiału neurosekrecyjnego z aksonów do krwiobiegu, co jest prawdopodobnie fizjologiczną odpowiedzią na wysoką temperaturę.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ
НА ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНУЮ СИСТЕМУ КРОЛИКА
II. НЕВРОГИПОФИЗ

Резюме

Авторы исследовали ультраструктуру аксонов гипофиза кролика после трехчасовой экспозиции на высокую температуру (38—39°C). Сегменты из неврогипофиза авторы брали тотчас же, 3, 6, и 24, часа после эксперимента. Они наблюдали уменьшение количества аксонов содержащих нейросекрционные грануляции.

Спустя 24 часа после эксперимента наблюдались множественные аксоны наполненные лишь электронно-светлой аксоплазмой (лишенные грануляций). Эти наблюдения указывают на быстрое выделение нейросекрционного материала из аксонов в кровообращение, что вероятно является физиологическим ответом на высокую температуру.

REFERENCES

1. 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. Neurochemistry*, 1976, 26, 1001—1006.
2. Diepen R.: *Der Hypothalamus*. In: *Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Ed. W. Bargmann. Bd. 4. Teil 7, Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1962.
3. Doris P. A.: Vasopressin and the regulation of evaporative water loss and body temperature in the cat. *Brain Res.*, 1982, 251, 127—131.
4. Doris P. A., Baker M. A.: Effect of dehydration on thermoregulation in cats exposed to high ambient temperatures. *J. Appl. Physiol.*, 1981, 40, 46—53.
5. Dunn F. L., Brennan T. J., Nelson A. E., Robertson G. L.: The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J. Clin. Invest.*, 1973, 52, 3212—3219.
6. Forsling M. L., Ullmann E. A.: Non-osmotic stimulation of vasopressin release. In: *Neurohypophysis*. Eds. A. M. Moses, L. Share, Karger, Basel 1977, 128—135.
7. Gajkowska B., Loesch A., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 55—69.
8. Greenleaf J. E., Kozłowski S., Nazar K., Kaciuba-Uściłko H., Brzezińska Z., Ziemia A.: Ion-osmotic hyperthermia during exercise in dogs. *Am. J. Physiol.*, 1973, 230, 74—79.
9. 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.
10. Karczewski W. A., Karczewska E., Rycembel Z.: Thermal polypnoea: response of phrenic nerve activity to hyperthermia and hyperventilation. *IRCS Medical Science*, 1973, 73—12, 12—1—10.
11. Kasting N. W., Veale W. L., Cooper K. E.: Convulsive and hypothermic effects of vasopressin in the brain of the rat. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 1980, 58, 316—319.
12. Kozłowski S., Greenleaf J. E., Turlejska E., Nazar K.: Extracellular osmolality and body temperature during physical exercise in dogs. *Am. J. Physiol.*, 1980, 239, R 180—183.
13. Kozłowski S., Szczepańska-Sadowska E., Drzewiecki K.: Changes in blood vasopressin (ADH) level in man during short-term exposure to high ambient temperature. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 1972, 48, 251—256.
14. Krisch B.: Different population of granules and their distribution in the hypothalamo-neurohypophysial tract of the rat under various experimental conditions. II. The median eminence. *Cell Tissue Res.*, 1975, 160, 231—261.
15. Krisch B.: Immunocytochemical and electron microscopic study of the rat hypothalamic nuclei and cell clusters under various experimental conditions. Possible sites of hormone release. *Cell Tissue Res.*, 1976, 174, 109—127.
16. Lipton J. M., Glyn J. R.: Central administration of peptides alters thermoregulation in the rabbit. *Peptides*, 1980, 1, 15—18.
17. Loesch A.: The neurohypophysial axons in normal and dehydrated rats: an electron microscopic study including ZIO-staining method. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983 a, 61, 321—328.
18. Loesch A.: The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The neurohypophysial axons and pituicytes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983 b, 61, 545—556.

19. McCann S. M., Brodeck J. R.: Evidence for a role of the supraopticohypophysal system in regulation of adrenocorticorophin secretion. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1954, 87, 318—324.
20. Mangili G., Motta M., Martini L.: Control of adrenocorticotropic hormone secretion. In: *Neuroendocrinology*. Eds. L. Martini, W. F. Ganong. Academic Press, New York—London 1966, vol. 1, 297—370.
21. Nichols B. L., Gullemin R.: Endogenous and exogenous vasopressin on ACTH release. *Endocrinology*, 1959, 64, 914—920.
22. Nielsen B.: Effects of changes in plasma Na^+ and Ca^{++} ion concentration on body temperature during exercise. *Acta Physiol. Scand.*, 1974, 91, 123—126.
23. Norström A.: Axonal transport and turnover of neurohypophysal proteins in the rat. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1975, 248, 46—63.
24. Pluta R.: Zmiany temperatury mózgu i wybranych okolic ciała królika oraz jego zachowania w podwyższonej temperaturze otoczenia. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 435—444.
25. Polenov A. L.: On the life way of the secretory cycle of hypothalamic neurosecretory cells. *Arch. Anat. Gistol. Embryol.*, 1974, 67, 5—19.
26. Polenov A. L., Ugrumov M. V., Belenky M. A.: On degeneration of peptidergic neurosecretory fibres in the albino rat. *Cell Tissue Res.*, 1975, 160, 113—123.
27. Šeyama S., Perl G. S., Takei Y.: Ultrastructural study of the human neurohypophysis. I. Neurosecretory axons and their dilatations in the pars nervosa. *Cell Tissue Res.*, 1980, 205, 253—257.
28. Szczepańska-Sadowska E.: Physiological mechanism supressing thirst and enhancing vasopressin release in hyperthermia. *Studia Societatis Scientarium Torunensis*, PWN, Warsaw 1977, 3, 1—11.
29. Tasso F., Rua S.: Ultrastructural observations of the hypothalamo-posthypophysial complex of the Brattleboro rat. *Cell Tissue Res.*, 1978, 191, 267—286.
30. Taylor C. R.: Dehydration and heat: effects on temperature regulation of East African ungulates. *Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 1136—1140.
31. Yukitake Y., Taniguchi Y., Kurosumi K.: Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and the formation of Herring bodies in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell Tissue Res.*, 1977, 1—8.

Authors' address: Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa

ROMAN GADAMSKI, ROMAN LASOCKI

ZMIANY MORFOLOGICZNE ORAZ AKTYWNOŚĆ
FOSFATAZY KWAŚNEJ I PIROFOSFATAZY TIAMINOWEJ
W JĄDRACH TWORU SIATKOWATEGO I JĄDRACH
NEUROSEKRECYJNYCH PODWZGÓRZA U KRÓLIKÓW PODDANYCH
DZIAŁANIU PODWYŻSZONEJ TEMPERATURY OTOCZENIA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Podwyższenie temperatury otoczenia, jako jeden z często oddziałujących na organizm zwierzęcy czynników środowiskowych, w bezpośrednim efekcie prowadzi do podwyższenia wewnętrznej ciepłoty ciała. Jednocześnie podwyższona temperatura wewnętrzna stanowi bodziec stymulujący uruchomienie zachowawczych mechanizmów termoregulacyjnych, a w szczególności tych, które są odpowiedzialne za utratę wody drogą parowania. Przekroczenie progu wydolności tych mechanizmów może być źródłem powstawania niekorzystnych zjawisk w organizmie. Niektóre z nich mogą mieć charakter czynników patologicznych, uszkadzających przede wszystkim tkanki szczególnie wrażliwe na przegrzanie, w tym tkankę nerwową. Wyliczyć tu należy wywołany hipertermią wzrost zużycia tlenu w ośrodkowym układzie nerwowym (Meyer, Handa 1967), wzrost przepuszczalności bariery krew—mózg oraz towarzyszące przegrzaniu pobudzenie akcji oddechowej (Pleschka 1971). Badania Kapuścińskiego i Karczewskiego (1973) oraz Karczewskiego i wsp. (1973) wykazały, że przyspieszenie oddechu wywołane podniesieniem temperatury otoczenia sprzyja rozwojowi hipokapni z następczym skurczem naczyń krwionośnych i rozwijającym się na tym tle ischemicznym niedotlenieniem mózgu.

Celem przedstawionych badań było prześledzenie zmian zachodzących w wyniku przegrzania w neuronach tworzu siatkowatego, pełniącego między innymi rolę ośrodka integrującego procesy oddechowe, oraz w jądrach neurosekrecyjnych podwzgórza.

MATERIAŁ I METODY

Badania morfologiczne przeprowadzono na 10 królikach albinotycznych, obojga płci, o ciężarze ciała 2,6—3,6 kg. Zwierzęta przetrzymywano pojedynczo przez 3 godziny w komorze termicznej, utrzymującej temperaturę w granicach 38—39°C. W trakcie trwania doświadczenia komorę wentylowano powietrzem atmosferycznym o takiej samej temperaturze i wilgotności względnej wynoszącej 45—60%. Zwierzęta wyjęte z komory dzielono na grupy złożone z 2 królików i przenoszono do zwierzętarni. Po przeżyciu 3, 6, 24 i 48 godz. króliki usypiano vetbutalem (30 mg/kg) i wykonywano przezsercową perfuzję 4% zubożoną formaliną, przy jednoczesnym zaciśnięciu tętnicy głównej zstępującej i otwarciu uszka prawego. Dwa króliki nie poddane działaniu podwyższonej temperatury i uśmiercone za pomocą perfuzji wykonanej według tych samych zasad co i u zwierząt doświadczalnych stanowiły materiał kontrolny. Mózgi utrwalano w formalinie, odwadniano w alkoholu i zatapiano w parafinie. Rdzeń przedłużony i most oraz okolice podwzgórza zawierającą jądra neurosekrecyjne (jądro przykomorowe i nadwzrokowe) krojono seryjnie na skrawki grubości 15 μm . Do badań pobierano kolejny piąty i szósty skrawek, z których jeden barwiono fioletem krezylu, natomiast drugi hematoksyliną i eozyną.

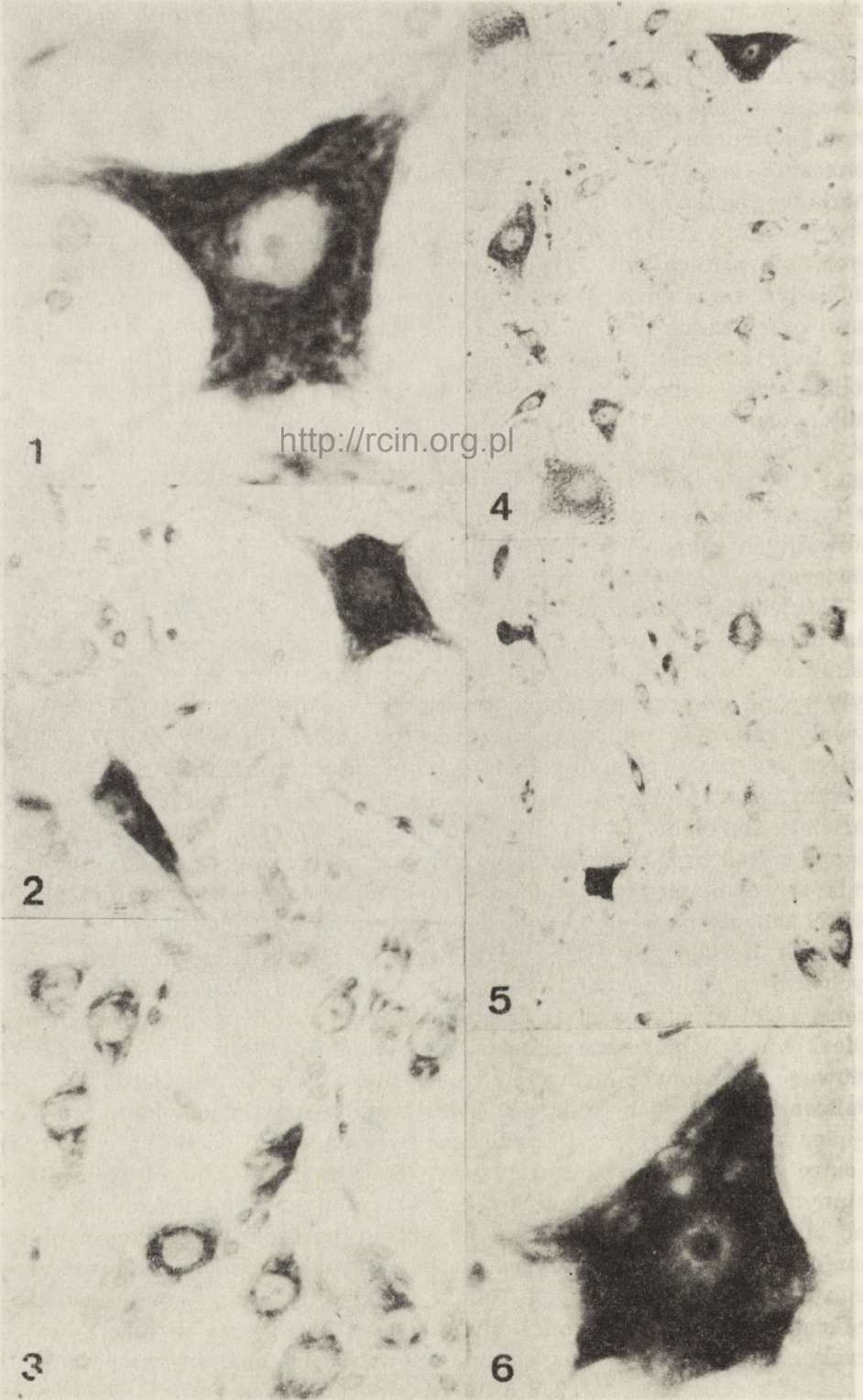
Badania histochemiczne aktywności fosfatazy kwaśnej (FK — fosfataza monoestrów ortofosforanowych, E.C.3.1.3.2.) oraz pirofosfatazy tiaminowej (TPP-aza — fosfohydrolaza pirofosforanu tiaminy E.C.2.5.1.3.) przeprowadzono na 12 królikach. Zwierzęta dekapitowano w czasie „O”, tj. bezpośrednio po wyjęciu z komory termicznej, oraz po przeżyciu 3, 6, 24 i 48 godz. Mózgi dwóch zdrowych zwierząt, nie poddanych działaniu podwyższonej temperatury, stanowiły materiał kontrolny. Wszystkie króliki dekapitowano bez narkozy, a z mózgow pobierano rdzeń przedłużony i okolice podwzgórza z jądrami neurosekrecyjnymi. Błoczki krojono w kriostacie na skrawki grubości 10 μm . Do badań pobierano kolejny piąty i szósty skrawek. Aktywność fosfatazy kwaśnej oznaczano według metody Barki i Andersona (1962), czas inkubacji 1,5 godz., w temperaturze 37°C, natomiast aktywność pirofosfatazy tiaminowej według metody Novikoffa i Goldfischera (1961), czas inkubacji: 2 godz. w temperaturze 37°C. Jądra tworzącego siatkowatego oraz jądra neurosekrecyjne identyfikowano na podstawie atlasu mózgu królika (Blinkow i wsp. 1973).

WYNIKI

Twór siatkowaty królika położony jest w przyśrodkowych, a częściowo w bocznych, okolicach rdzenia przedłużonego, mostu i śródmózgowia. Rozpoczyna się on na wysokości tylnego krańca jądra czerwienego. W tworze siatkowatym królika wyróżnia się 10 struktur anatomicznych,

zróznicowanych na podstawie topograficznego położenia oraz cech morfologicznych tworzących je komórek nerwowych. Z uwagi na rodzaj eksperymentu i założony cel badań, w niniejszej pracy zajmowano się głównie częścią przysrodkową tworzy siatkowatego, w której zlokalizowane są neurony biorące udział w regulacji procesów oddechowych. Anatomicznie część ta zawiera następujące jądra: siatkowate wielkokomórkowe, siatkowate drobnokomórkowe oraz siatkowate mostu przednie i tylne. Jądro siatkowate wielkokomórkowe zbudowane jest z rozproszonych, olbrzymich wielobiegunowych komórek nerwowych, które tylko niekiedy tworzą znaczniejsze zagęszczenia. U zwierząt kontrolnych w bogatej cytoplazmie tych neuronów (ryc. 1) spotyka się grube ziarna tigridu, tworzące nieco większe zagęszczenia wokół jądra komórkowego. Podobnie jądra siatkowate mostu zbudowane są z dużych neuronów, przyjmujących najczęściej kształt wielobiegunowy lub piramidowy (ryc. 2). W ich cytoplazmie widoczne są silnie zagęszczone, drobne ziarna substancji Nissla. Pozostałe anatomiczne struktury tworzy siatkowatego — w tym i jądro siatkowate drobnokomórkowe (ryc. 3) — są utworzone z owalnych komórek nerwowych z biegunowo umieszczoną cytoplazmą zawierającą piankowaty tigroid.

U zwierząt poddanych działaniu podwyższonej temperatury otoczenia obserwowano urozmaicony obraz patomorfologicznych uszkodzeń neuronów tworzy siatkowatego. Rodzaj uszkodzeń, a także ich nasilenie były różne w poszczególnych strukturach tworzy siatkowatego i wykazywały zależność od czasu przeżycia po szoku termicznym. W grupie zwierząt z przeżyciem 3-godzinnym dominującym uszkodzeniem komórkowym była tigroliza o różnym nasileniu. Znaczna liczba neuronów wybarwiała się blado. Obraz ziarnistości Nissla w cytoplazmie był niewyraźny, a kontury komórek słabo zaznaczone (ryc. 4). Tigroliza obejmowała w równomiernym stopniu całą cytoplazmę, chociaż w niektórych neuronach zaznaczały się słabo cechy tigrolizy obwodowej. W populacji komórek nerwowych tworzy siatkowatego, obok neuronów niezmiennych lub ze słabo zaznaczoną tigrolizą, spotykano także komórki obkurczone z ostro zarysowanym konturem, intensywnie wybarwiający się jąderkiem i homogenicznie zabarwioną cytoplazmą (ryc. 4, 5). Wypustki osiowe obkurczonych neuronów miały niekiedy przebieg falisty. W cytoplazmie niektórych komórek jądra siatkowatego wielkokomórkowego i jąder siatkowatych mostu, widoczne były podobnej wielkości wodniczki z ostro zarysowanym konturem (ryc. 6). U zwierząt z przeżyciem 6-godzinnym obserwowano podobny charakter uszkodzeń, aczkolwiek były one słabiej zaznaczone. W 24 i 48 godzin po szoku termicznym obraz morfologiczny neuronów tworzy siatkowatego był podobny do spotykanego u królików kontrolnych. Należy podkreślić, że występujące w tworze siatkowatym uszkodzenia komórkowe zaznaczały się wyraźniej w jądrach zbudowanych z dużych neuronów. Cechą charakterystyczną był



również brak wzmożonego odczynu glejowego oraz brak zmian w obrazie mikroskopowym jądra komórkowego i jego chromatyny.

W obrębie jąder neurosekrecyjnych podwzgórza zwierząt poddanych działaniu podwyższonej temperatury nie obserwowano żadnych cech uszkodzeń komórkowych. W materiale kontrolnym zaznaczał się zróżnicowany stopień intensywności wybarwienia perykarionów jądra przykomorowego (ryc. 7), przy średnio intensywnym i równomiernym wybarwianiu się całej populacji komórek jądra nadwzrokowego (ryc. 8). U zwierząt z przeżyciem 3- i 6-godzinnym wszystkie neurony jądra przykomorowego były wybarwione jednakowo intensywnie (ryc. 9), natomiast w jądrze nadwzrokowym nieco silniej w porównaniu do kontroli (ryc. 10). U zwierząt z przeżyciem 24- i 48-godzinnym obraz mikroskopowy jąder neurosekrecyjnych nie odbiegał od normy.

Odczyn histochemiczny na fosfatazę kwaśną (FK) w materiale kontrolnym był intensywny w jądrach tworu siatkowatego zbudowanych z dużych neuronów i umiarkowany w jądrach utworzonych z małych komórek nerwowych (ryc. 11—13). Zmiany w aktywności tego enzymu obserwowano już w czasie „0”. Pogłębiały się one w 3 godzinie przeżycia i utrzymywały się do 6 godzin po szoku termicznym. We wszystkich tych okresach cechą charakterystyczną, obok podwyższenia aktywności enzymatycznej, był wyraźniejszy rysunek lizosomów oraz wybarwienie się dłuższych, w porównaniu do kontroli, odcinków wypustek nerwowych (ryc. 14—16). Odczyn histochemiczny na TPP-azę w materiale kontrol-

Ryc. 1. Królik kontrolny. Prawidłowy obraz komórki nerwowej jądra siatkowatego wielkokomórkowego. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×

Fig. 1. Control rabbit. Normal picture of nerve cell of *nucleus reticularis magnocellularis*. Cresyl violet. × 400

Ryc. 2. Królik kontrolny. Neurony wielobiegunowe i piramidowe w tylnym jądrze siatkowatym mostu. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 2. Control rabbit. Multipolar and pyramidal neurons in *nucleus reticularis caudalis pontis*. Cresyl violet. × 200

Ryc. 3. Królik kontrolny. Owalne komórki nerwowe z biegunowo rozmieszczoną cytoplazmą w jądrze siatkowatym drobnokomórkowym. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 3. Control rabbit. Oval nerve cells with polarly distributed cytoplasm in *nucleus reticularis parvocellularis*. Cresyl violet. × 200

Ryc. 4. Królik doświadczalny 3 godz. po hipertermii. Zróżnicowany stopień tigrólizy w neuronach jądra siatkowatego wielkokomórkowego. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

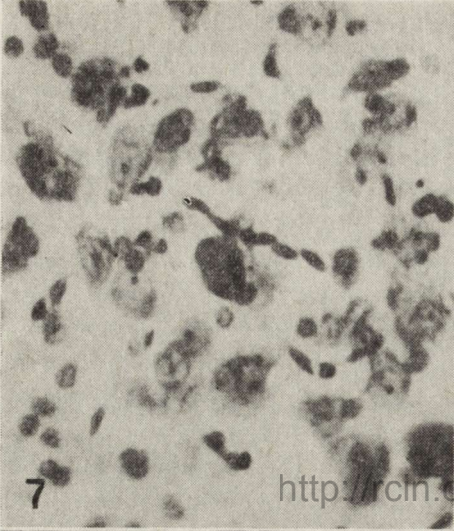
Fig. 4. Experimental rabbit, 3 h after hyperthermia. Varied degree of tigrolysis in neurons of *nucleus reticularis magnocellularis*. Cresyl violet. × 100

Ryc. 5. 3 godz. po hipertermii. Obkurczone neurony z intensywnie wybarwioną cytoplazmą w jądrze siatkowatym drobnokomórkowym. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

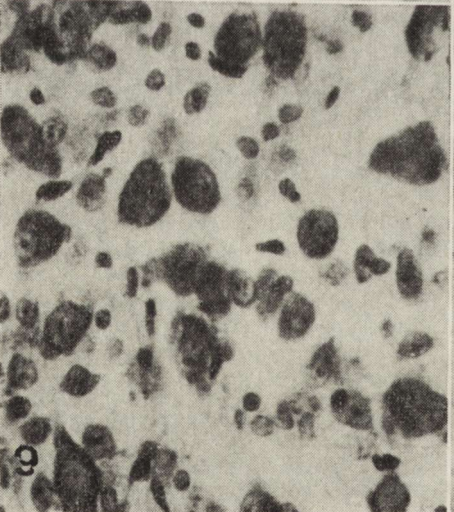
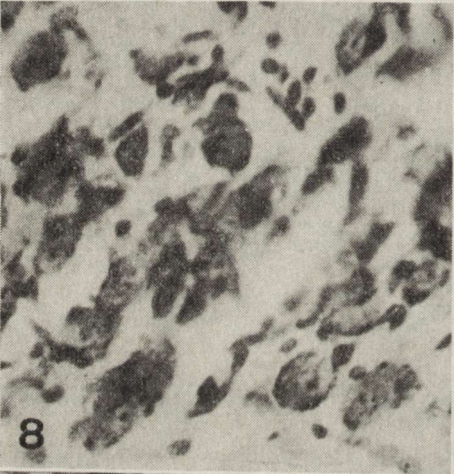
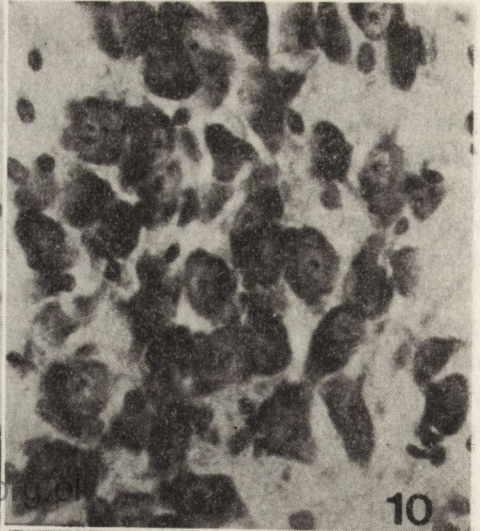
Fig. 5. Three hours after hyperthermia. Shrunken neurons cytoplasm intensively stained in *nucleus reticularis parvocellularis*. Cresyl violet. × 100

Ryc. 6. 3 godz. po hipertermii. Zmiany wodniczkowe w cytoplazmie neuronu z tylnego jądra siatkowatego mostu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×

Fig. 6. Three hours after hyperthermia. Vacuolar changes in cytoplasm of neuron from *nucleus reticularis caudalis pontis*. Cresyl violet. × 400.



<http://rcin.org.pl>



nym ujawniał wyraźny rysunek aparatu Golgiego we wszystkich badanych strukturach nerwowych (ryc. 17). U zwierząt poddanych działaniu podwyższonej temperatury i pozostawionych na krótkie okresy przeżycia („0”, 3 i 6 godz.) obserwowano częściowo dyfuzyjny charakter wybarwienia się aparatu Golgiego, a także gromadzenie się produktu końcowego reakcji, również w obszarach cytoplazmy bardziej oddalonych od jądra komórkowego (ryc. 18). Cechą charakterystyczną obrazu histochemicznego w krótkich czasach przeżycia było podwyższenie aktywności enzymatycznej w naczyniach krwionośnych. W podsumowaniu obserwacji histochemicznych na podkreślenie zasługuje fakt wyraźniejszego występowania zmian aktywności obu badanych enzymów w jądrach tworzących siatkowatego niż w jądrach neurosekrecyjnych podwzgórza.

OMÓWIENIE

<http://rcin.org.pl>

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na fakt, że 3-godzinne przebywanie królików w podwyższonej temperaturze otoczenia wywołuje zróżnicowane zmiany patomorfologiczne oraz zmiany aktywności enzymatycznej fosfatazy kwaśnej i TPP-azy w jądrach tworzących siatkowatego i jądrach neurosekrecyjnych. Zagadnieniem dyskusyjnym jest występowanie w badanym materiale wyraźniejszych nieprawidłowości w komórkach nerwowych tworzących siatkowatego niż w neuronach jądra przykomorowego i nadwzrokowego. Fizjologiczna rola tworzących siatkowatego do chwili obecnej nie jest w pełni wyjaśniona. Zawartym w nim

Ryc. 7. Królik kontrolny. Nierównomierne wybarwienie się komórek nerwowych jądra przykomorowego. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 7. Control rabbit. Nonuniform staining of nerve cells of *nucleus paraventricularis*. Cresyl violet. × 200

Ryc. 8. Królik kontrolny. Komórki nerwowe jądra nadwzrokowego. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 8. Control rabbit. Nerve cells of *nucleus supraopticus*. Cresyl violet. × 200

Ryc. 9. 3 godz. po hipertermii. Równomiernie zabarwione neurony w jądrze przykomorowym. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 9. Three hours after hyperthermia. Uniformly stained neurons in *nucleus paraventricularis*. Cresyl violet. × 200

Ryc. 10. 3 godz. po hipertermii. Komórki jądra nadwzrokowego wybarwione intensywniej w porównaniu do kontroli. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

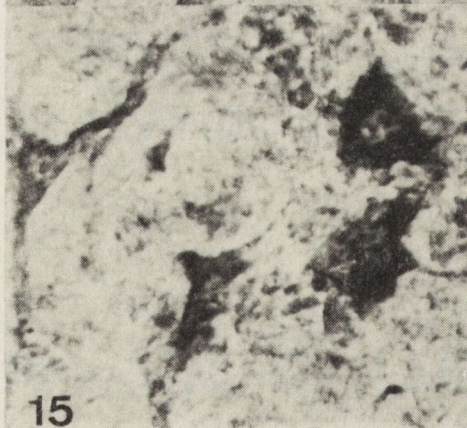
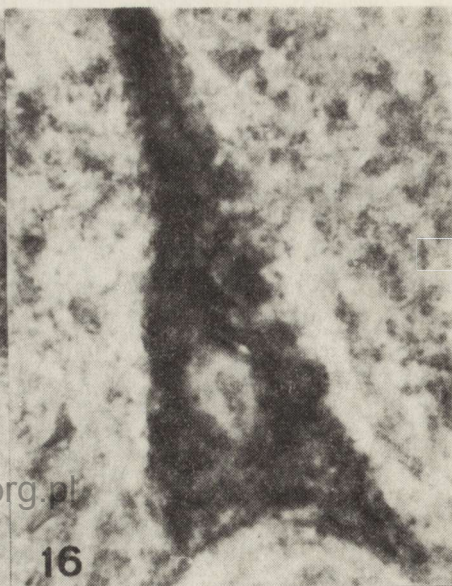
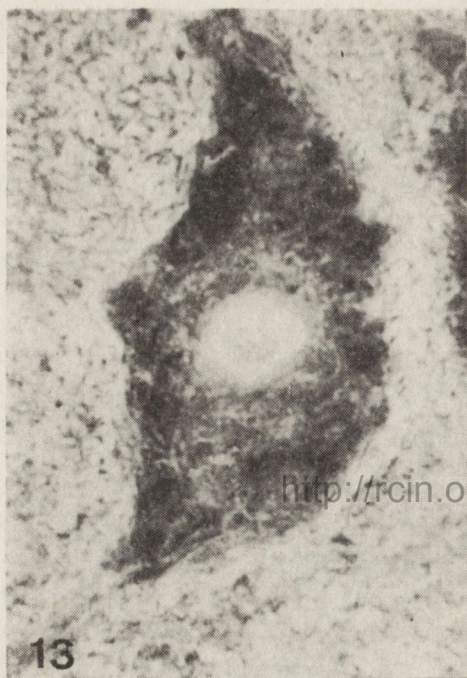
Fig. 10. Three hours after hyperthermia. Cells of *nucleus supraopticus* stained intensively as compared with control. Cresyl violet. × 200

Ryc. 11. Królik kontrolny. Intensywny odczyn na fosfatazę kwaśną w cytoplazmie neuronu z jądra siatkowatego wielkokomórkowego. Pow. 300 ×

Fig. 11. Control rabbit. Intensive acid phosphatase reaction in cytoplasm of neuron of *nucleus reticularis magnocellularis*. × 300

Ryc. 12. Królik kontrolny. Umiarkowany odczyn na fosfatazę kwaśną w neuronach jądra siatkowatego drobnokomórkowego. Pow. 200 ×

Fig. 12. Control rabbit. Moderate acid phosphatase reaction in neurons of *nucleus reticularis parvocellularis*. × 200



<http://rcin.org.pl>

strukturom nerwowym przypisuje się najczęściej funkcje związane z procesami snu i czuwania. Doniesienia z ostatnich lat (Gabdrachmanow 1972; Jakunin i wsp. 1982) wskazują także na udział neuronów przyśrodkowej części tworzącego w integracji funkcji oddechowych. Wyniki podejmowanych prób określenia lokalizacji komórek nerwowych odpowiedzialnych za regulację rytmu oddechowego są często kontrowersyjne (Hukuhara i wsp. 1969; Gabdrachmanow 1972; Euler i wsp. 1973). Występowanie największych skupisk tych neuronów stwierdzono w brzusznej części *nucleus tractus solitarii* (nazywanym grzbietowym jądrem oddechowym) oraz w *nucleus ambiguus* i *nucleus retroambiguus*, określanych mianem jądra oddechowego brzuszego (Bianchi 1971; Euler i wsp. 1973; Kalia i wsp. 1970).

Przy pomocy pobudzania prądem elektrycznym wykryto także obecność neuronów odpowiedzialnych za regulację faz oddechowych w innych strukturach pnia mózgu, a mianowicie w grzbietowo-bocznej nakrywce mostu i w jądrach szwu. Wszystkie te anatomiczne obszary są powiązane między sobą licznymi ipsi- i kontralateralnymi połączeniami nerwowymi, z których znaczna część znajduje swoje zakończenie w neuronach zlokalizowanych w przyśrodkowej części tworzącego wiatkowatego. Z tej części tworzącego wiatkowatego biorą początek nieskrzyżowane drogi zstępujące, biegnące w powrózkach bocznych i brzusznych. Kończą się one w dolnych segmentach szyjnych oraz w segmentach piersiowych rdzenia

- Ryc. 13. Królik kontrolny. Intensywny odczyn na fosfatazę kwaśną w cytoplazmie neuronu tylnego jądra wiatkowatego mostu. Pow. 600 ×
- Fig. 13. Control rabbit. Intensive reaction of acid phosphatase in cytoplasm of neuron of *nucleus reticularis caudalis magnocellularis pontis*. × 600
- Ryc. 14. 3 godz. po hipertermii. Podwyższona aktywność fosfatazy kwaśnej w komórkach nerwowych jądra wiatkowatego wielkokomórkowego. Pow. 200 ×
- Fig. 14. Three hours after hyperthermia. Enhanced acid phosphatase activity in nerve cells of *nucleus reticularis magnocellularis*. × 200
- Ryc. 15. 3 godz. po hipertermii. Podwyższona aktywność fosfatazy kwaśnej w neuronach jądra wiatkowatego drobnokomórkowego. Pow. 300 ×
- Fig. 15. Three hours after hyperthermia. Enhanced activity of acid phosphatase in neurons of *nucleus reticularis parvocellularis*. × 300
- Ryc. 16. 3 godz. po hipertermii. Silna aktywność fosfatazy kwaśnej z wyraźniejszym w porównaniu do kontroli rysunkiem lizosomów. Pow. 600 ×
- Fig. 16. Three hours after hyperthermia. High acid phosphatase activity with more pronounced lysosome pattern as compared with control. × 600
- Ryc. 17. Królik kontrolny. Intensywny odczyn na TPP-azę w aparacie Golgiego neuronów tylnego jądra wiatkowatego mostu. Pow. 200 ×
- Fig. 17. Control rabbit. Intensive reaction to TPP-ase in Golgi apparatus of neurons of *nucleus reticularis caudalis pontis*. × 200
- Ryc. 18. 3 godz. po hipertermii. Intensywny, dyfuzyjny odczyn na TPP-azę w komórkach jądra wiatkowatego wielkokomórkowego oraz podwyższona aktywność enzymu w naczyniach krwionośnych. Pow. 200 ×
- Fig. 18. Three hours after hyperthermia. Intensive diffusion reaction to TPP-ase in cells of *nucleus reticularis magnocellularis* and enhanced enzyme activity in blood vessels. × 200

kręgowego, z których między innymi biorą początek nerwy międzyzębrowe unerwiające mięśnie międzyzębrowe zewnętrzne i wewnętrzne. Wspomniana obecność licznych połączeń struktur oddechowych pnia mózgu z neuronami przyśrodkowej części tworzącego siatkowatego, a za jego pośrednictwem z neuronami oddechowymi rdzenia kręgowego (Andersen, Sears 1970), stanowi podstawę do rozpatrywania tej części tworzącego jako ośrodka odpowiedzialnego za rytmogenezę i regulację funkcji oddechowych (Keder-Stepanova, Ponomarew 1965; Gabdrachmanow 1972; Jakunin, Kireewa 1978). Przyśrodkowej części tworzącego siatkowatego przypisuje się również rolę ośrodka integrującego czynność nerwową wszystkich struktur anatomicznych, w których zlokalizowane są neurony związane z czynnością oddechową (Euler i wsp. 1973; Merrill 1974; Kalia i wsp. 1979). Przytoczone dane anatomiczne, a także wyniki badań fizjologicznych, ułatwiają interpretację uzyskanych przez nas wyników.

Podwyższenie temperatury otoczenia uruchamia w pierwszym rzędzie zachowawcze mechanizmy termoregulacyjne, a przede wszystkim te, które odpowiedzialne są za utratę wody drogą parowania. W naszych badaniach przeprowadzonych na królikach taki mechanizm termoregulacji wydaje się mało efektywny, ten bowiem gatunek zwierząt ma stosunkowo małą liczbę gruczołów potowych rozmieszczonych jedynie w niektórych rejonach skóry (nosowa część trzewioczaszki i opuszki palców). Te właściwości gatunkowe wydają się uzasadniać „bezcelowość” aktywowania tych mechanizmów termoregulacji, które mogłyby być odpowiedzialne za rozszerzenie skórnych naczyń krwionośnych. Przemieszczenie na obwód ciała pewnej objętości krwi w warunkach braku chłodzenia skóry drogą parowania mogłoby prowadzić nie do utraty ciepła, lecz jego akumulacji. Jeżeli przyjmie się, że jądra neurosekrecyjne podwzgórza mogą być włączone w proces termoregulacji odbywający się na zasadzie złożonych mechanizmów związanych z rozszerzeniem naczyń skórnych i przemieszczaniem krwi na obwód, to brak w naszym materiale wykładników uszkodzeń patomorfologicznych w tych jądrach wydaje się uzasadniony.

Przyczyny pojawiania się zmian patologicznych w jądrach tworzącego siatkowatego, a także dynamikę ich ustępowania w dłuższych czasach przeżycia zwierząt (24 i 48 godz.), należy rozpatrywać wieloetapowo. Za czynnik inicjujący wystąpienia tych zmian można przyjąć znaczne przyspieszenie rytmu oddechowego towarzyszące stanom przegrzania. Zwiększona częstotliwość akcji oddechowej musi więc znajdować przyczynę w podwyższonej impulsacji neuronów oddechowych, połączonej z aktywnością wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych. Innym czynnikiem mogącym mieć znaczenie w patogenezie obserwowanych zmian jest obniżenie ciśnienia cząsteczkowego dwutlenku węgla we krwi tętniczej, które w warunkach hipertermii stwierdzili Albers (1961) oraz Euler

i wsp. (1970). Badania 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 cząsteczkowym ciśnieniu dwutlenku węgla we krwi tętniczej, obniża wtórnie to ciśnienie, co w następstwie prowadzi do skurczu naczyń mózgowych i rozwijającego się na tym tle niedokrwienia mózgu. Carlsson i wsp. (1967) obserwowali natomiast, towarzyszące przegrzaniu, postępujące obniżenie ciśnienia cząsteczkowego tlenu we krwi tętniczej. W świetle przytoczonych danych można przyjąć następującą sekwencję czynników patologicznych, w rezultacie których pojawiają się obserwowane przez nas uszkodzenia komórek nerwowych: 1) przyspieszenie procesów metabolicznych oraz zwiększone zużywanie tlenu przez nadmiernie pobudzone neurony odpowiedzialne za przyspieszenie rytmu oddechowego; 2) niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego spowodowane skurczem naczyń mózgowych, wywołanym przez zmniejszone ciśnienie cząsteczkowe CO₂ we krwi tętniczej; 3) niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego w wyniku postępującego spadku ciśnienia cząsteczkowego O₂ we krwi. Na tej drodze u zwierząt poddanych działaniu wysokiej temperatury, obok niedotlenienia ischemicznego, rozwijać się może niedotlenienie typu hipoksyjnego.

Obserwowane przez nas zmiany znalazły swój wyraz w zróżnicowanym obrazie patomorfologicznym. Obok neuronów o wyglądzie prawidłowym spotykano komórki z różnym nasileniem tigrolizy, neurony obkurczone noszące cechy schorzenia przewlekłego oraz neurony ze zmianami wodniczkowymi sugerującymi zaburzenia wewnątrzkomórkowej gospodarki wodnej. Taka rozpiętość uszkodzeń uwarunkowana jest prawdopodobnie odmienną wrażliwością neuronów tworzących siatkowatego na przegrzanie. Świadczy także o tym, że neurony tego tworzenia, obok zadań integracji procesu oddechowego, pełnią również inne funkcje fizjologiczne, na które hipertermia jako czynnik patologiczny ma mniejszy wpływ.

Największy wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej przypadał na okres największego nasilenia zmian chromatolitycznych (3 godziny przeżycia po szoku termicznym). Może on być traktowany jako wykładnik zwiększenia ilości lizosomów w komórce nerwowej, jak również aktywizacji procesów katabolicznych (Szumańska, Rap 1971). Utrzymywanie się podwyższonej aktywności tego enzymu w 6 godzinie przeżycia, a więc w czasie rozpoczynającego się cofania zmian chromatolitycznych, można wiązać z jego udziałem w odbudowie rybonukleoprotein (substancji Nissla) jako przekaźnika grup fosforanowych.

Stwierdzony przez nas wzrost aktywności TPP-azy może być przejawem zarówno uszkodzenia aparatu Golgiego i łatwiejszym kontaktem enzymu z substratem, jak i zwiększonej produkcji enzymu. Za uszkodzeniem tego aparatu w hipertermii przemawia dyfuzyjny odczyn na TPP-

-azę obserwowany w 3 i 6 godzinie przeżycia. Jednakże z uwagi na fakt, że strefa Golgiego bierze udział w wydzielaniu oraz w przemianie wielocukrów związanej z metabolizmem glukozy, może też mieć miejsce zwiększona synteza tego enzymu. Za takim poglądem przemawia występujące w hipertermii zaktywizowanie wewnątrzkomórkowych procesów metabolicznych. Większą intensywność odczynu histochemicznego w naczyniach krwionośnych w krótkich czasach przeżycia łączyć należy raczej ze skurczem tych naczyń, a tym samym większą koncentracją produktu końcowego reakcji, niż z rzeczywistym wzrostem aktywności TPP-azy.

WNIOSKI

1) Hipertermia, wywołana 3-godzinnym przebywaniem królików w podwyższonej temperaturze otoczenia, prowadzi do wystąpienia uszkodzeń patomorfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym oraz powoduje zwiększenie aktywności fosfatazy kwaśnej i TPP-azy.

2) Nieprawidłowości morfologiczne i histochemiczne są zdecydowanie bardziej nasilone w jądrach przysiódkowej części tworu siatkowatego niż w jądrach neurosekrecyjnych podwzgórza.

3) Wszystkie obserwowane zmiany mają charakter przejściowy i ustępują w okresie między 6 a 24 godziną przeżycia zwierzęcia po szoku termicznym.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ И АКТИВНОСТЬ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ И ТИАМИНОВОЙ ПИРОФОСФАТАЗЫ В ЯДРАХ РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ И НЕЙРОСЕКРЕТОРНЫХ ЯДРАХ ГИПОТАЛАМУСА У КРОЛИКОВ ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖЕНИЯ

Резюме

Кролики-альбиносы обоих полов были помещены на протяжении 3 часов в термическую камеру, сохраняющую температуру 38—39°C и относительную влажность в пределах 45—60%. Животных убивали во время „0” и на 3, 6, 24 и 48 часах после термического шока. Из продолговатого мозга, моста и области гипоталамуса, содержащей нейросекреторные ядра, приготовлялись 15 им срезы, которые окрашивались крезольным фиолетом и гематоксилиной-эозином. Определено тоже активность кислой фосфатазы и тиаминпирофосфатазы.

У животных подверженных влиянию повышенной температуры наблюдались разнообразные повреждения нейронов, проявлением которых был тигролиз, реже сжатие нейронов и иногда наличие вакуолей в цитоплазме. Эти повреждения были более отчетливы в ядрах ретикулярной формации чем в нейросекреторных ядрах. Рост активности кислой фосфатазы и тиаминовой пирофосфатазы, наблюдаемый на 3 и 6 часах был также отчетливее в структурах ретикулярной формации чем в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах.

MORPHOLOGICAL CHANGES AND ACID PHOSPHATASE AND THIAMINE
PYROPHOSPHATASE ACTIVITY IN RETICULAR FORMATION NUCLEI
AND NEUROSECRETIVE NUCLEI OF THE HYPOTHALAMUS IN RABBITS
SUBJECTED TO ENVIRONMENT HYPERTHERMIA

Summary

Albinotic rabbits of both sexes were kept for 3 hours in a thermic chamber with temperature of 38–39°C and relative humidity within the limits of 45–60 per cent. The animals were sacrificed at zero time and 3, 6, 24 and 48 h after undergoing thermal shock. The medulla oblongata, pons and the subthalamic region including neurosecretive nuclei were cut into 15 µm sections, and stained with cresyl violet and hematoxyline and eosine. Acid phosphatase (AP) activity was determined after Barka and Anderson (1962), whereas thiamine pyrophosphatase (TPP-ase) by the method of Novikoff and Goldfischer (1961).

In the animals subjected to hyperthermia a varied picture of pathomorphological neuronal lesions was observed, represented by tigrolysis, shrinking of the neurons and sometimes the presence of vacuoles in the cytoplasm. The lesions were more pronounced in the reticular formation nuclei than in the neurosecretive ones. An enhanced AP and TPP-ase activity was noted in animals surviving 3 and 6 h. It was more pronounced in the structures of the reticular formation than in the paraventricular and the supraoptic nucleus.

PIŚMIENNICTWO

1. Albers C.: Der Mechanismus des Warmchecheln beim Hund. III. Die CO₂ Empfindlichkeit des Atemzentrums während des Warmchecheln. *Pflueger. Arch. Ges. Physiol.*, 1961, 274, 166–183.
2. Andersen P., Sears T.: Medullary activation of intercostal fusimotor and α-motoneurons. *J. Physiol.*, 1970, 209, 739–755.
3. Barka T., Anderson P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 741–753.
4. Bianchi A. L.: Localisation et etude des neurones respiratoires bulbaires. Mise en jeu antidromique par stimulation spinale ou vagale. *J. Physiol.*, 1971, 63, 5–40.
5. Blinkow S. M., Brazowska F. A., Pucillo M. B.: Atlas mozga krolika. *Izdatielstwo „Miedzycyna”, Moskwa 1973.*
6. Carlsson C., Hagerdal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1967, 26, 1001–1006.
7. Euler V. C., Herrero F., Wexler I.: Control mechanisms determining rate and depth of respiratory movements. *Respir. Physiol.*, 1970, 10, 93–108.
8. Euler V. C., Hayward J. N., Marttila I., Wyman R. J.: Respiratory neurones of the ventrolateral nucleus of the solitary tract of cat: vagal input, spinal connections and morphological identification. *Brain Res.*, 1973, 61, 1–22.
9. Gabdrachmanow R. Sz.: Rol medialnoj zony prodołgowatiego mozga w ritmiczeskoj diejatielnosti niejronow dichatielnogo centra. *Fizjol. Żurn. SSSR*, 1972, 58, 1514–1519.
10. Grieb P., Karczewski W. A.: Changes in the CSF lactates in hyperthermic, hypocapnic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, (73–78), 12–1–12.

11. Grieb P., Karczewski W. A., Sroczyńska K.: Respiratory responses to hyperthermia in normocapnic rabbits. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—78), 12—1—11.
12. Hukuhara T., Saji Jr. Y., Kumadaki N.: Die Lokalisation von Atemssyndrom entstandenen Neuronen in der retikulären Formation des Hirnstammes der Katze unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. *Arch. Pharmacol. Exp. Pathol.*, 1969, 263, 462—484.
13. Jakunin W. E., Kireewa N. J.: Reakcji niejronow latieralnoj zony dychatielnogo centra na lokalnyje razdrażenija ego miedialnoj zony. *Fizjol. Žurn. SSSR*, 1978, 64, 205—212.
14. Jakunin W. E., Majskij W. A., Prieobrażenskij N. N., Gokin A. P., Sawoskina L. A.: Izuczenje swiaziej dichatielnych jader stwoła mozga s ispożowanijem mietoda retrogradnogo aksonnogo transporta pieroksydazy chriena. *Niejrofiziologia*, 1982, 14, 149—155.
15. Kalia M., Feldman J. L., Cohen M. I.: Afferent projections to the inspiratory neuronal region of the ventrolateral nucleus of the tractus solitarius in the cat. *Brain Res.*, 1979, 169, 135—141.
16. Kapuściński A., Karczewski W. A.: The effects of hyperventilation on the cerebral blood flow in normo- and hyperthermic rabbits. *IRC Medical Science*, 1973, (73—11), 11—1—22.
17. Karczewski W. A., Karczewska E., Rycembel Z.: Thermal polypnoea: response of phrenic nerve activity to hyperthermia and hyperventilation. *IRCS Medical Science*, 1973, (73—78), 12—1—12.
18. Keder-Stepanowa I. A., Ponomarew W. A.: Reakcji niejronow oblasti dichatielnogo centra na razdrażenje miedialnoj zony prodołgowatego mozga. *Biofizika*, 1965, 10, 234—333.
19. Merrill E. G.: Preliminary studies on nucleus retroambigialis — nucleus of the solitary tract interactions in cat. *J. Physiol.*, 1974, 244, 54—55.
20. Meyer J. S., Handa I.: Cerebral blood flow and metabolism during experimental hyperthermia. *Minn. Med.*, 1967, 50, 37—44.
21. Novikoff A. B., Goldfischer S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytologic studies. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1961, 47, 802—810.
22. Pleschka K.: Interaction of CO₂ and thermal stimuli in panting. *J. Physiol. (Paris)*, 1971, 63, 383—386.
23. Szumańska G., Rap Z.: Rozmieszczenie glikogenu i aktywność niektórych enzymów w motoneuronach rdzenia kręgowego w zwyrodnieniu osiowym. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 111—126.

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

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI

PRÓBY FARMAKOLOGICZNEGO PRZECIWDZIAŁANIA
ROZWOJOWI ZMIAN NIEDOKRWIENNYCH W MÓZGU KRÓLIKÓW
PO JEGO CAŁKOWITYM NIEDOKRWIENIU

<http://rcin.org.pl>

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Wyniki badań doświadczalnych uzyskane w okresie ostatniego dziesięciolecia wykazały w sposób jednoznaczny, iż w warunkach normotermicznych możliwy jest powrót samoistnej i wzbudzonej czynności bioelektrycznej mózgu po jego całkowitym niedokrwieniu, trwającym do 60 min (Hossman, Zimmerman 1974; Kolata 1979; Pluta, Kapuściński 1980; Pluta 1982; Kapuściński, Mossakowski 1983). Stwierdzono ponadto, że nawet po tak długotrwałym niedokrwieniu możliwa jest normalizacja niektórych przynajmniej tkankowych procesów metabolicznych (Hossman i wsp. 1973; Kleihues i wsp. 1975; Nordström i wsp. 1978; Siesjö 1981; Pulsinelli i wsp. 1982). Spostrzeżenia te, w związku z ich zasadniczą niezgodnością z ugruntowanymi poglądami klinicznymi o wyjątkowej wrażliwości mózgu na niedotlenienie (Black 1978), skłoniły szereg autorów do poszukiwań wyjaśnienia mechanizmów zjawisk i procesów patologicznych towarzyszących niedokrwieniu mózgu, które mogłyby współuczestniczyć w rozwoju jego nieodwracalnych uszkodzeń (Klatzo 1975; Flam i wsp. 1978; Faber i wsp. 1981; Astrup i wsp. 1981; Raichle 1983). Otworzyły one również nadzieję stosowania skutecznej terapii przeciwdziałającej ich rozwojowi (Plum 1981; Hass 1981; Wolfe 1982; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Steen i wsp. 1983).

Cechą charakterystyczną większości stosowanych modeli doświadczalnych całkowitego niedokrwienia mózgu jest fakt, iż wymagają one wykonania rozległego zabiegu operacyjnego, związanego między innymi z otwarciem klatki piersiowej w celu dotarcia do tętnic doprowadzających krew do ośrodkowego układu nerwowego. Niezbędne jest również wykonanie tracheotomii dla prowadzenia kontrolowanej wentylacji płuc u farmakologicznie zwiótczonych zwierząt. Podczas doświadczeń rejestru-

je się w sposób ciągly lub okresowy szereg zmiennych fizjologicznych, takich jak czynność bioelektryczna kory mózgu i serca, ciśnienie tętnicze krwi, mózgowy przepływ krwi i inne. Większość z tych pomiarów wiąże się z dodatkowym urazem, obciążającym stan badanego zwierzęcia. Stwarza to warunki, w których prowadzenie przewlekłych badań jest technicznie wysoce skomplikowane, a niejednokrotnie wręcz niemożliwe. Z tego też powodu badania w tym zakresie mają w większości przypadków charakter doświadczeń ostrych, w których okres obserwacji zwierząt nie przekracza 6—9 godzin (Kolata 1979; Pluta, Kapuściński 1980; Pluta 1982; Kapuściński, Mossakowski 1983).

Zatrzymanie dopływu krwi do mózgu wywołuje głębokie układowe zaburzenia hemodynamiczne, prowadzące nierzadko do niewydolności serca, ciężkiej hipotensji, a w niektórych przypadkach do obrzęku płuc (Kapuściński i wsp. 1980; 1981; Pluta 1982). Zjawiska te uruchamiają mechanizm błędnego koła, gdyż przyczynowo związane z niedokrwieniem mózgu, wtórnie pogłębiają jego uszkodzenie, ograniczając przeżycie zwierząt, a tym samym uniemożliwiając długotrwałe śledzenie dynamiki zmian w niedokrwionym mózgu. Z tego też względu zagadnieniem o zasadniczym znaczeniu w badaniach nad skutkami całkowitego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego jest przeciwdziałanie rozwojowi zaburzeń ze strony układu krążenia. Równie istotnym czynnikiem ograniczającym restytucję czynności ośrodkowego układu nerwowego po niedokrwieniu jest rozwój obrzęku mózgu. Przeciwdziałanie jego wystąpieniu stwarza warunki dłuższej obserwacji zmian.

Dotychczasowe badania elektrofizjologiczne nad skutkami całkowitego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, prowadzone w Zakładzie Neuropatologii CMDiK PAN, dotyczyły głównie zagadnienia powrotu czynności bioelektrycznej mózgu i stopnia jej normalizacji w funkcji czasu. Z przyczyn podanych powyżej w mniejszej mierze odnosiły się do zmian późnych. Wydawało się przeto celowe podjęcie badań nad skutkami całkowitego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego przy dłuższym okresie obserwacji. Wymagało to zastosowania wydajnej osłony farmakologicznej, zapobiegającej czynnościowym i strukturalnym uszkodzeniom układu krążenia i rozwojowi wczesnego obrzęku mózgu.

Celem przedstawionej pracy była ocena farmakologicznego przeciwdziałania rozwojowi zmian w ośrodkowym układzie nerwowym i zaburzeń układu krążenia podczas 30-minutowego całkowitego niedokrwienia i w okresie po przywróceniu krążenia w mózgu. Szczegółowe zadania obejmowały ocenę dynamiki zmian czynności bioelektrycznej kory mózgu i tkankowych uszkodzeń strukturalnych podczas 24-godzinnej obserwacji zwierząt przy ograniczeniu reakcji hipertensyjnej, zapobieganiu rozwojowi obrzęku mózgu i utrzymywanie prawidłowego pH krwi w okresie poischemicznym.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 9 królikach rasy mieszanej, samcach o średniej masie ciała $2,85 \pm 0,09$ kg, w dożylnym uśpieniu pentobarbitem, stosowanym w dawce 35 mg/kg masy ciała. W tchawicy umieszczano rurkę tracheotomijną, a obie tętnice udowe cewnikowano dla prowadzenia pomiaru ciśnienia krwi i pobierania próbek do pomiarów gazometrycznych. Cewnikowano również dwie żyły udowe w celu podawania leków. Dla ciągłego zapisu czynności bioelektrycznej kory mózgu, przez otwory wywiercone w okolicy ciemieniowej i czołowej czaszki, umocowywano w styczności z oponą twardą dwie srebrne elektrody kuliste. Elektrokardiogram rejestrowano przy użyciu elektrod igłowych, wkłutych do prawej przedniej i lewej tylnej kończyny („drugie odprowadzenie kończynowe”).

Elektrokortykogram (ECoG) i elektrokardiogram (EKG) rejestrowano za pomocą elektroencefalografu Reega VIII (Alvar). Pomiar ciśnienia tętniczego prowadzono przy zastosowaniu przetwornika ciśnienia Stadham P23 i elektromanometru EK4 (Farum). ECoG, EKG i wartości ciśnienia krwi zapisywano równocześnie w sposób ciągły na poligrafie Recorder 360 (Medipan), stosując dla stworzenia korzystniejszych warunków odczytu i analizy krzywych, dwie szybkości przesuwu papieru rejestracyjnego — 0,5 mm/s i 20 mm/s. Zapis ECoG w okresie recyrkulacji krwi w mózgu oceniano na podstawie amplitudy (szczyt do szczytu) oraz częstotliwości fal i wyrażano jako odsetek wartości kontrolnych. Analizowano również czas powrotu pierwszych objawów czynności bioelektrycznej kory mózgu i aktywności ciągłej po niedokrwieniu, czas utrzymywania się optymalnej, w warunkach doświadczenia, aktywności i okres jej pogorszenia.

Zwierzęta zwiózczano przez dożylną podanie Flaxedilu (4 mg/kg masy ciała) i stosowano kontrolowaną wentylację pompą oddechową firmy Medipan, współpracującą z aparatem do znieczulenia wziewnego Mini—Max (Farum).

Całkowite niedokrwienie mózgowia wywoływano przez zamknięcie tętnic doprowadzających krew do mózgu, w miejscu ich odejścia od łuku aorty, z cięcia nad mostkiem oraz równoczesne obniżenie ciśnienia tętniczego krwi do wartości 70 mm Hg przy użyciu środka ganglioplegicznego — Arfonadu (Roche). Na pień ramiennie-głowy oraz lewą tętnicę podobojczykową zakładano podwiązki, które zaciskano w dalszym etapie doświadczenia. Na obie tętnice kręgowy zakładano klipsy Yasargila, natomiast obie tętnice piersiowe wewnętrzne i pachowe podwiązywano na stałe. Po zakończeniu rejestracji wyjściowych ECoG i EKG podawano dożylnie heparynę w dawce 150 j.m./kg masy ciała. Ciśnienie krwi obniżano do poziomu 50—60 mm Hg przez ciągłą infuzję dożylną Arfonadu w stężeniu 12,5 mg/ml za pomocą pompy infuzyjnej o zmiennej pręd-

kości. Po uzyskaniu pożądanej wartości ciśnienia krwi zamykano dopływ krwi do mózgu, zwiększając równocześnie szybkość infuzji Arfonadu dla zapobieżenia reakcji hipertensyjnej, charakterystycznej dla wczesnego okresu niedokrwienia mózgu. Zakończenie infuzji Arfonadu następowało w początkowym okresie niedokrwienia z chwilą, gdy ciśnienie osiągało stabilnie wartość 70 mm Hg. Nie stosowano upustu krwi. Czas całkowitego niedokrwienia wyniósł 30 min. Przywrócenie krążenia uzyskiwano przez udrożnienie tętnic doprowadzających krew do mózgu. Potwierdzeniem całkowitego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego było zatrzymanie przepływu krwi w tętnicach dna oka, obserwowanych przez mikroskop chirurgiczny. U 3 zwierząt, u których podczas niedokrwienia ciśnienie obniżało się poniżej 60 mm Hg, podawano infuzję dekstranu o ciężarze cząsteczkowym 40.000. U wszystkich zwierząt stosowano następujące leki:

1) Tris (Fresenius A. G., Bad Homburg), w postaci roztworu zawierającego w 1 l 36,34 g Trometamolu, 1,754 g NaCl i 0,373 g KCL, podawanego w dawce 10 ml/kg masy ciała. Dożylną infuzję preparatu rozpoczynano w 10 min przed zakończeniem niedokrwienia mózgu i prowadzono ją przez 20 min.

2) Mannitol (Polfa), w 20% roztworze w łącznej dawce 20 ml, którego dożylnie podawanie rozpoczynano na 5 min przed zakończeniem niedokrwienia i prowadzono przez 10 min.

3) Levonor (Polfa), w postaci roztworu zawierającego 5 mg noradrenaliny w 20 ml 0,9% chlorku sodu, podawanego w postaci ciągłej infuzji dożylną o zmiennej prędkości. Za jego pomocą, przed udrożnieniem tętnic doprowadzających krew do mózgu, podnoszono ciśnienie tętnicze do wartości 150 mm Hg i kontynuowano infuzję do czasu powrotu ciśnienia krwi utrzymywanego samoistnie na poziomie wartości kontrolnych.

Podczas pierwszej godziny po przywróceniu krążenia w mózgu zwierzęta wentylowano mieszaniną zawierającą 60% tlenu i 40% azotu, w późniejszym okresie stosowano wyłącznie powietrze pokojowe. Pomimo powrotu spontanicznej czynności oddechowej ze względu na otwartą klatkę piersiową zwierząt do końca doświadczeń prowadzono kontrolowaną wentylację płuc. Okresowo odsysano tchawicę i duże oskrzela oraz rozprężano płuca stosując dodatnie ciśnienie końcowo wydechowe celem niedopuszczenia do niedodmy, a w konsekwencji do zaburzeń wymiany gazowej.

W czasie 24 godz. po przywróceniu krążenia krwi w mózgu, kontrolowano pH krwi tętniczej, podając w razie potrzeby dodatkowe ilości Trisu lub dwuwęglanów. Przeprowadzono również oznaczenia pO_2 , pCO_2 , BE i HCO_2 , używając aparatu Astrupa BMS₃ (Radiometr). Określano również hematokryt tętniczy.

Po ustaniu działania środka zwiotczającego badano również zachowanie niektórych reakcji odruchowych, takich jak odruch rogówkowy,

reakcja źrenic na światło i reakcja na ból. Zwierzęta odżywiano i nawadniano parenteralnie, podając pod kontrolą diurezy, ocenianej na podstawie zbiórki moczu, 5% glukozę i fizjologiczny roztwór chlorku sodu. Utrzymywano stałą ciepłotę ciała przez podgrzewanie poduszką elektryczną. Temperaturę ciała mierzono w rectum.

Obserwacje zwierząt kończono w następujących przedziałach czasowych: 24 godz. (n=5), 27,5 godz. (n=1), 16 godz. (n=1), 7 godz. (n=1), 2,5 godz. (n=1).

Na zakończenie doświadczeń wykonywano przyżyciową perfuzję naczyń domózgowych fizjologicznym roztworem chlorku sodu przez okres 1 min, a następnie 10% formaliną w 0,9% roztworze NaCl, pod ciśnieniem nie przekraczającym 110 mm Hg.

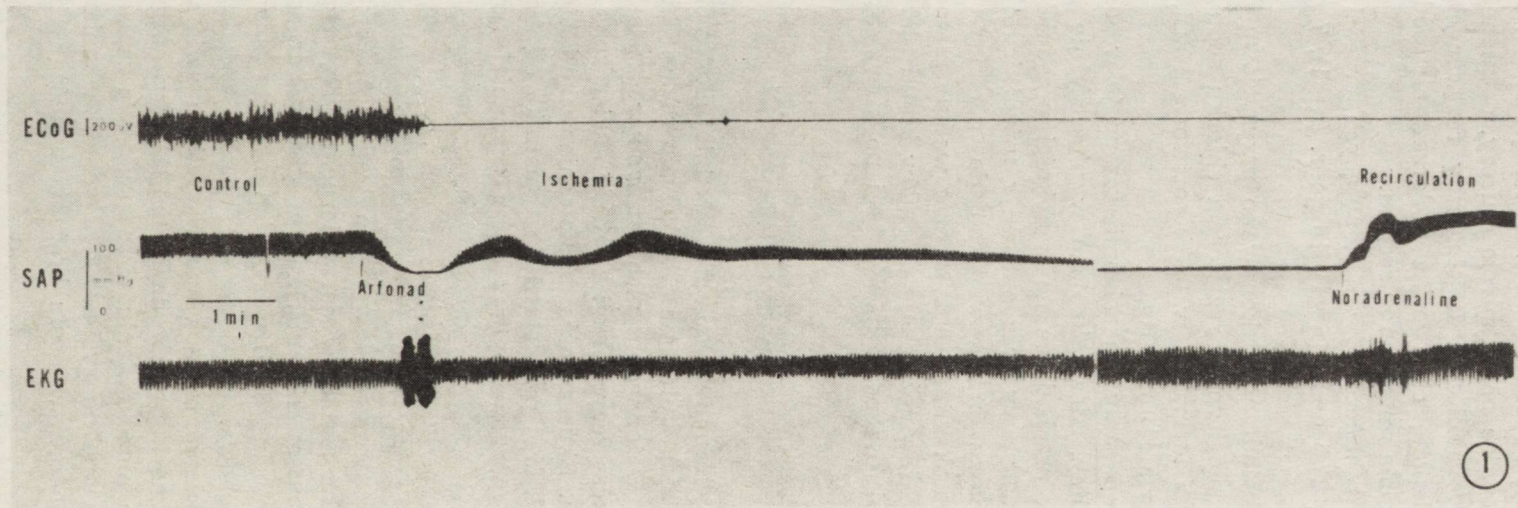
Po wyjęciu mózgu z jamy czaszki umieszczano je w zobojętnionym 10% roztworze formaliny. Mózgi krojono w płaszczyźnie czołowej na bloki grubości 0,5 cm, przechodzące na wysokości przednich i w pełni rozwiniętych zwojów podstawy oraz opuszki z mózdzkiem. Bloki tkanekowe w sposób rutynowy przeprowadzano do parafiny. Parafinowe skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną oraz według metody Klüvera-Barrery. Wykonywano również sekcję narządów klatki piersiowej. Płuca i serca oceniano makroskopowo na świeżo i po utrwaleniu w formalinie.

WYNIKI

Zastosowanie ciągłej infuzji Arfonadu w średniej dawce $67,5 \pm 34,8$ mg ($23,6 \pm 8$ mg/kg masy ciała) skutecznie zablokowało reakcję hipertensyjną u wszystkich zwierząt. U żadnego z nich zarówno w czasie niedokrwienia, jak i przez cały okres recyrkulacji krwi nie stwierdzono również zaburzeń czynności serca. Skuteczność zablokowania reakcji hipertensyjnej ilustruje rycina 1, na której przedstawiono dynamikę ciśnienia krwi po zatrzymaniu krążenia mózgowego oraz obraz czynności serca w zapisie EKG.

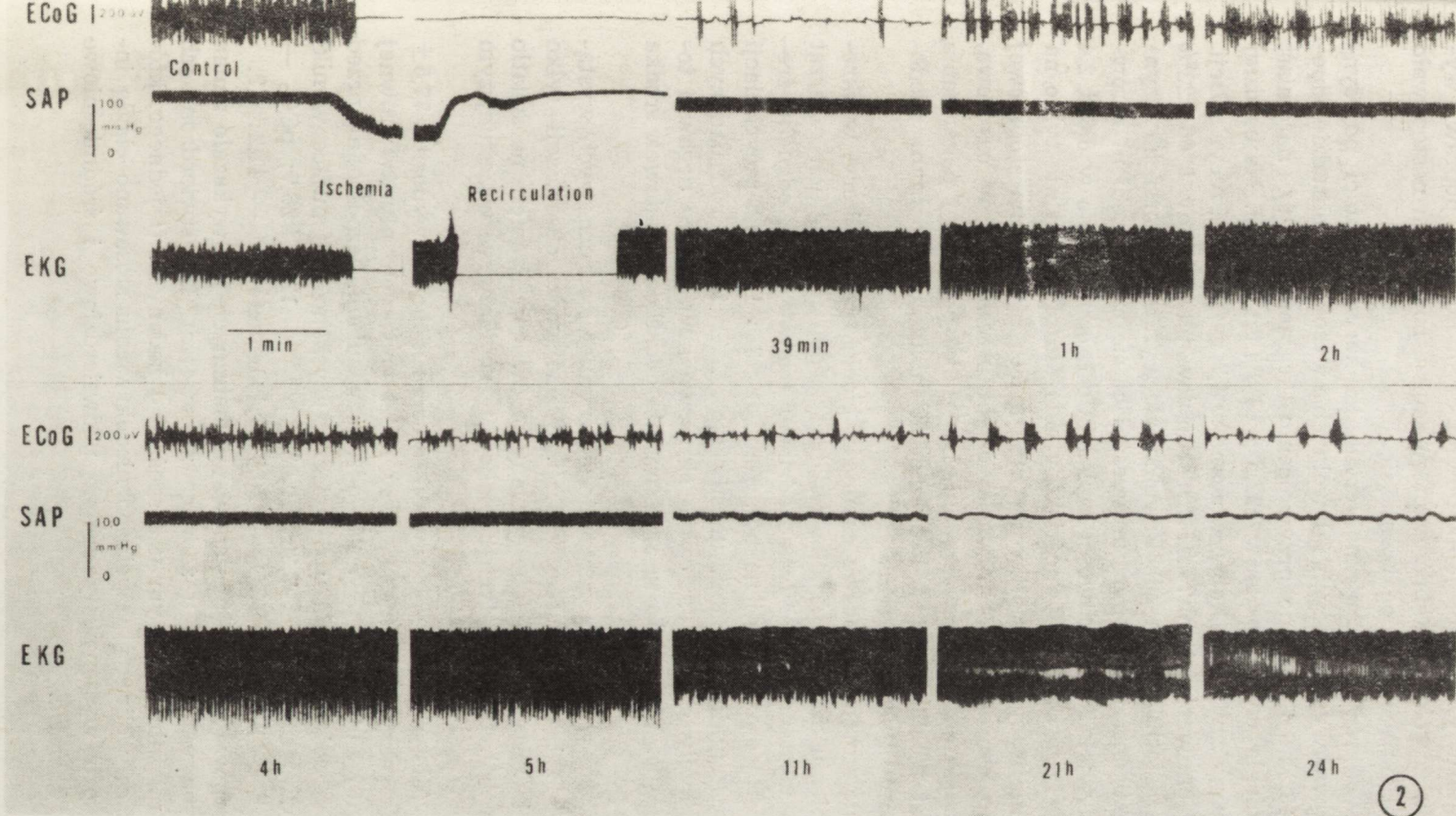
U wszystkich zwierząt, z wyjątkiem jednego, ciśnienie tętnicze po przywróceniu krążenia mózgowego utrzymywało się samoistnie na poziomie zbliżonym do kontrolnego i wynosiło średnio $103,6 \pm 8,9$ mm Hg (n=9). Powrót czynności ośrodków naczynioruchowych, wyrażający się samoistnym utrzymywaniem ciśnienia krwi, następował średnio w $27,7 \pm 5,8$ min po niedokrwieniu (n=8). U wszystkich zwierząt powracała spontaniczna czynność oddechowa.

W okresie niedokrwienia mózgowia u wszystkich zwierząt rejestrowano ciszę bioelektryczną kory mózgu. Czynność kory mózgu w okresie 24 godz. obserwacji po niedokrwieniu wraz z ciągłym zapisem ciśnienia krwi i EKG przedstawiono na rycinie 2. Dynamika zmian czynności bioelektrycznej kory po przywróceniu krążenia w mózgu charakteryzo-



Ryc. 1. Całkowite niedokrwienie mózgu u królika. Początek i koniec 30-minutowego niedokrwienia widoczny jest jako artefakt na krzywej EKG podczas zacisku i udrożnienia naczyń doprowadzających krew do mózgu. Brak zaburzeń czynności serca. ECoG — elektrokortykogram, SAP — układowe ciśnienie tętnicze, EKG — elektrokardiogram, Control — kontrola, Ischemia — niedokrwienie, Recirculation — recyrkulacja

Fig. 1. Complete cerebral ischemia in rabbit. Beginning and the end of 30-min ischemia seen as the artefact on the EKG curve during occlusion and release of the blood vessels supplying the brain. Lack of the heart function disorders



Ryc. 2. Zmiany czynności bioelektrycznej kory, ciśnienia krwi oraz czynności serca podczas 24-godzinnej obserwacji po 30 minutowym całkowitym niedokrwieniu mózgu. Izoelektryczna krzywa czynności serca w początkowym okresie recyrkulacji spowodowana jest chwilowym wyłączeniem kanału EKG ze względu na nałożenie się częstotliwości sieci elektrycznej podczas zdejmowania klipsów i podwiązek z tętnic doprowadzających krew do mózgu. ECoG — elektrokortykogram, SAP — układowe ciśnienie tętnicze, EKG — elektrokardiogram, Control — kontrola, Ischemia — niedokrwienie, Recirculation — recyrkulacja

Fig. 2. Changes of cortical bioelectric activity, blood pressure and heart function during 24-h observation following complete cerebral ischemia for 30-min. The isoelectric curve of describing the heart function in the initial period of recirculation resulted from a temporary interruption of the EKG channel; the operation of the release of the arteries supplying the brain was accompanied by frequency overlap of the electric current and on therecord

wała się trójfazowym przebiegiem. Powrót czynności i jej poprawa wyprzedzała dłuższy okres ustabilizowanego zapisu, po którym następowało powolne, postępujące jego pogarszanie się.

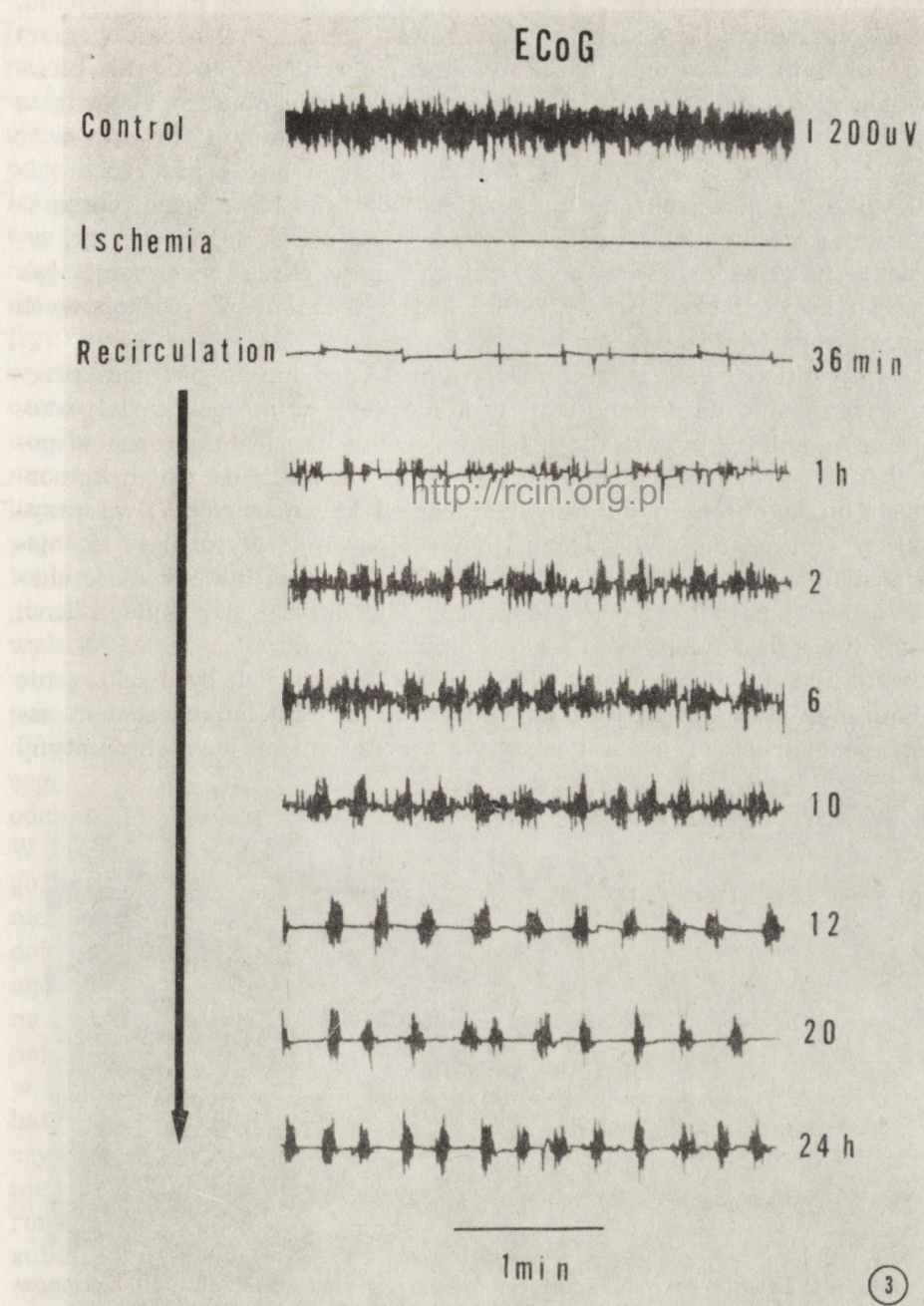
Pierwsze objawy spontanicznej czynności kory w postaci pojedynczych, okresowo występujących fal wolnych o wysokiej amplitudzie odnotowano w $43,2 \pm 6,6$ min po przywróceniu krążenia ($n=6$), natomiast aktywność ciągła występowała w $122,5 \pm 61,8$ mln ($n=6$). Najbardziej znormalizowany zapis ECoG obserwowano w $4,7 \pm 2,9$ godz., recyrkulacji. Odpowiadał on wartościom $73 \pm 14\%$ wyjściowej amplitudy i $66 \pm 22\%$ kontrolnej częstotliwości ($n=6$). Powolne, ale wyraźne pogorszenie czynności bioelektrycznej kory mózgu, wyrażające się zmniejszeniem zarówno amplitudy, jak i częstotliwości zapisu ECoG, odnotowano w $8,6 \pm 2,4$ godz. ($n=6$). Pogorszenie czynności kory polegało przy tym nie tylko na obniżeniu amplitudy i częstotliwości zapisu, lecz również na stopniowej zmianie jego charakteru. Aktywność ciągła przechodziła w okresową, utrzymującą się do końca obserwacji. Dynamikę powrotu i pogarszania się czynności bioelektrycznej kory po 30-minutowym pełnym niedokrwieniu mózgu ilustruje rycina 3.

Wraz z powrotem i poprawą czynności bioelektrycznej kory, w okresie po ustąpieniu działania środka zwiotczającego, u wszystkich zwierząt stwierdzono występowanie żywego odruchu rogówkowego, odruchu źrenicy na światło oraz reakcji na ból. Pomiedzy 3 a 10 godz. recyrkulacji zwierzęta ruszały kończynami, unosiły głowę. U 5 spośród badanych zwierząt pojawiły się w tym czasie okresowo nawracające drgawki toniczno-kloniczne. Wymagało to zastosowania dodatkowych dawek środka zwiotczającego.

Powolne, ale wyraźne pogarszanie się czynności odruchowych wystąpiło między 14 i 24 godz. recyrkulacji. W 24 godz. obserwacji tylko u 4 zwierząt występowały słabe odruchy rogówkowe, źreniczne na światło i reakcja na ból. U pozostałych 2 reakcje te zanikały we wcześniejszym okresie.

Podczas całego okresu obserwacji diureza dobowa wynosiła $77,5 \pm 18,8$ ml/kg masy ciała ($n=6$), przy ilości podanych płynów równej $67,7 \pm 13,4$ ml/kg masy ciała. W 24 godz. recyrkulacji, bezpośrednio przed zakończeniem doświadczenia u 6 zwierząt uzyskano następujące wyniki badania krwi tętniczej: pH $7,387 \pm 0,037$; pO_2 — $120,7 \pm 26,7$; pCO_2 — $34,5 \pm 6,0$; BE — $3,9 \pm 3,1$; HCO_3 — $20,8 \pm 4,4$; hematokryt — $41,2 \pm 4,2$.

Makroskopowe badanie narządów wewnętrznych nie wykazało zmian patologicznych w płucach u żadnego ze zwierząt. Nie stwierdzono ich również w mięśniu sercowym u 5 spośród 6 badanych. U jednego, któremu przez cały okres przeżycia po niedokrwieniu stosowano ciągłą infuzję Levonoru występowały drobne podwiersdziowe i śródmięśniowe wybroczyny krwawe.



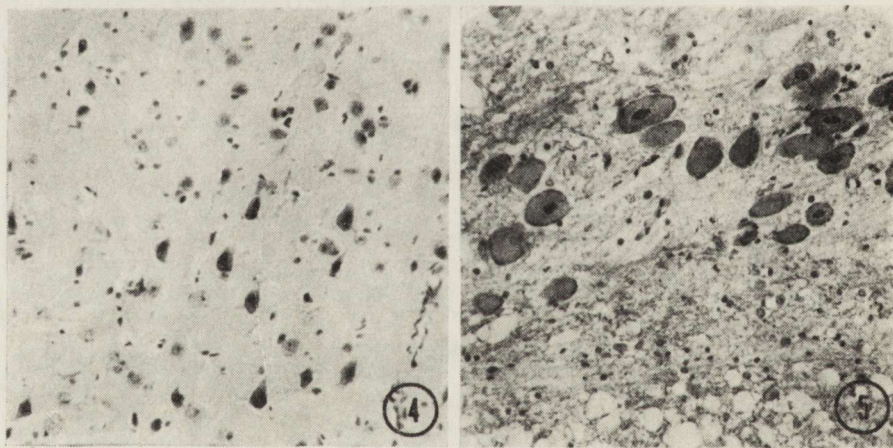
Ryc 3. Dynamika powrotu i pogarszania się czynności bioelektrycznej kory podczas 24-godzinnej obserwacji po 30-minutowym całkowitym niedokrwieniu mózgu. ECoG — elektrokortykogram, Control — kontrola, Ischemia — niedokrwienie, Recirculation — recyrkulacja

Fig. 3. Dynamics of recovery and suppression of the cortical bioelectric activity during 24-h of observation after 30 min complete cerebral ischemia

U 4 zwierząt spośród 6, które przeżyły 24 godz. po niedokrwieniu, stwierdzono zmiany krwotoczne w mózgowiu, widoczne w badaniu okiem nieuzbrojonym. Miały one charakter dobrze ograniczonych ognisk miąższowych, zlokalizowanych w dwóch przypadkach w opuszce i mózdzku, a w dwóch w półkulach mózgu. Ogniskom miąższowym towarzyszyły wylewy podpajęczynówkowe. U królika, którego okres przeżycia wynosił tylko 2,5 godz., obecne było rozległe ognisko krwotoczne obejmujące boczną część opuszki i półkulę mózdzku. U pozostałych zwierząt, zarówno tych które przeżyły pełny 24-godzinny okres obserwacji, jak i tych, u których czas przeżycia był krótszy, zmian makroskopowych w mózgu nie stwierdzono.

U wszystkich zwierząt z zamierzonym 24-godzinnym okresem przeżycia stwierdzono uogólnione zmiany komórkowe w mózgowiu. Ich wzorzec morfologiczny był wspólny, lecz natężenie i rozległość różne w poszczególnych przypadkach. Istotne znaczenie dla nasilenia zmian komórkowych miała obecność ognisk krwotocznych. Dwa przypadki, w których nie stwierdzono ich występowania, wyróżniały się małym nasileniem uszkodzeń komórkowych. Ich znaczna intensywność charakteryzowała natomiast przypadek, który w okresie recyrkulacji krwi wykazywał stałą tendencję do reakcji hipotensyjnej.

Dominującym typem nieprawidłowości komórkowych było schorzenie ischemiczne, charakteryzujące się całkowitą tigrolizą, obkurczeniem zarysów perykarionu i jądra komórki i zagęszczeniem jego chromatyny



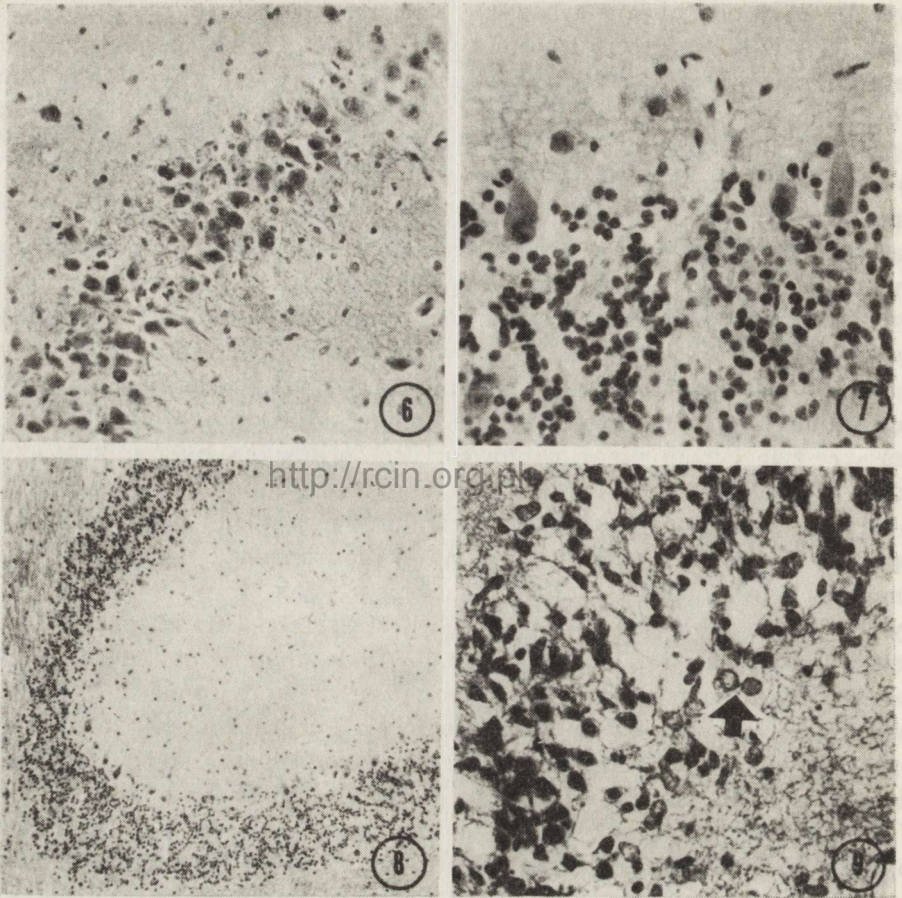
Ryc. 4. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Grupa piramidowych neuronów kory mózgu z cechami schorzenia ischemicznego. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 4. Global ischemia, 30 min, 24 h survival. A group of pyramidal cortical neurons with features of ischemic changes. H—E. 200 ×

Ryc. 5. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Neurony brzuszego jądra ślimakowego z cechami zwyrodnienia ischemicznego. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 5. Ischemia 30 min, 24 h survival. Neurons of ventral cochlear nucleus with features of ischemic degeneration. H—E. × 200

(ryc. 4). Były one obecne we wszystkich strukturach szarych mózgowia, najobficiej w korze nowej i w pniu mózgu. W korze najczęściej występowały w sposób rozsiany we wszystkich jej warstwach, z wyraźną jednak akcentacją w warstwie III i V. W okolicach odpowiadających strefom pogranicza unaczynienia przez duże pnie tętnicze dotyczyły na ogół całej populacji komórek nerwowych. W rogu Amona przyjmowały postać typowego kwasochłonnego zwyrodnienia komórek piramidowych, dotyczącego bądź pojedynczych rozsianych neuronów położonych wśród niezmięnionej poza tym populacji komórek, bądź też ich całych ugrupowań (ryc. 6). W przypadku dużych neuronów pnia mózgu zmiany ischemiczne wyrażały się powiększeniem zarysów komórek, pełną tigrolizą i obkurczeniem jądra (ryc. 5). Cechą znamioną wszystkich przypadków były uogólnione zmiany homogenizacyjne komórek Purkinjego (ryc. 7). Ostatnim wreszcie typem nieprawidłowości komórkowych była mikrowakuolizacja cytoplazmy neuronów. Drobne okrągłe lub owalne wodniczki, pojedyncze lub mnogie, zlokalizowane były najczęściej na obwodzie cytoplazmy. Występowały one zarówno w neuronach z cechami zwyrodnienia ischemicznego i homogenizacyjnego, jak i w komórkach nie wykazujących poza tym żadnych cech uszkodzenia. Ubytki komórek nerwowych były zjawiskiem rzadkim. W jednym przypadku miały one postać delikatnych rozsianych przerzedzeń w korze mózgu, w dwóch dalszych — niewielkich ubytków komórek Purkinjego, bez towarzyszącego odczynu gleju Bergmanna (ryc. 8). Znacznie częściej spostrzegano odcinkowe całkowite lub częściowe ubytki komórek opaski zębatej. W tych razach towarzyszyło im znaczne rozrzedzenie podłoża tkankowego, a zachowane neurony były obkurczone i nadbarwliwe (ryc. 9). Wodniczkowe zwyrodnienie neuropilu, stanowiące wczesne następstwo niedokrwienia mózgu nie było zjawiskiem częstym, a jego nasilenie było na ogół małe. Obserwowano je tylko w trzech przypadkach, z tego w dwóch na pograniczu unaczynienia, a w jednym w III warstwie kory. Częściej natomiast występowało zgąbczenie tkanki. Dominowało ono wyraźnie w strukturach pnia mózgu i w mózdzku, przede wszystkim w jądrze zębatym (ryc. 10). Cechą znamioną wszystkich przypadków był brak odczynu ze strony astrogleju. Zaledwie w jednym przypadku delikatne nieprawidłowości astrocytów towarzyszyły ciężkiemu uszkodzeniu neuronów w opasce zębatej. Powiększenie rozmiarów jąder astrocytarnych, zubożenie zawartości chromatyny i ostro zarysowane błony komórkowe upodobały je do tzw. nagich jąder (ryc. 9). W jednym przypadku stwierdzono ponadto cechy ostrego obrzmienia oligodendrogleju, towarzyszące znacznemu porozsuwaniu pasm włókien nerwowych w istocie białej (ryc. 11). W pozostałych przypadkach podkorowa istota biała była niezmięciona. Zmiany krwotoczne, występujące w różnych strukturach mózgowia, obecne były u 4 zwierząt. Miały one postać bądź dobrze ograniczonych pojedynczych ognisk (ryc. 12), bądź skupień mnogich, zlewa-



Ryc. 6. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Zwyródnienie kwasochłonne neuronów piramidowych rogu Amona. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 6. Ischemia 30 min, 24 h survival. Eosinophilic degeneration of pyramidal neurons in Ammon's horn. H—E. × 200

Ryc. 7. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Komórki Purkiniego z cechami zwyródnienia homogenizacyjnego. H—E. Pow. 400 ×

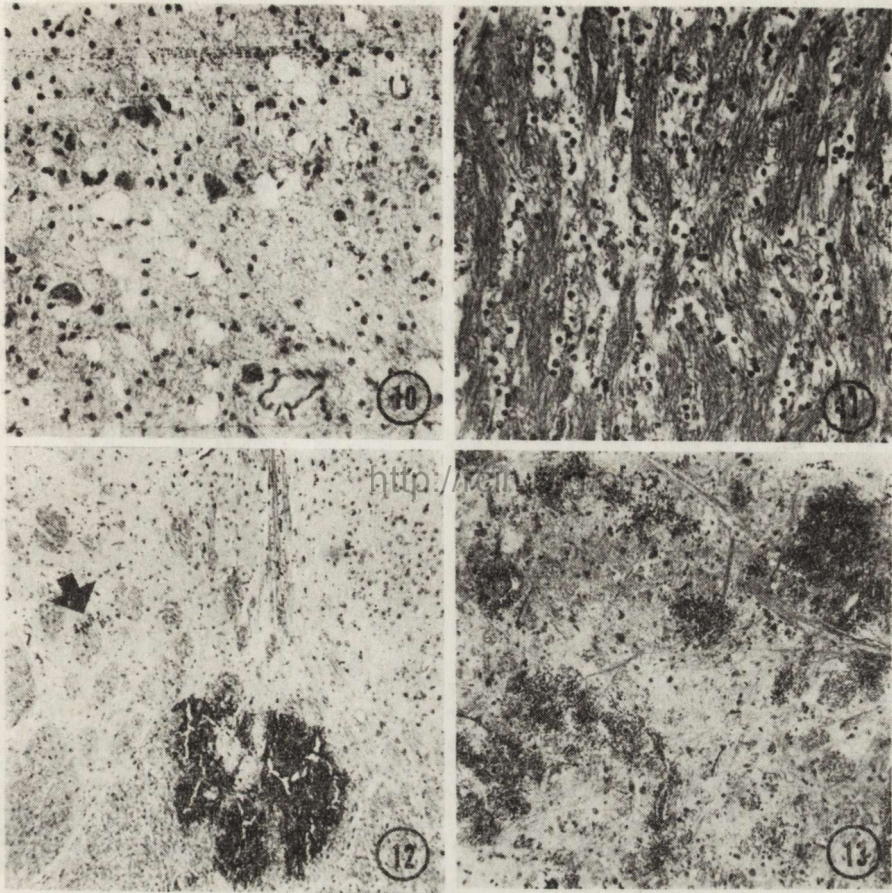
Fig. 7. Ischemia 30 min, 24 h survival. Homogeneous Purkinje cells in cerebellar cortex. H—E. × 400

Ryc. 8. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 27,5 godz. Ubytek komórek Purkiniego w korze mózdzku. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 8. Ischemia 30 min, 27,5 survival. Neuronal loss in Purkinje cell layer. H—E. × 100

Ryc. 9. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Ubytek neuronów i znaczne rozrzedzenie podłoża w opasce zębatej. Zachowane komórki nerwowe ciemne, nadbarwliwe. Grupa obrzmiałych jąder astrocytów z ostro zarysowanymi błonami jądrowymi (strzałka). H—E. Pow. 400 ×

Fig. 9. Ischemia 30 min, 24 h survival. Neuronal loss and tissue rarefaction in fascia dentata. Shrunken and hyperchromatic preserved neurons. A group of swollen astrocytic nuclei with sharp outlines of nuclear membrane (arrow). H—E. × 400



Ryc. 10. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Zmiany gąbczaste w jądrze zębatym mózdzku. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 10. Ischemia 30 min, 24 h survival. Spongiotic changes in the cerebellar dentate nucleus. H—E. × 200

Ryc. 11. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Porozsuwane pasma włókien nerwowych w podkorowej istocie białej. Oligodendrocyty z cechami ostrego obrzmienia. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 11. Ischemia 30 min, 24 h survival. Widely separated bundles of nerve fibres in subcortical white matter, acute swelling of oligodendrocytes. H—E. × 200

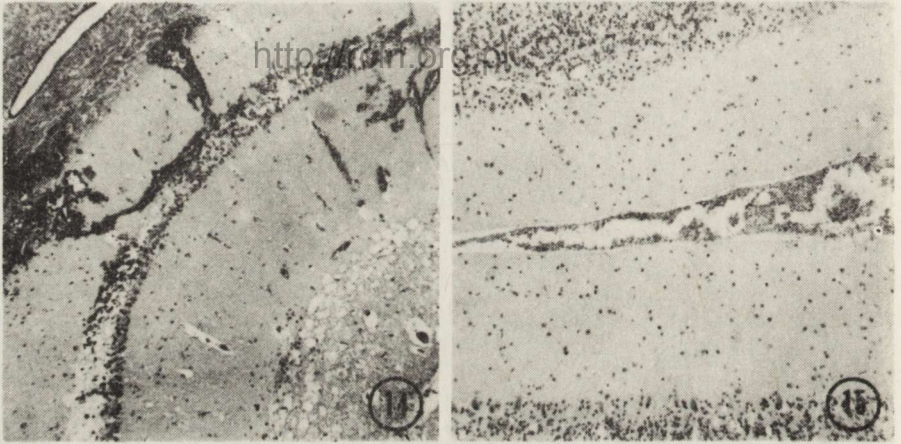
Ryc. 12. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Dobrze ograniczone świeże ognisko krwotoczne w jądrach podstawy. Drobnie ugrupowania erytrocytów w otaczającej tkance (strzałka). H—E. Pow. 100 ×

Fig. 12. Ischemia 30 min, 24 h survival. Well defined fresh hemorrhagic focus in the region of basal ganglia. Small group of erythrocytes in the neighbouring tissue (arrow). H—E. × 100

Ryc. 13. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Liczne zlewające się okołonaczyniowe krwinkotoki w opuszce. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 13. Ischemia 30 min, 24 h survival. Numerous confluent perivascular hemorrhagic foci in upper medulla. H—E. × 100

jących się okołonaczyniowych krwinkotoków, zajmujących rozległe obszary poszczególnych struktur mózgu (ryc. 13). Ten rodzaj zmian prze-ważał w pniu mózgu i mózdzku. Nierzadko występowały ponadto drobne krwinkotoki nie niszczące podłoża tkanki rozsiane w korze mózgu. Tkan-ka nerwowa w otoczeniu różnego rodzaju ognisk krwotocznych wyka-zywała znacznego stopnia uszkodzenia, wyrażające się zblednięciem osło-nek mielinowych, porozsuwaniem pasm włókien nerwowych, rozrzedze-niem bądź zgębczeniem podłoża, zwyrodnieniem i ubytkami komórek nerwowych (ryc. 14). Obecne były również odcinkowe nagromadzenia krwi w przestrzeni podpajęczynówkowej, towarzyszące ogniskom miąż-szowym lub z nimi niezwiązane (ryc. 15).



Ryc. 14. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 24 godz. Liczne okołonaczyniowe, częściowo zlewające się ogniska krwotoczne w roku Amona. Zwracają uwagę ubytki komórkowe w opasce zębatej i zgębczenie podłoża tkankowego. H—E. Pow. 60 ×

Fig. 14. Ischemia 30 min, 24 h survival. Numerous perivascular, partially confluent hemorrhagic foci in Ammon's horn. Note neuronal loss in fascia dentata and tissue spongiosis. H—E. × 60

Ryc. 15. Niedokrwienie 30 min, przeżycie 27,5 godz. Podpajęczynówkowe skupienie erytrocytów w rowku mózdzku. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 15. Ischemia 30 min, 27,5 h survival. Subarachnoid accumulation of erythrocytes in the cerebellar sulcus. H—E. × 100

W mózgach zwierząt o krótszych okresach przeżycia po niedokrwie-niu nieprawidłowości tkankowe miały charakter uogólnionych zwyrod-nień komórkowych o cechach schorzenia ischemicznego, homogeni-zacyjnego i mikrowakuolizacji cytoplazmy. Były one jednak mniej zaawansowane niż u zwierząt po 24-godzinnym przeżyciu. W przypadku królika uśpionego po 2,5 godz. recyrkulacji krwi obok niewielkiego zwy-rodnienia komórkowego stwierdzono rozległe ognisko krwotoczne obej-mujące część nakrywkową opuszki i półkulę mózdzku.

OMÓWIENIE

W poprzednich badaniach nad skutkami całkowitego niedokrwienia mózgu przeciwdziałano stale reakcji wazopresyjnej, znamiennej dla wczesnej fazy uniedroźnienia dopływu krwi do ośrodkowego układu nerwowego, poprzez stosowanie okresowego upustu krwi i dożylnie podawanie Arfonadu w dawce 5 mg/kg masy ciała (Pluta, Kapuściński 1980; Pluta i wsp. 1980; Pluta 1982). Postępowanie to okazało się nie w pełni skuteczne. W bardzo wielu przypadkach, mimo to, występowały zaburzenia czynności serca, jego niewydolność i wtórna obwodowa hipotensja (Kapuściński i wsp. 1980; 1981). Zaburzenia ze strony układu krążenia stwarzały konieczność długotrwałego stosowania środków hipertensyjnych, co z kolei pociągało za sobą rozwój zmian patologicznych w mięśniu serca o charakterze wybroczyn i wylewów krwawych oraz ognisk martwicy (Pluta 1982). Zastosowanie w obecnej serii doświadczeń infuzji Arfonadu w średniej dawce $23,6 \pm 11,8$ mg/kg masy ciała podczas zatrzymania dopływu krwi do mózgu pozwoliło skutecznie zablokować reakcję hipertensyjną i uniknąć zaburzeń czynności serca. Potwierdzał to prawidłowy zapis EKG podczas 24 godz. obserwacji u 5 zwierząt, u których nie dochodziło do objawów niewydolności krążenia i nie istniała konieczność farmakologicznego podtrzymywania ciśnienia krwi w okresie recyrkulacji, a stosunkowo niska dawka Levonoru podana w okresie udroźnienia tętnic domózgowych okazała się całkowicie wystarczająca. Nie stwierdzono również u nich zmian patologicznych w mięśniu sercowym, podczas gdy u jednego z królików, u którego wprawdzie również nie stwierdzono zaburzeń czynności serca, jednakże w okresie recyrkulacji okazało się niezbędne podtrzymywanie ciśnienia krwi przez długotrwałą infuzję Levoronu, występowały zarówno wybroczyny krwawe w mięśniu sercowym, jak i zmiany krwotoczne w mózgu.

Przy stosowaniu leczenia przeciwobrzękowego i utrzymywaniu prawidłowego ciśnienia oraz pH krwi w okresie recyrkulacji, czas powrotu spontanicznej czynności ośrodków naczynioruchowych, wyrażającej się zdolnością do samoistnego utrzymywania ciśnienia krwi, nie różnił się znamienne od wyników uzyskanych przez Plutę (1982) po 30-minutowym pełnym zatrzymaniu krążenia w mózgowiu. Czas powrotu najwcześniejszych wykładników spontanicznej czynności bioelektrycznej kory mózgu nie odbiegał również istotnie od wyników uzyskanych poprzednio zarówno w badaniach na królikach (Pluta 1982), jak i na chomikach mongolskich (Kapuściński, Mossakowski 1983), a aktywność ciągła w zapisie ECoG pojawiała się nawet w okresie późniejszym. Aktywność bioelektryczna kory w żadnym przypadku nie powróciła do wartości wyjściowych. Jej najkorzystniejsze wykładniki, stwierdzone w $4,7 \pm 2,9$ godz. recyrkulacji, odpowiadały 73% kontrolnej wartości amplitudy i 66% kontrolnej częstotliwości. W $8,6 \pm 2,4$ godz. recyrkulacji

u wszystkich królików stwierdzano wyraźne pogorszenie czynności bioelektrycznej kory mózgu, która jedynie w postaci czynności okresowej utrzymywała się do końca 24 godz. obserwacji. W okresie recyrkulacji krwi powracały także wybrane reakcje odruchowe. Poprawiał się również stan ogólny zwierząt, który był najlepszy między 3 a 10 godz. powrotu krążenia krwi w mózgu. W późniejszym okresie, poczynając od 14 godz. stan ogólny zwierząt ulegał stopniowemu pogorszeniu. Dochodziło do osłabienia reakcji odruchowych, które u 2 zwierząt zanikły całkowicie przed zakończeniem obserwacji.

Podstawowe zagadnienie, po jak długim czasie całkowitego niedokrwienia mózgu, w warunkach normotermicznych, możliwe jest trwale przywrócenie prawidłowej czynności mózgu bez ubytkowych zespołów neurologicznych, pozostaje nadal otwarte. W obszernej serii badań na królikach, przeprowadzonej przez Plutę (1982) u 14 z 47 zwierząt poddanych całkowitemu niedokrwieniu mózgu przez okres 30 min, nie stwierdzono w ogóle powrotu czynności bioelektrycznej kory. U 33, które przeżyły do 6 godz. obserwowano jej powrót do wartości 50—70% amplitudy wyjściowej. Częstotliwość fal szybkich była jednak zawsze wyraźnie zmniejszona. U znacznej części zwierząt pojawiał się wtórny zanik czynności mózgu. W serii badań na chomikach mongolskich, które poddano zabiegowi podwiązania obu tętnic szyjnych wspólnych na okres 30 min (Kapuściński, Mossakowski 1983), u 2 zwierząt czynność bioelektryczna kory mózgu wróciła do wartości wyjściowych, natomiast u 8 z 10 badanych zarówno amplituda, jak i częstotliwość zapisu ECoG osiągała jedynie 25—50% wartości kontrolnych w okresie 3 godz. recyrkulacji. Po tym czasie obserwowano albo brak dalszej poprawy, albo wtórne pogorszenie zapisu prowadzące do śmierci mózgu. W obydwu seriach doświadczeń, zarówno na królikach, jak i chomikach mongolskich nie stosowano leczenia przeciwozrękowego, ani nie korygowano farmakologicznie pH krwi, ani też nie przeciwdziałano dostatecznie reakcji wazopresyjnej, co pociągało za sobą uszkodzenie serca i wtórne zaburzenia hemodynamiczne. Porównanie z obecnymi badaniami pozwala stwierdzić, że zastosowana terapia przedłużyła okres przeżycia zwierząt, umożliwiając ich dłuższą obserwację. Korzystne było również uzyskanie powrotu czynności bioelektrycznej u wszystkich badanych zwierząt. Nie uchroniła ona jednak od wtórnego załamania czynności bioelektrycznej kory mózgu mimo istotnej poprawy czynnościowych parametrów krążeniowych. Nie wpływało również w sposób istotny na charakter uszkodzeń strukturalnych tkanki.

Badanie mikroskopowe ośrodkowego układu nerwowego wykazało uogólnione zmiany patologiczne komórek nerwowych o typie niedokrwinnym (Brown, Brierley 1968; McGee-Russell i wsp. 1970). W swoim podstawowym wzorcu patomorfologicznym nie różniły się one zasadniczo od nieprawidłowości tkankowych opisanych przez Plutę (1982)

u nieleczonych królików z 30-minutowym pełnym niedokrwieniem mózgowia oraz Kapuścińskiego i Mossakowskiego (1983) u chomików mongolskich z obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych na okres 30 min. Przy znanych i oczywistych zastrzeżeniach co do jakości oceny patomorfologicznej stopnia uszkodzeń tkanki — wydawały się one jednak mniej nasilone. Było to o tyle istotne, iż przedstawiony w niniejszej pracy materiał pochodził w większości od zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem po niedokrwieniu, podczas gdy poprzednio dotyczył zwierząt, które przeżyły jedynie 6 godz. po przebytych niedokrwieniu. Różnice te najwyraźniej występowały u 2 zwierząt bez zmian krwotocznych w mózgu. Komórkowe zmiany neuropatologiczne miały tu niewielkie nasilenie. Porównanie obrazu histopatologicznego mózgow zwierząt z 24-godzinnym i krótszym okresem przeżycia po niedokrwieniu pozwoliło na zaobserwowanie wyraźnych różnic zależnych od „dojrzewania” procesu patologicznego (Klatzo 1975). Zmiany patologiczne u zwierząt z dłuższym okresem przeżycia były bardziej nasilone i uogólnione. W zestawieniu z chomikami mongolskimi (Kapuściński, Mossakowski 1983) zwracała uwagę mała, choć obecna zależność nasilenia uszkodzeń tkankowych od ich położenia w obszarach pogranicza unaczynienia przez duże pnie tętnicze mózgu. Mogło to jednakże zależeć zarówno od uniknięcia reakcji hipotensyjnej w okresie recyrkulacji krwi dzięki stosowanej terapii, jak i od gatunkowych różnic w ukształtowaniu sieci naczyniowej mózgu u królików i chomików mongolskich (Tamura i wsp. 1981). W porównaniu do obu badanych poprzednio grup zwierząt (Pluta 1982; Kapuściński, Mossakowski 1983) uogólniona reakcja obrzękowa mózgu była nikła. Jej niewątpliwe wykładniki morfologiczne stwierdzono bowiem tylko w jednym przypadku. Skąpy materiał doświadczalny jak i ograniczość morfologicznej oceny obrzęku mózgu opartej na spostrzeżeniach w mikroskopie świetlnym nie pozwalają na jednoznaczne wiązanie tego zjawiska z działaniem zastosowanego preparatu przeciwobrzękowego.

Odrębnym zagadnieniem zasługującym na podkreślenie był bogaty udział komponentu krwotocznych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, nieporównywalnie wyższy niż w poprzednich badaniach (Pluta 1982; Kapuściński, Mossakowski 1983). Zmiany krwotoczne, obecne u 5 z 9 badanych zwierząt, a u 4 spośród 6, które przeżyły do 24 godz. po niedokrwieniu, nie są typowe dla niepowikłanej patomorfologii niedokrwiennej mózgu. Ich związek ze stosowaną terapią, jakkolwiek możliwy, pozostaje sprawą otwartą, tym bardziej, że łączna dawka noradrenaliny zawarta w podanym Levonorze była niższa niż w przypadku poprzednich doświadczeń.

Pogląd, iż komórki nerwowe są bardziej odporne na niedokrwienie niż wynikałoby to ze spostrzeżeń klinicznych (Hossmann, Zimmermann 1974; Kolata 1979; Plum 1981; Pluta 1982) zainicjował liczne prace doświadczalne, których celem było wykrycie i wyjaśnienie mechanizmów pato-

genetycznych odpowiedzialnych za ich nieodwracalne uszkodzenie. Wyniki dotychczasowych badań wskazują na szczególne znaczenie kwasicy wewnątrzkomórkowej oraz łańcuchowo postępujących zaburzeń metabolicznych, rozpoczynających się od upośledzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy jonów (Raichle 1983). Obserwacje Hansena (1981) wykazały, że w pierwszych minutach po wygaśnięciu czynności bioelektrycznej mózgu, występującym w okresie 20 s pełnego niedokrwienia (Hossmann, Zimmermann 1974; Astrup i wsp. 1981), znacznie wzrasta stężenie potasu w przestrzeni pozakomórkowej przy równoczesnym spadku stężenia sodu i wapnia. Na skutek depolaryzacji i uszkodzenia błon cytoplazmatycznych sód i wapń przechodzą do wnętrza komórki. Sód i wapń stymulują uwalnianie wapnia z mitochondriów. W następstwie metabolizmu beztlenowego dochodzi do obniżenia zasobów energetycznych komórki i zwiększonej produkcji kwasu mlekowego prowadzącego do zakwaszenia środowiska wewnątrzkomórkowego. Efektem zaburzeń metabolizmu fosfolipidów błonowych jest uwalnianie kwasów tłuszczowych, spośród których kwas arachidonowy uruchamia kaskadę procesów metabolicznych syntezy prostanoidów (Wolfe 1982) z ich niekorzystnych dla tkanki wpływem na układ naczyniowy i błony komórkowe. Obniżenie stężenia związków wysokoenergetycznych obok wzrostu wolnych rodników powoduje uwalnianie wapnia z siatki śródplazmatycznej (Flam i wsp. 1978). Zaburzenia wewnątrzkomórkowej homeostazy wapnia warunkują dalszy masywny jego napływ do komórek nerwowych podczas reperfuzji i wystąpienie ich nieodwracalnych uszkodzeń związanych z utratą czynności mitochondriów (Faber i wsp. 1981). Uszkodzenie przepuszczalności błon komórkowych i zaburzenia równowagi jonowej leżą u podłoża obrzęku cytotoksycznego mózgu stanowiącego wstępną fazę niedokrwienego obrzęku mózgu. Uruchomione w czasie niedokrwienia mechanizmy patogenetyczne postępujące nadal w późniejszej fazie prowadzą do rozwoju obrzęku naczyniopochodnego pogłębiającego uszkodzenia komórkowe. Badania Ames i Nesbetta (1983 a, b, c), prowadzone na siatkówce królika *in vitro*, sugerują, że najwcześniejsze nieodwracalne uszkodzenia neuronów pojawiają się po okresie nie krótszym niż 20 min pełnego niedokrwienia. Nie są one jednak porównywalne ani z warunkami doświadczenia *in vivo*, ani tym bardziej z obserwacjami klinicznymi, wskazującymi na to, iż 5-minutowe pełne niedokrwienie mózgu prowadzi do nieodwracalnych uszkodzeń komórkowych. Istnieje natomiast coraz więcej dowodów doświadczalnych, do których należą i nasze własne spostrzeżenia, że całkowita restytucja krążenia i powrót czynności bioelektrycznej neuronów po niedokrwieniu nie zatrzymuje dalszego postępu procesów patologicznych prowadzących do ich nieodwracalnego uszkodzenia. Badania Suzuki i wsp. (1983 a, b), przeprowadzone na modelu obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych u chomików mongolskich, wskazują, że czynnościowa restytucja i metaboliczna normali-

zacja nawet po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu mogą mieć charakter przejściowy, a dalszą fazą procesu jest czynnościowa, metaboliczna i strukturalna dezintegracja tkanki. Udowodnili oni, iż po 5-minutowym niedokrwieniu mózgu neurony sektora CA₁ hipokampa wykazujące pełną czynnościową odnowę, a nawet hiperaktywność występującą w pierwszej dobie recyrkulacji krwi, po 2 dniach mimo zachowania prawidłowej struktury ulegały czynnościowej śmierci, by po 3 dniach ulec morfologicznej dezintegracji. Zjawisko to zostało określone przez Klatzo (1975) jako dojrzewanie procesu patologicznego. O ile na podstawie poprzednich badań (Hossmann i wsp. 1973; Hossmann, Zimmermann 1974; Kleihues i wsp. 1975; Kolata 1979; Pluta, Kapuściński 1980; Kapuściński, Mossakowski 1983; Pluta 1982; Ames, Nesbett 1983 a) można było przypuszczać, że różne stopnie powrotu czynności i normalizacji metabolizmu są skorelowane z możliwością przeżycia mózgu, na tyle obecne spostrzeżenia poparte wynikami badań Suzuki i wsp. (1983 a, b) wskazują, że odnowa aktywności neuronów nie oznacza odwracalności ich uszkodzenia. Stanowi to poparcie poprzednio wyrażonego poglądu, iż po dłuższych okresach niedokrwienia mózgu nawet pełna normalizacja jego aktywności bioelektrycznej nie ma wartości prognostycznej co do dalszego przebiegu procesu patologicznego (Kapuściński, Mossakowski 1983).

ПОПЫТКИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ПРОТИВОДЕЙСТВИЯ ИШЕМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОЗГЕ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ЗАДЕРЖКИ КРОВΟΣНАБЖДЕНИЯ

Содержание

Общие гемодинамические изменения и связанные с ними функциональные и структурные повреждения сердца, изменения kwaso-щелочного равновесия, а также ранний отек мозга, сопровождающие полную ишемию мозга составляют собой факторы ограничивающие функциональную реституцию центральной нервной системы во время рециркуляции крови.

Сделано попытку фармакологического противодействия этим факторам, при употреблении следующих медикаментов:

- Афронад (Рош) предупреждающий ранней гипертонической реакции,
- Левонор (Польфа) противодействующий гипотонической реакции во время реституции кровоснабжения,
- Трис (Фресенос) поддерживающий kwaso-щелочный баланс организма,
- Маннитол (Польфа) обеспечивающий против развитию мозгового отека.

Эксперименты проводились на взрослых кроликах, которым в барбитурном наркозе (35 мг/кг веса) производилось полную ишемию мозга на время 30 минут, подвязывая все артерии снабжающие мозг в местах их отхода от аортальной дуги. Принимаемая терапия предупредила выступлению гемодинамических изменений, повреждению функции сердца и изменениям kwaso-щелочного баланса у всех животных и предоставило возможность продолжать переживание до 24 часов у шести животных с девяти исследуемых. Время реституции биоэлектрической активности мозга выступающей у всех животных, не отличалось значительно по сравнению с контрольными животными. Нормализация электрокортикографической записи в смысле ей амплитуды и частоты была высшая чем у контрольных живот-

ных. У всех исследуемых животных наблюдалось вторичное повреждение биоэлектрической активности мозга, которое начинаясь в 8 часов рециркуляции поступало в следующие периоды проживания.

Патоморфологические исследования доказали присутствие ишемических изменений нервных клеток во всех структурах мозга, наиболее намеченных в структурах мозгового ствола и мозжечка. Только у одного животного обнаружилось морфологические экспоненты отека мозга. Однако, очень часто обнаружались кровоточные изменения мозга. Полученные результаты доказывают, что патологические процессы в мозге вызванные его ишемией поступающие во времени и ведущие к структурным повреждениям ткани, ведут к вторичному изменению функции мозга, мимо значительного улучшения общих физиологических параметров.

Реституция функции мозга после его ишемии, достигающая даже высокий уровень нормализации не имеет прогностического значения, относительно дальнейшего тока патологического процесса.

<http://rcin.org.pl>

PHARMACOLOGICAL ATTEMPT TO PREVENT ISCHEMIC CHANGES
IN THE BRAIN FOLLOWING COMPLETE CEREBRAL ISCHEMIA IN RABBITS

Summary

Systemic hemodynamic abnormalities, functional heart disturbances and its structural lesions, alteration in acid-base equilibrium and early development of brain edema, accompanying prolonged global cerebral ischemia are considered to be important factors limiting restoration of brain function during recirculation period. It was decided to counteract these factors pharmacologically, by applying the following drugs: 1. Afronad (Roche) — to prevent hypertonic reaction in the early period of ischemia, 2. Levonar (Polfa) — to keep arterial pressure during the recirculation period on the level close to control, 3. Tris (Fresenius, A.G) — to counteract disturbances of acid-base equilibrium, and 4. Mannitol (Polfa) — to protect against development of early brain edema. Experiments were carried out on 9 adult rabbits, in which, under pentobarbital anesthesia (35 mg/kg b.w.), total cerebral ischemia was produced by ligation of brain supplying arteries at their outcome point from the aortal arch. In all animals the pharmacological treatment prevented successfully systemic hemodynamic disturbances, functional heart abnormalities and alterations of acid-base equilibrium. It extended the survival time of 6 out of 9 examined animals to 24 h. The restoration time of the bioelectric activity of the brain in all animals did not differ essentially from that in untreated ones. Normalization of ECoG pattern with respect to both its frequency and amplitude was higher than in untreated animals. In all the animals secondary deterioration of the cerebral bioelectric activity appeared around 8th h of the recovery period, worsening further during the later period of survival. Brain pathomorphology revealed cellular ischemic changes spread over all cerebral structures, being most intensive in the brain stem and cerebellum. In only one animal, features of brain edema were found. However, hemorrhagic foci, resulting from pharmacological treatment were a common finding.

It was concluded that pathological processes, initiated by ischemia were continuously progressing, leading to secondary deterioration of the cerebral bioelectric activity and appearance of structural lesions, regardless the significant improvement of the systemic physiological parameters. Therefore, restoration of the bioelectric activity of the brain following global ischemia and its significant normalization do not possess prognostic value as to the further development of the pathological process.

PIŚMIENICTWO

1. Ames A. III, Nesbett F. B.: Pathophysiology of ischemic cell death: I. Time of onset of irreversible damage, importance of the different components of the ischemic insult. *Stroke*, 1983 a, 14, 219—226.
2. Ames A. III, Nesbett F. B.: Pathophysiology of ischemic cell death: II. Changes in plasma membrane permeability and cell volume. *Stroke*, 1983 b, 14, 227—233.
3. Ames A. III, Nesbett F. B.: Pathophysiology of ischemic cell death: III. Role of extracellular factors. *Stroke*, 1983 c, 14, 233—240.
4. Astrup J., Siesjö B. K., Symon L.: Thresholds in cerebral ischemia. The ischemic menumbra. *Stroke*, 1981, 12, 723—725.
5. Black P. Mcl.: Brain death. *N. Engl. J. M.*, 1978, 299, 338—344.
6. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optic microscope. *Brit. J. exp. Path.*, 1968, 49, 87—98.
7. Faber J. L., Chien K. R., Mittnacht S. Jr.: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am. J. Pathol.*, 1981, 102, 271—281.
8. Flam E. S., Demopoulos H. B., Seligman M. L., Poser R. G., Ransohoff I.: Free radicals in cerebral ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 445—447.
9. Hansen A. J.: Extracellular ion concentration in cerebral ischemia. [W:] *The Application of Ion—selective Microelectrodes*. Red. T. Zenter, Elsevier, New York, North-Holland 1981, 239—254.
10. Hass W. K.: Beyond cerebral blood flow, metabolism, and ischemic threshold: Examination of the role of calcium in the initiation of cerebral infraction. [W:] *Cerebral Vascular Disease*. Vol. 3. Red. J. S. Meyer, H. Lechner, M. Reivich, E. D. Ott, A. Aranibar. *Excerpta Medica*, Amsterdam 1981, 3—17.
11. Hossmann K-A., Kobayashi K., Hossmann V., Kleihues O.: Recovery of cerebral energy metabolism after complete ischemia of one hour's duration. *Naturwissenschaften*, 1973, 60, 53—54.
12. Hossmann K-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
13. Kapuściński A., Tołowa S. V., Pluta R.: Some disturbances of cardiovascular system in experimental compression ischemia of the rabbit brain. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1980, 18, 407—415.
14. Kapuściński A., Pluta R., Mossakowski M. J.: Is acute failure of adrenals an important factor limiting recovery from cerebral ischemia? W: *Cerebral Microcirculation and Metabolism*. Red. J. Cervos-Navarro, E. Fritschka. *Raven Press*, New York 1981, 293—302.
15. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observation after 30 min bilateral occlusion of the common carotid artery in gerbils. [W:] *Stroke — Animals Models*. *Advances in biosciences*. Vol. 43. Red.: K. Stefanovič, *Pergamon Press*, Oxford and New York 1983, 63—82.
16. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. [W:] *Nervous System*. Vol. I. *The basic neurosciences*. Red. D. B. Tower, *Raven Press*, New York 1975, 313—322.
17. Kleihues P., Hossmann K-A., Pegg A. E., Kobayashi K., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after one hour complete ischemia. III. Indications of metabolic recovery. *Brain Res.*, 1975, 95, 61—73.
18. Kolata R. J.: Survival of rabbits after prolonged cerebral ischemia. *Stroke*, 1979, 10, 272—277.

19. McGee-Russell S. M., Brown A. W., Brierley J. B.: A combined light and electron microscope study of early anoxic-ischemic cell change in rat brain. *Brain Res.*, 1970, 20, 193—201.
20. Mossakowski M. J., Patzer-Kwiatkowska B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*). *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287—301.
21. Nordström C. H., Rehnroona S., Siesjö B. K.: Restitution of cerebral energy state, as well as glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids after 30 minutes of complete ischemia in rats anesthetized with nitrous oxide or phenobarbital. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 479—486.
22. Plum F., Potential directions for therapy in cerebral vascular disease. W: *Cerebrovascular Disease*. Red. J. Mossy, O. M. Reinmuth, Raven Press, New York 1981, 195—204.
23. Pluta R., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgu a czynność bioelektryczna. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 41—52.
24. Pluta R., Tołowa S. W., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgowia u królika w wyniku ostrego nadciśnienia wewnątrzczaszkowego. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 365—384.
25. Pluta R.: <http://rcin.org.pl> Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska. Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa 1982.
26. Pulsinelli W. A., Levy D. E., Duffy T. E.: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia. *Ann. Neurol.*, 1982, 11, 499—509.
27. Raichle M. E.: The pathophysiology of brain ischemia. *Ann. Neurol.*, 1983, 13, 2—10.
28. Siesjö B. K.: Cell damage in the brain: A speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1981, 1, 155—185.
29. Steen P. A., Newborg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. D.: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J. Cereb. Blood Flow and Metabol.*, 1983, 3, 38—43.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi F., Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in mongolian gerbils: I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow, and local cerebral glucose utilisation changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983 a, 60, 207—216.
31. Suzuki R., Yamaguchi T., Choh-Luh Li, Klatzo I.: The effects of 5-minute ischemia in mongolian gerbils: II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA1 sector of hippocampus. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983 b, 60, 217—222.
32. Tamura A., Horioze H., Fukuda T.: Relationship of cerebral vasculature to infarcted areas following unilateral common carotid artery ligation in the Mongolian gerbils. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1981, 1, 194—195.
33. Wolfe L. S.: Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. *J. Neurochem.*, 1982, 28, 1—14.

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

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
ANDRZEJ ŻÓRAWSKI

EFFECT OF FATTY ACID-ENRICHED DIET ON THE
COMPOSITION OF FATTY ACIDS IN LIPIDS
OF CEREBRAL MYELIN DURING DEVELOPMENT *

<http://rcin.org.pl>

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Feeding on a generally deficient diet or on its abnormal composition during development of the central nervous system results in biochemical abnormalities of the nervous tissue, including severe changes in the myelin (Dobbing 1968; Patel 1983). Alimentary lipid deficiencies, essentially through the shortage of polyunsaturated fatty acids caused not only a delayed maturation of the central nervous system but also some irreversible changes in various cerebral structures (White et al. 1971; Wiggins et al. 1976). In our earlier studies (Wender et al. 1982, 1983a, c) we found that a fatty acid-deprived diet during the development of rats produces a drastic reduction of all basic myelin lipids with a changed proportion of the particular lipid fractions and altered composition of their fatty acids. Thus, in these experimental conditions a chemically malformed myelin membrane developed.

From our own observations made in an earlier study, it appears that the rats maintained during their ontogenic development on a fat-enriched diet develop a myelin membrane that is slightly impaired in its lipid composition. Myelin during the early stage of myelinogenesis is overloaded with lipids, cholesterol and plasmalogen showing significantly increased content. Mature myelin is still overloaded with lipids, the overload amounting to 30% of sulfatides, plasmalogens, inositide-, serine- and ethanolamine phosphatides showing significantly increased concentrations (Wender et al. 1986). In the present paper we deal with the effects of feeding a fat-enriched diet on the fatty acid spectrum of myelin lipids.

* Supported by the Research Grant 10.4.06.3.2 of Polish Academy of Sciences.

MATERIAL AND METHODS

Wistar rats served as experimental animals. Pregnant animals were divided into two groups. One of the experimental groups was fed an artificially composed diet containing 15% of rape seed oil. The other one, serving as the control group was fed the same diet but containing only 2% of rape seed oil. The formula of the experimental diets is presented in table 1 and the mean composition of fatty acids in the rape seed oil used is shown in table 2. The artificially composed diets were fed to both groups of pregnant females, starting 6 days before the expected delivery and then continued as the only source of food for both the nursing mothers and their offspring, over the whole postnatal period. The nourishing mixture as well as drinking water were available *ad libitum*.

Table 1. Formula of experimental diets
Tabela 1. Skład diet

	Control Kontrolna	Experimental Doświadczalna
Sucrose Sacharoza	20%	20%
Wheat flower Mąka pszenna	58%	40%
Caseine Kazeina	10%	15%
Rape seed oil Olej rzepakowy	2%	15%
Potato starch Mączka kartoflana	4%	4%
Sodium chloride Chlorek sodu	2%	2%
Choline chloride Chlorek choliny	1%	1%
Vitamins (Biovit) Witaminy (preparat Biovit)	3%	3%

Table 2. Fatty acid composition
of rape seed oil (in rel. %)

Tabela 2. Skład procentowy kwasów
tłuszczowych oleju rzepakowego

16:0	2.5
16:1	0.1
18:0	0.6
18:1	10.8
18:2	12.3
18:3	7.2
20:0	0.2
20:1	6.2
20:2	0.5
22:0	0.3
22:1	57.9
unidentified niezidentyfikowane	1.4

The animals were killed at various stages of their postnatal life i.e., at the age of 21, 30 and 60 days. Each experimental and control group consisted of 6 rats.

Biochemical procedure. The myelin fraction was isolated by means of differential centrifugation according to Norton and Poduslo (1973). Total lipids were extracted from the myelin fraction by the method described by Folch-Pi et al. (1957) and then further separated by means of combined column and thinlayer chromatography as described in our previous publication (Wender et al. 1978).

The myelin lipids were subjected to methanolysis and the fatty acyl methyl esters thus obtained were separated by means of gas-liquid chromatography on the Pye 104 gas chromatograph equipped with a flame ionizing detector, as described in detail in our previous publication (Wender et al. 1983).

Histological techniques. Celloidine embedded sections were stained using the methods of Woelcke, Nissl and hematoxylin-eosin and those embedded in paraffin with the techniques of Nissl and Klüver-Barrera.

RESULTS

Histological evaluation of the brains of animals kept on a fat-enriched diet did not reveal any signs of demyelination or dysmyelination.

Comparison of results of individual fatty acids of the myelin fractions obtained in the experimental groups maintained on a fat enriched diet over a period ranging from the last week of intrauterine life till their sacrifice and in the control ones demonstrated only insignificant changes without any particular direction of changes.

The summarizing account of results of total saturated and unsaturated fatty acids of all main myelin lipids is presented in tables 3 to 10 and did not demonstrate any significant changes.

Tabela 3. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in phosphatidylcholine of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 3. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych fosfatydocholiny mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
Total saturated FA Łącznie nasycone kwasy tłuszczowe	55.4±2.8	54.9±3.4	53.5±3.8	54.9±3.6	47.8±2.4	54.7±3.7
Total unsaturated FA Łącznie nienasycone kwasy tłuszczowe	44.1±4.4	34.5±4.7	38.8±1.8	43.1±4.3	47.9±2.3	42.6±2.9
Total unidentified FA Łącznie niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe	0.5±0.3	10.6±3.6	7.7±1.5	2.0±0.4	4.3±1.6	2.7±0.5

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 4. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in sphingomyelins of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tablica 4. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych sfingomielin mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe	46.9±5.9	54.9±1.9	54.9±1.9	50.4±5.0	50.7±4.0	42.8±3.2
Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe	42.6±7.4	43.3±7.0	43.3±7.0	45.7±8.4	40.6±7.5	46.1±4.9
Total unidentified FA Całkowite niezidentyfiko- wane kwasy tłuszczowe	10.5±3.0	1.8±0.9	1.8±0.9	3.9±1.1	8.7±3.0	11.1±3.6

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 5. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in phosphatidylserine + phosphatidylinositide fraction of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tablica 5. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych frakcji fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe	41.7±7.0	53.6±4.4	51.6±1.5	46.8±2.4	46.9±3.1	50.6±2.7
Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe	51.2±10.2	42.0±4.5	42.1±3.7	43.2±2.0	46.9±4.1	44.1±3.1
Total unidentified FA Całkowite niezidentyfiko- wane kwasy tłuszczowe	7.1±2.9	4.4±2.0	6.3±1.7	10.0±2.0	6.2±4.1	5.3±1.4

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 6. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in phosphatidylethanolamine of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 6. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych fosfatydyloetanolaminy mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
total saturated FA kwasów nasyconych tłuszczowych	51.1±1.7	51.0±3.9	51.8±1.6	50.1±3.0	51.7±3.1	48.2±4.3
total unsaturated FA kwasów nienasyconych tłuszczowych	44.7±2.2	44.3±6.2	42.4±2.7	44.4±4.4	43.9±4.1	41.0±5.9
total unidentified FA kwasów niezidentyfikowanych tłuszczowych	4.2±0.9	4.7±1.5	5.8±2.5	5.5±1.5	4.4±3.2	10.8±2.2

<http://rcin.org.pl>

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 7. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in plasmalogens of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 7. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych plazmalogenów mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
total saturated FA kwasów nasyconych tłuszczowych	26.4±1.6	25.2±2.8	17.9±1.0	22.5±2.3	14.8±1.3	14.7±2.5
total unsaturated FA kwasów nienasyconych tłuszczowych	67.0±2.7	66.8±5.5	69.4±3.6	65.1±4.1	74.4±4.6	70.6±4.1
total unidentified FA kwasów niezidentyfikowanych tłuszczowych	6.6±0.8	8.0±2.0	12.7±0.8	12.4±5.1	10.8±2.1	14.7±2.4

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 8. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in cholesterol esters of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 8. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych estrów cholesterolu mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe	31.4±1.7	39.3±4.0	41.3±4.9	40.6±2.4	40.1±1.7	38.5±1.7
Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe	65.1±5.1	59.8±4.0	56.8±5.1	59.4±7.9	59.3±4.6	53.9±4.6
Total unidentified FA Całkowite niezidentyfiko- wane kwasy tłuszczowe	3.5±2.1	1.9±0.9	1.9±1.9	0	0.6±0.2	7.6±4.6

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 9. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in cerebrosides of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 9. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych cerebrozydów mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe	47.3±2.5	48.4±3.0	54.3±3.1	53.7±2.9	50.0±2.9	41.2±3.0
Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe	46.1±3.2	43.8±4.4	42.4±3.2	44.4±6.1	45.9±4.0	51.2±6.1
Total unidentified FA Całkowite niezidentyfiko- wane kwasy tłuszczowe	6.6±2.2	7.8±2.3	3.3±0.2	1.9±0.9	4.1±1.1	7.6±2.3

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 10. Effect of fatty acid-enriched diet on composition of fatty acids in sulfatides of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 10. Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na skład kwasów tłuszczowych sulfatydów mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	21 days 21 dni		30 days 30 dni		60 days 60 dni	
	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie	control kontrola	experimental doświadczenie
Total saturated FA Łącznikowe nasycone kwasy tłuszczowe	39.9±1.9	43.1±4.0	42.3±4.2	51.5±3.3	47.2±1.9	52.3±1.9
Total unsaturated FA Łącznikowe nienasycone kwasy tłuszczowe	52.5±7.0	53.7±7.5	46.8±5.4	43.8±3.7	48.2±7.7	41.0±5.7
Total unidentified FA Łącznikowe niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe	7.6±2.8	3.2±1.4	10.9±3.0	4.7±1.7	4.6±1.4	6.7±0.9

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

DISCUSSION

The myelin lipid spectrum, i.e. the proportions of the individual lipids constituting the myelin membrane showed only minor changes in the experimental conditions of fat excess during the brain maturation and we are not entitled to assume that chronic ingestion of a fat-enriched diet over the whole ontogenic developmental period leads to formation of chemically aberrant myelin (Wender et al. 1982, 1983b). The latter observations were confirmed and developed in the present studies, demonstrating a lack of significant changes in the fatty acid pattern of individual lipid fractions of the cerebral myelin.

In the experimental conditions of a fat-deprived dietary regime, it is the deficiency of essential fatty acids which was demonstrated by all myelin phospholipids and glycolipids, a significant drop of percentages of saturated fatty acids, and a marked increase of proportions of unsaturated, mainly polyunsaturated fatty acids (Wender et al. 1983a, c). We have also assumed that the relatively high activity of desaturating enzymes could be responsible for the increased proportions of unsaturated fatty acids. In cerebroside and sulfatide some normalization of the fatty acid spectrum occurred with advancement of the rat's age. Esterified cholesterol was the only lipid fraction that did not show the characteristic accumulation of unsaturated fatty acids.

Comparison of the effect of an overdue and undue supply of fatty acids in the diet in the process of myelinogenesis indicates that only fatty acid deficiency leads to dysmyelination, whereas on a fat-enriched diet the myelin membrane develops being only slightly overloaded with lipid components and without any changes in the pattern of fatty acids of the individual myelin lipids.

CONCLUSIONS

1. Rats maintained during their maturation on a fat-enriched diet develop a myelin membrane with a normal pattern of fatty acids in the individual myelin lipids.

2. Comparison of an overdue and undue supply of fatty acids in the diet during rat ontogenic development indicates that fatty acid deficiency leads only to formation of myelin with an aberrant pattern of fatty acids in the individual lipid fractions.

WPLYW DIETY Z PODWYŻSZONĄ ZAWARTOŚCIĄ KWASÓW TŁUSZCZOWYCH NA SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH LIPIDÓW MIELINY W OKRESIE ROZWOJU

Streszczenie

Przeprowadzono badanie wpływu diety z podwyższoną zawartością kwasów tłuszczowych na skład kwasów tłuszczowych lipidów mieliny w okresie rozwoju. Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Szczury żywione w okresie rozwoju dietą z nadmiarem kwasów tłuszczowych nie wykazują różnic w składzie kwasów tłuszczowych poszczególnych lipidów mieliny.

2. Porównanie wpływu diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe i z obniżoną zawartością kwasów tłuszczowych w okresie rozwoju ontogenetycznego szczura wskazuje, że tylko niedobór kwasów tłuszczowych powoduje zmiany w składzie kwasów tłuszczowych poszczególnych frakcji lipidowych.

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ НА СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ МИЕЛИНА В ПЕРИОДЕ РАЗВИТИЯ

Резюме

Авторы провели исследования диеты с повышенным содержанием жирных кислот на состав жирных кислот липидов миеллина в периоде развития.

Результаты исследований привели к следующим выводам:

1. Крысы кормленные в периоде развития диетой с избытком жирных кислот не проявляют разниц в составе жирных кислот отдельных липидов миеллина.

2. Сопоставление влияния диеты обогащенной жирными кислотами и со сниженным содержанием жирных кислот в периоде онтогенетического развития показывает, что только недостаток жирных кислот вызывает изменения в составе жирных кислот отдельных липидных фракций.

REFERENCES

1. Dobbing J.: Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system. In: Malnutrition, learning and behaviour. Eds. Serimshaw N., Gordon J., M i T Press, Cambridge, Mass., 1968, 181—202.
2. Folch-Pi J., Lees J., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.*, 1957, 226, 497—511.
3. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brains; method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—757.
4. Patel A.: Undernutrition and brain development. *Trends in Neurosciences*, 1983, 6, 151—154.
5. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 153—162.
6. Wender M., Adamczewska-Gonczewicz Z., Żórawski A., Gonczewicz A.: The effect of improver diet on the process of myelination. Second Intern. Symposium on Myelination and Demyelination, Varna 1982, 10—11.
7. Wender M., Adamczewska-Gonczewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acid deficient diet on myelin lipids of the rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983a, 21, 35—43.
8. Wender M., Adamczewska-Gonczewicz Z.: Effect of a fatty acid enriched diet on myelin lipids of the developing rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983b, 21, 353—362.
9. Wender M., Adamczewska-Gonczewicz Z., Żórawski A.: Fatty acid composition of myelin lipids in developing rats kept on a fat deficient diet. *Neuropat. Pol.*, 1983c, 21, 363—376.
10. White H., Jr., Galli C., Paoletti R.: Brain recovery from essential fatty acid deficiency in developing rats. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 869—882.
11. Wiggins R., Miller J., Benjamins J., Krigman M., Morell P.: Myelin synthesis during postnatal nutritional deprivation. *Brain Res.*, 1976, 107, 257—264.

Authors' address: Department of Neurology School of Medicine, 49 Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań.

MIECZYŚŁAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
ANDRZEJ GONCERZEWICZ

INFLUENCE OF UNAPPROPRIATE DIET DURING DEVELOPMENT
ON THE SUSCEPTIBILITY TO EXPERIMENTAL ALLERGIC
ENCEPHALOMYELITIS *

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

The pathomorphological picture in experimental allergic encephalomyelitis (EAE) closely resembles the pathology of human demyelinating diseases, hyperacute EAE corresponding to acute haemorrhagic, and ordinary EAE to acute perivenous leucoencephalitis. Models of chronic or chronic relapsing EAE closely resembled the alterations found in acute and chronic multiple sclerosis (Lassmann, Wiśniewski 1978, 1979). However, as long as the etiopathogenesis of demyelinating diseases in humans is not definitively solved, the question whether EAE may be considered as experimental model of multiple sclerosis (MS) or only as a model of postvaccinal or postinfectious encephalomyelitis remains still open. Nevertheless, the thorough study of several aspects of EAE supplied very many important data to the knowledge of immunological events in diseases of the nervous system.

The crucial role in neuroallergic processes is played by the protein-lipid membranes of myelin sheaths. The function of the protein-lipid interaction in all biological membranes, including myelin, is qualitatively dependent on the balance of the chain length and the degree of unsaturation of its fatty acids. It is also known that regulation of membrane-bound enzymes can be influenced by relatively small variations of the concentrations of certain polyunsaturated fatty acids within the membrane (Farias et al, 1975). Furthermore, epidemiological evidence of a possible correlation between dietary fat intake and the geographical distribution of MS has been provided by various authors (Swank, 1950; Bernsohn, Stephanides, 1967). This led to the inclusion of dietary factors in discussions of the ethiology of MS and even to therapeutic trials based on special diets consisting of low fat intake and oil or linoleic supplementation (Paty 1983).

* This investigation was supported by the Research Grant 10.4.06.3.2. of Polish Academy of Sciences.

Despite the fact, that the latter problems are only hypothetical ones, it seems to be of general interest to examine the question of the effect of changes in the diet fat content during development on the susceptibility of animals to the action of the encephalitogenic antigen. The present studies compare the susceptibility to induction of EAE exhibited by rats fed a normal diet and rats bred and raised on a fat-deficient or fat-enriched diet.

MATERIAL AND METHODS

Wistar rats served as experimental animals. Pregnant females were divided into three groups, one was fed on an artificially composed diet containing 0.2% of rape seed oil (fat-deficient diet), the second group was fed on the same diet supplemented with 20% of rape seed oil (fat-enriched diet), and the third one, serving as control group was fed a diet containing 2% of rape seed oil. The exact formulae of the experimental diets are presented in table 1.

Table 1. Formula of the experimental diets
Tabela 1. Zestawienie diet

	Control diet Dieta kontrolna	Fat-deficient diet Dieta niedoborowa	Fat-enriched diet Dieta wzbogacona
Sucrose			
Sacharoza	200 g	200 g	200 g
White meal			
Mąka pszenna	580 g	604 g	400 g
Caseine			
Kazeina	100 g	95 g	150 g
Rape seed oil	20 g	1.2 g	150 g
Olej rzepakowy			
Potato starch	40 g	40 g	40 g
Skrobia ziemniaczana			
Sodium chloride	20 g	20 g	20 g
Chlorek sodowy			
Choline chloride	10 g	10 g	10 g
Chlorek cholinowy			
Multivitamin preparation	30 g	30 g	30 g
Mieszanka witaminowa			
kcal/kg	3414	3309	4150

The experimental diets were fed to all groups of pregnant rats starting 6 days before the expected delivery and then continued as the only source of food for both the nursing mothers and their offspring, over the whole postnatal period. The nutrient mixture as well as drinking water were available *ad libitum*.

At the age of three months, a time when myelination is known to be completed in the rat, the animals were challenged with encephalitogenic antigen. They received the following treatment: a double injection of 0.1 ml of encephalitogenic mixture for three successive days, into each hind foot pad. The composition of the encephalitogenic mixture was as follows: 40% homogenate of cerebral rat white matter in complete Freund's adjuvant, containing 10 mg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis*.

Clinical rating was based on the work of Elliot et al. (1973):

I° — slowing of movements, slightly wobbly gait, weight loss, general weakness,

II° — weakness of hind limbs to slight paresis, altered (ataxic) gait,

III° — moderate paraparesis of hind limbs, urine incontinence,

IV° — severe paraparesis to paralysis, impaired respiration.

The dynamics of the disease's progress was rated as follows:

I° — nonprogressive type. Intensity of illness of grade I during the first 7 days,

II° — slowly progressing type. Intensity of the disease of grade I—II during the first 7 days,

III° — acute type. Intensity of the disease reaching grades III—IV in two days,

IV° — fulminant type. Progress of the disease to the IVth grade in the course of the first day.

Morphological evaluation of the experimental disease based on the histology of the brain and spinal cord fragments stained by hematoxylin-eosin, Nissl or Spielmeyer methods was rated with the slightly modified scale of Alvord and Kies (1959).

I — mild cellular reaction, visible in single, topographically typical places,

II° — disseminated inflammatory reaction seen as severe perivascular infiltrates in few microscopical fields or weak infiltrates in many fields,

III° — severe, perivascular infiltrates, locally diffused, seen in all microscopical fields under 30 × magnification in typical regions.

The animals of all experimental groups were killed on the 8th day after the first vaccination (preparalytic period) or between the 16—25th day after inoculation, according to the general condition of the animal (paralytic period).

Chemical studies. The myelin fraction was isolated by means of differential centrifugation of the cerebral homogenate in a discontinuous sucrose gradient (0,32 and 0,85 M, pH 7.0) essentially according to Norton and Poduslo (1973). The isolated myelin fraction was washed three times with distilled water, each washing procedure being followed by centrifugation at 75 000 g for 15 min. The final sediment was then lyophilized.

Table 2. Effect of changes in fatty acids content in diet on the clinical picture of EAE in rats
 Tabela 2. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz kliniczny EAE u szczurów

Kind of evaluation Sposób oceny	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa			Fat-enriched diet Dieta wzbogacona			Statistical evaluation Ocena statystyczna
	examined animals zwierzęta badane	ill animals zwierzęta chore	examined animals zwierzęta badane	ill animals zwierzęta chore	examined animals zwierzęta badane	ill animals zwierzęta chore	examined animals zwierzęta badane	ill animals zwierzęta chore	
	total number liczba	number percent liczba procent	total number liczba	number percent liczba procent	total number liczba	number percent liczba procent	total number liczba	number percent liczba procent	
General Ogólna	23	16 69.6	23	6 25.1	22	8 36.4	Comparison of percent with „u” test Porównanie procentów testem „u” ... Deficit — Control Niedobór — Kontrola $u = 2.95^*$ ($u_{0,01} = 2.58$) Overdue — Control Nadmiar — Kontrola $u = 2.23^{**}$ ($u_{0,05} = 1.96$)		
Dynamics of the	I	6 37.5		3 50.0		3 37.5	Test of independence chi-square		

Clinical rating in 4-degree scale	I	6	37.5	3	50.0	3	37.5	Test of independence chi- -square
Ocena punktowa wg 4-stopniowej skali	II	3	18.8	2	33.3	1	12.5	Test niezależności chi- -kwadrat
	III	2	12.5	1	16.7	1	12.5	$\chi^2 = 3.0989$
	IV	5	31.3	0	0.0	3	37.5	Degree of freedom 6 Liczba stopni swobody 6 $\chi^2_{6,0.05} < 12.59$
disease process in 4-degree scale	II	4	25.0	2	33.3	2	25.0	Test niezależności chi- -kwadrat
Dynamika choroby w 4-stopniowej skali	III	3	18.8	1	16.7	2	25.0	$\chi^2 = 1.6145$
	IV	3	18.8	0	0.0	1	12.5	Degree of freedom 6 Liczba stopni swobody 6 $\chi^2_{6,0.05} < 12.59$

** highly statistically significant — statystycznie wysoce znamienny

* statistically significant — statystycznie znamienny

Total lipids of the myelin fraction were extracted by means of the procedure described by Folch-Pi et al. (1973) and then further separated by means of combined column and thin layer chromatography as described in our previous publication (Wender et al. 1978).

For statistical evaluation of the clinical and morphological data the chi-square test for small numbers was used. The results of chemical studies were statistically checked by the Student's t-test.

RESULTS

The clinical syndrome of EAE developed in almost 70% of animals maintained on the control diet, whereas only in 26% rats receiving the fat-deficient diet, and in 36% of animals bred and raised on a fat-enriched diet. The differences between the experimental groups and the control one are statistically significant. The intensity of the experimental disease and its dynamics did not show any difference between the three groups (Tab. 2). The morphological findings of EAE were in keeping with the clinical picture. The highest percentage of inflammatory changes in the central nervous system was noted in the control group (68% of rats). The animals receiving the fat-deficient or fat-enriched diet reacted in a markedly lower percentage (21% and 36%, respectively). The above described differences are significant. The rated intensity of the pathological process did not demonstrate any significant differences between the experimental groups, despite the fact, that only some animals fed a normal diet developed the III intensity grade of the inflammatory reaction. The results are summarized in table 3.

The pattern of myelin lipids in the group of animals developing on normal diet did not show any significant differences in the preparalytic period (8th day after inoculation) as well as in the period of fully developed experimental disease (18—24th day after sensitization) as compared with normal rats. However, very pronounced changes in the course of EAE were noticed in the group of animals growing on the fat-deficient diet. All phospholipid fractions demonstrated an absolute and relative decrease, concomitantly with the rise of cerebroside content. The latter change is more marked when calculated in relative proportion.

The above described changes in the lipid pattern of the myelin membrane are rather more pronounced in the preparalytic period than in the stage of fully developed picture of EAE. In the last period only part of the presented changes is significant. When the deviations in the lipid structure of myelin are compared between the group of animals bred and raised on the fat-enriched diet *versus* the fat-deficient one, it should be stressed that the general direction of changes is similar, but deviations are weaker in the first group. A full detailed account of results is presented in tables 4—9.

Tabela 3. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz morfologiczny EAE u szczurów

Kind of evaluation	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona		Statistical evaluation	
	total number of animals	animals with inflammatory process	total number of animals	animals with inflammatory process	total number of animals	animals with inflammatory process		
Sposób oceny	ogólna liczba zwierząt	zwierzęta z procesem zapalnym number percent liczba procent	ogólna liczba zwierząt	zwierzęta z procesem zapalnym number percent liczba procent	ogólna liczba zwierząt	zwierzęta z procesem zapalnym number percent liczba procent	Ocena statystyczna	
General							Comparison of percent with „u” test Porównanie procentów testem „u”	
Ogólna	22	15 68.2	24	5 20.8	22	8 36.4	Deficit — Control Niedobór — Kontrola $u = 3.24^{**}$ ($u_{0.01} = 2.58$) Deficit — Overdue Niedobór — Nadmiar $u = 1.17^*$ Overdue — Control Nadmiar — Kontrola $u = 2.11$ ($u_{0.05} = 1.96$)	
Rated with the 4-degree scale	I	7 46.7		5 100		6 75	Test of independence chi-square	
Ocena punktowa w skali 4-stopniowej	II	4 26.7		0 0		2 25	Test niezależności chi-kwadrat	
	III	4 26.7		0 0		0 0	$\chi^2 = 6.64$	
	IV	— —		— —		— —	Degree of freedom 4 Liczba stopni swobody 4 $\chi^2_{4,0.05} = 9.49$	

** highly statistically significant — statystycznie bardzo znamieny

* statistically significant — statystycznie znamieny

Table 4. Effect of changes in fatty acids content in diet on the pattern of myelin lipids in the preparalytic period of EAE, expressed in nmol/100 g dry tissue

Tabela 4. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz lipidów mieliny w okresie przedporażennym EAE wyrażony w nmo l/100 g tkanki suchej

	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona	
	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE
Cholesterol						
Cholesterol	36.6±1.7	22.6±0.8	34.1±2.3	18.9±0.7	45.0±3.6	15.5±0.5
Total galactolipids						
Całkowite galaktolipidy	19.1±0.9	14.5±0.5	15.3±1.0	19.6±2.3	19.7±1.1	12.0±0.8
Cerebrosides						
Cerebrozydy	16.2±0.9	12.4±0.4	12.8±1.0	18.8±2.2	15.5±0.5	8.8±0.6
Sulfatides						
Sulfatydy	2.9±0.2	2.2±0.1	2.5±0.2	0.9±0.1	4.3±0.6	3.1±0.3
Total phospholipids						
Całkowite fosfolipidy	25.2±1.1	19.3±0.8	23.7±1.1	12.2±1.0	42.3±1.3	16.7±0.6
Sphingomyelins						
Sfingomieliny	3.8±0.6	1.7±0.04	2.0±0.1	0.9±0.1	3.6±0.2	1.1±0.07
Phosphatidylcholine						
Fosfatydylocholina	7.3±0.7	6.0±0.4	6.5±0.3	3.4±0.2	10.4±0.9	5.3±0.09
Lysophosphatidylcholine						
Lizofosfatydylocholina	1.1±0.1	0.9±0.1	0.9±0.2	0.4±0.05	3.9±0.7	0.9±0.1
Phosphatidylserine + phosphatidylinositide	1.8±0.2	1.9±0.1	2.8±0.2	1.2±0.2	5.4±0.4	1.4±0.1
Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol						
Phosphatidylethanolamine						
Fosfatydyloetanolamina	3.5±0.4	2.5±0.1	3.1±0.1	1.8±0.1	7.1±1.1	1.9±0.2
Plasmalogen						
Plazmalogen	7.6±0.6	6.4±0.2	8.4±0.4	4.5±0.4	11.8±1.1	6.1±0.4

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ±S.E.

Średnia ±S.E.

DISCUSSION

From our observations made in an earlier study, it appeared that the maintenance of pregnant rats and of their offspring on a lipid-deprived diet results in the reduction of basic myelin lipids, the deficit growing continuously with advancing postnatal age (Wender et al., 1983a). Animals kept on this diet develop a myelin differing significantly also in respect to the fatty acid composition of the main lipid constituents, and, thus, all main phospholipid and glycolipid fractions of the experimental rats exhibit a considerable decline of the percentage of saturated fatty acids and a marked increase of the unsaturated ones (Wender et al.,

Table 5. Effect of changes in fatty acids content in diet on the pattern of myelin lipids in the preparalytic period of EAE expressed in % of total lipids

Tabela 5. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz lipidów mieliny w okresie przedporażkowym EAE wyrażony w % ogólnej zawartości lipidów

Lipids Lipidy	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona	
	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE
Cholesterol						
Cholesterol	26.6±1.3	24.3±1.1	21.7±1.1	22.0±1.3	24.8±1.4	20.6±1.2
Cholesterol esters						
Estry cholesterolu	ślady	0.6±0.1	1.4±0.03	0.9±0.1	0.5±0.05	0.6±0.1
Total galactolipids						
Całkowite galaktolipidy	36.3±1.2	34.0±1.0	27.4±1.9	49.1±1.9	25.5±2.4	35.1±1.9
Cerebrosides						
Cerebrozydy	30.7±0.9	28.4±0.8	21.2±1.2	46.7±1.8	19.2±1.9	25.1±1.4
Sulfatides						
Sulfatydy	5.6±0.6	5.6±0.3	6.2±0.7	2.4±0.2	7.0±0.9	10.0±0.6
Total phospholipids						
Całkowite fosfolipidy	37.1±0.7	41.1±1.0	49.5±1.5	28.0±1.0	49.4±1.5	43.7±1.8
Sphingomyelins						
Sfingomieliny	2.8±0.2	3.8±0.1	3.1±0.2	2.2±0.1	4.2±0.4	3.1±0.2
Phosphatidylcholine						
Fosfatydylocholina	11.0±1.1	13.4±0.6	14.4±0.6	8.1±0.3	11.9±1.2	14.6±0.8
Lysophosphatidylcholine						
Lizofosfatydylocholina	0.9±0.1	1.3±0.2	3.6±0.2	0.7±0.1	3.0±0.3	1.6±0.3
Phosphatidylserine + phosphatidylinositol						
Fosfatydyloseryna + fosfatydyloizytol	4.3±0.4	4.7±0.2	6.7±0.6	3.2±0.2	6.4±0.7	4.4±0.3
Phosphatidylethanolamine						
Fosfatydyloetanolamina	4.2±0.3	5.0±0.2	7.6±0.2	3.9±0.4	6.2±0.9	4.8±0.5
Plasmalogen						
Plazmalogen	13.6±0.5	12.9±0.3	14.1±0.6	9.9±0.5	13.3±1.0	15.2±0.8

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ±S.E.

Średnia ±S.E.

1983b). Rats kept during their ontogenic development on a fat-enriched diet develop a myelin membrane that is slightly overloaded with lipid components (Wender et al., 1983c). In a fat-deprived or fat-enriched dietary regime, it is deficiency or excess of essential fatty acids, particularly of linoleate and linolenate that constitute the significant pathogenic factor in this experimental condition and this indicates that the process of myelinogenesis is sensitive to both an overdue and undue supply of fatty acids in the diet, but fatty acid deficiency only leads to the formation of a chemically aberrant myelin membrane.

Table 6. Effect of changes in fatty acids content in diet on the pattern of myelin phospholipids in the preparalytic period of EAE expressed in % of total phospholipids

Tabela 6. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz fosfolipidów mieliny w okresie przedporażennym EAE wyrażony w % ogólnej zawartości fosfolipidów

Phospholipids Fosfolipidy	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona	
	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE
Sphingomyelins Sfingomieliny	7.6±0.1	9.1±0.4	8.9±0.5	7.7±0.3	9.2±1.9	7.0±0.4
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	29.8±0.7	32.5±0.7	28.2±1.0	29.4±0.4	26.5±2.4	33.7±1.3
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	2.4±0.04	3.1±0.3	6.8±1.0	2.5±0.3	6.7±1.2	3.9±0.7
Phosphatidylserine + fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	12.1±0.2	11.4±0.3	13.0±1.2	11.1±0.8	14.3±1.0	10.0±0.5
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	11.4±0.1	12.3±0.6	15.0±0.3	13.9±0.5	16.2±2.4	10.8±0.9
Plasmalogen Plazmalogen	34.3±0.6	31.6±0.5	27.7±0.5	35.4±0.8	27.1±2.4	34.6±0.4

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

In our present studies we have found that the changes in the fatty acid content in the diet decrease significantly the incidence rate of experimental allergic encephalomyelitis induced by sensitization with rat cerebral white matter in complete Freund's adjuvant. We assume that the changed lipid composition of myelin induced by the unsuitable (undue or overdue) content of fatty acids in the diet decreases the immunological reactivity of animals to the encephalitogenic antigen.

The above results are in controversy with those found by Clausen and Møller (1967), who indicated that a diet adequate in polyunsaturated fatty acids (PUFA) completely protected rats from EAE. In these studies all animals raised on a diet deficient in PUFA developed some neurological signs of EAE, whereas no neurological sign occurred in control animals. This is a surprising finding because the strain of rats used in the study (Wistar rats) has been shown to be highly susceptible to EAE. Selivonchik and Johnston (1973) who also studied the effect of fat deficiency during development on the susceptibility to EAE, used the Sprague-Dowley strain with relatively low susceptibility to EAE. However, in the experiments of those authors the disease developed in some animals in the experimental and the control groups.

Table 7. Effect of changes in fatty acids content in diet on the pattern of myelin lipids in the paralytic period of EAE expressed in nMol/100 g of dry tissue

Tabela 7. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz lipidów mieliny w okresie porażennym EAE wyrażony w nMol/100 g tkanki suchej

Lipids Lipidy	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona	
	control kontrola	AEE	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE
Cholestrol						
Cholestrol	36.6±1.7	33.8±1.0	34.1±2.3	16.8±1.5	45.0±3.6	15.0±1.5
Total galactolipids						
Całkowite galaktolipidy	19.1±0.9	17.8±1.4	15.3±1.0	12.1±0.5	19.7±1.1	8.4±0.5
Cerebrosides						
Cerebrozydy	16.2±0.9	15.4±1.2	12.8±1.0	11.3±0.5	15.5±0.5	7.2±0.5
Sulfatides						
Sulfatydy	2.9±0.2	2.5±0.1	2.5±0.2	0.8±0.06	4.3±0.6	1.2±0.2
Total phospholipids						
Całkowite fosfolipidy	25.2±1.1	22.8±0.6	23.7±1.1	15.1±0.9	42.3±1.3	10.5±0.9
Sphingomyelins						
Sfingomieliny	3.8±0.6	1.5±0.06	2.0±0.1	1.1±0.2	3.6±0.8	0.8±0.06
Phosphatidylcholine						
Fosfatydylocholina	7.3±0.7	7.0±0.2	6.5±0.3	4.2±0.7	10.4±0.9	2.8±0.3
Lysophosphatidylcholine						
Lizofosfatydylocholina	1.1±0.1	1.4±0.1	0.9±0.1	1.2±0.09	3.9±0.7	0.5±0.1
Phosphatidylserine + phosphatidylinositol						
Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	1.8±0.2	1.9±0.2	2.8±0.2	1.3±0.3	5.4±0.4	1.2±0.1
Phosphatidylethanolamine						
Fosfatydyloetanolamina	3.5±0.4	3.2±0.1	3.1±0.1	2.0±0.3	7.1±1.1	1.6±0.1
Plasmalogen						
Plazmalogen	7.6±0.6	7.8±0.4	8.4±0.4	5.3±1.1	11.8±1.0	3.7±0.4

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Fatty acid metabolism may be affected in multiple sclerosis, the disturbances being caused either by nutritional factors or by a defect in metabolic pathways, or by both. Epidemiological evidence of a possible correlation between dietary fat intake and the geographical distribution of MS has been provided by various authors. For a review of this subject see Martin and Meade (1977). This led to the inclusion of dietary factors in addition to others such as immunological ones into the discussion of the etiopathogenesis of MS.

It has been shown by several workers that in MS there are changes in the relative proportion of saturated and unsaturated fatty acids in the

Table 8. Effect of changes in fatty acids content in diet on the pattern of myelin lipids in the paralytic period of EAE expressed in % of total lipids

Tabela 8. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz lipidów mieliny w okresie porażennym EAE wyrażony w % ogólnej zawartości lipidów

Lipids Lipidy	Control diet Dieta kontrola		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona	
	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE
Cholesterol						
Cholesterol	26.6±1.3	28.8±0.5	21.7±1.1	22.8±1.1	24.8±1.4	27.6±0.6
Cholesterol esters						
Estry cholesterolu	ślady	0.4±0.01	1.4±0.03	1.2±0.1	0.5±0.05	1.2±0.1
T total galactolipids						
Całkowite galaktolipidy	36.3±1.2	32.7±1.6	27.4±1.9	35.9±1.3	25.5±2.4	34.1±2.4
Cerebrosides						
Cerebrozydy	30.7±0.9	27.7±1.4	21.2±1.2	33.3±1.1	19.2±1.9	28.8±1.5
Sulfatides						
Sulfatydy	5.6±0.6	5.0±0.2	6.2±0.7	2.6±0.2	7.0±0.9	5.3±0.2
Total phospholipids						
Całkowite fosfolipidy	37.1±0.7	38.1±2.0	49.5±1.5	40.1±1.6	49.4±1.5	37.1±2.8
Sphingomyelins						
Sfingomieliny	2.8±0.2	2.6±0.01	3.1±0.2	3.0±0.1	4.2±0.4	3.0±0.2
Phosphatidylcholine						
Fosfatydylocholina	11.1±1.1	12.5±0.6	14.4±0.6	11.8±0.3	11.9±1.2	10.4±0.9
Lyso phosphatidylcholine						
Lizofosfatydylocholina	0.9±0.1	1.6±0.2	3.6±0.2	2.3±0.1	3.0±0.3	1.1±0.3
Phosphatidylserine + phosphatidylinositol						
Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	4.3±0.4	3.7±0.4	6.7±0.6	4.1±0.4	6.4±0.7	4.8±0.4
Phosphatidylethanolamine						
Fosfatydyloetanolamina	4.2±0.3	5.2±0.2	7.6±0.2	5.2±0.2	6.2±0.9	5.4±0.3
Plasmalogen						
Plazmalogen	13.6±0.5	12.5±0.6	14.1±0.6	13.7±0.5	13.3±1.0	12.4±0.7

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

brain lipids and also that there is a lowered level of linoleate in the serum, platelets, and in red blood cells of patients with MS. However Belin et al. (1971) failed to obtain evidence of a defect in the absorption of linoleate from the digestive tract. Thus, the disturbances of fatty acid metabolism in MS might be caused either by nutritional factors or by a defect in the metabolic pathways or by both. On the basis of these observations, an inborn error of fatty acid metabolism in MS, probably accentuated by dietary factors, has been postulated by Thompson (1971) allowing an environmental factor such as a virus infection to participate

Table 9. Effect of changes in fatty acids content in diet on the pattern of myelin phospholipids in the paralytic period of EAE expressed in % total phospholipids

Tabela 9. Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na obraz fosfolipidów mieliny w okresie porażennym EAE wyrażony w % ogólnej zawartości fosfolipidów

Phospholipids Fosfolipidy	Control diet Dieta kontrolna		Fat-deficient diet Dieta niedoborowa		Fat-enriched diet Dieta wzbogacona	
	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE	control kontrola	EAE
Sphingomyelins Sfingomieliny	7.6±0.1	6.9±0.2	8.9±0.5	7.6±0.3	9.2±1.9	7.9±0.3
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	29.8±0.7	32.8±1.1	28.2±1.0	29.4±0.8	26.5±2.4	27.8±0.6
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	2.4±0.04	4.4±0.5	6.8±1.0	5.7±0.4	6.7±1.2	2.9±0.6
Phosphatidylserine + phosphatidylinositol Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	12.1±0.2	9.6±0.4	13.0±1.2	10.0±0.8	14.3±1.0	13.1±0.5
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	11.4±0.1	13.5±0.7	5.0±0.3	13.1±0.5	16.2±2.4	14.6±0.6
Plasmalogen Plazmalogen	34.3±0.6	32.8±1.2	27.7±0.5	34.2±1.1	27.1±2.4	33.7±1.4

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± ó.E.

through immunological processes in the pathological changes of the central nervous system. Despite some previous reports that dietary treatment consisting of low fat intake and oil supplementation for more than 20 years had a beneficial effect on the course of MS and the survival rate, Paty (1983) reported a double-blind trial of linoleic acid in MS, without any therapeutic benefit from the use of linoleic acid during his 30-months trials. That is why it should be stressed that the question concerning the significance of disturbances in fatty acid metabolism in MS still remains open, and experimental studies have a high value for the understanding of the role of polyunsaturated fatty acids in the pathomechanism of neuroallergic processes. Of particular interest are the studies of Selivonchick and Johnston (1975) who have testified that a supplementation of linoleic acid, probably as the precursor of prostaglandins, has a marked protective effect against EAE. Prostaglandins have been shown to elicit an antiinflammatory action, possibly by inhibition of lysosomal enzyme release via a mechanism involving cyclic AMP (Ignarro et al., 1972).

This mechanism may be responsible for the decreased EAE susceptibility of our animals kept on a fat-enriched diet. However, we have

also noted a very marked reduction of EAE susceptibility in the group of rats developing on the fat-deficient diet. The latter conditions influenced not only the incidence rate on EAE but also affected and changed the reaction of myelin lipids in the course of neuroallergic process provoked by the encephalitogenic antigen. That is why we have concluded, that the changed chemical structure of the myelin sheath in animals growing on unappropriate diet alters and diminishes the reactivity of rats to the action of encephalitogenic antigen. The insight into the exact mechanism by which the undue or overdue fat level in the diet leads to decreased susceptibility to EAE should be an important point in the understanding of the pathomechanism of EAE.

CONCLUSIONS

1. Long lasting fat deficiency and fat overfeeding ranging from the late stage of intrauterine life throughout the whole postnatal development till maturity changes the reactivity of the central nervous tissue to the action of the encephalitogenic antigen in Wistar rats.

2. Changes in fatty acid content in the diet (undue or overdue amount) decrease significantly the incidence rate of experimental allergic encephalomyelitis induced by sensitization with rat cerebral white matter in complete Freund's adjuvant.

3. The pattern of myelin lipids in the course of EAE demonstrates in animals kept on experimental diets, as compared with those living in normal dietary condition, decreased content of all phospholipid fractions concomitantly with the rise of cerebroside content.

4. The changed lipid composition of myelin induced by an unsuitable (undue or overdue) content of fatty acids in the diet decreases the immunological reactivity of animals to the action of encephalitogenic antigen.

WPLYW ZMIAN W ZAWARTOŚCI KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W DIECIE NA WRAŻLIWOŚĆ ZWIERZĄT NA DZIAŁANIE ANTYGENU ENCEFALITOGENNEGO

Streszczenie

Przeprowadzono badania wpływu diety z obniżoną oraz podwyższoną zawartością kwasów tłuszczowych na wrażliwość zwierząt na działanie antygeny encefalitogenne.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Szczury żywione w ostatnim okresie życia płodowego oraz po urodzeniu dietą z niedoborem lub nadmiarem kwasów tłuszczowych wykazują odmienną reaktywność na antygen encefalitogeny w porównaniu ze zwierzętami żywionymi dietą normalną.

2. Zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie obniżają zapadalność na doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia, określoną tak kryteriami klinicznymi, jak i patomorfologicznymi.

3. Obraz lipidów mieliny w przebiegu doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia u zwierząt znajdujących się na diecie z niedoborem lub nadmiarem kwasów tłuszczowych wykazuje w porównaniu ze szczurami żywionymi normalną dietą obniżenie zawartości wszystkich frakcji fosfolipidowych, równoległe z podwyższeniem zawartości cerebrozydów.

4. Zmieniony skład chemiczny lipidów mieliny, powstały pod wpływem diety z nieprawidłową ilością kwasów tłuszczowych, wpływa na osłabienie reaktywności immunologicznej zwierzęcia na antygen encefalitogenny.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ В СОДЕРЖАНИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В ДИЕТЕ НА ВОСПРИИМЧИВОСТЬ ЖИВОТНЫХ К ДЕЙСТВИЮ ЭНЦЕФАЛИТОГЕННОГО АНТИГЕНА

<http://rcin.org.pl>
Резюме

Проведено исследования влияния диеты со сниженным и повышенным содержанием жирных кислот на восприимчивость животных и действие энцефалитогенного антигена.

Результаты исследований привели к следующим выводам:

1. Крысы кормленные в последнем периоде утробной жизни и после рождения диетой с недостатком или с избытком жирных кислот проявляют иную реактивную способность против энцефалитогенного антигена в сопоставлении с животными кормленными нормальной диетой.

2. Изменения содержания жирных кислот в диете снижают заболеваемость экспериментальным аллергическим энцефаломиелитом, определенную как клиническими так и патоморфологическими критериями.

3. Картина липидов миелина в течение экспериментального аллергического энцефаломиелита у животных кормленных диетой с недостатком или с избытком жирных кислот показывает в сопоставлении с крысами кормленными нормальной диетой снижение содержания всех фосфолипидных фракций, параллельно с повышением содержания цереброзидов.

4. Измененный химический состав липидов миелина, образованный под влиянием диеты с ненормальным количеством жирных кислот, влияет на ослабление иммунологической реактивной способности животного против энцефалитогенного антигена.

REFERENCES

1. Alvord E., Jr., Kies M.: Clinic-pathologic correlations in experimental allergic encephalomyelitis. II. Development. An Index for quantitative assay of encephalitogenic activity on „Antigens”. *J. Neuropath. exper. Neurol.*, 1959, 19, 447—457.
2. Belin J., Pettet N., Smith A., Thompson R., Zilkha K.: Linoleate metabolism in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1971, 34, 25—29.
3. Bernsohn J., Stephanides Z.: Aetiology of multiple sclerosis. *Nature*, 1967, 215, 321—323.
4. Clausem J., Møller J.: Allergic encephalomyelitis induced by brain antigen after deficiency in polyunsaturated fatty acids during myelination. *Acta Neurol. Scand.*, 1967, 43, 375—388.
5. Elliot G., Gibbons A., Greig H.: A comparison of the effect of melengestrol acetate with the combination of hydrocortisone acetate and with other steroids

- in the treatment of EAE in Wistar rats. *Acta neuropat. (Berl.)*, 1973, 23, 95—104.
6. Farias R., Bloj B., Morero R., Siñeriz F., Trucco R.: Regulation of allosteric membrane — bound enzymes through changes in membrane lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 231—251.
 7. Folch-Pi., Lees J., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—511.
 8. Ignarro L., Oronsky A., Perper R.: Effect of prostaglandins on release of enzymes from lysosomes of pancreas, spleen and kidney cortex. *Life Sci.*, 1972, 12, 193—201.
 9. Lassmann H., Wiśniewski H.: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Time course of neurological symptoms and pathology. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1978, 43, 35—42.
 10. Lassmann H., Wiśniewski H.: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: effect of age at the time of sensitization on clinical course and pathology. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1979, 47, 111—116.
 11. Mertin J., Meade C.: Relevance of fatty acids in multiple sclerosis. *Brit. Med. Bull.*, 1977, 33, 67—71.
 12. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brains: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—757.
 13. Paty D.: Double-blind trial of linoleic acid in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.*, 1983, 40, 693—694.
 14. Selivonchick D., Johnston P.: Fat deficiency in rats during development of the central nervous system and susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Nutr.*, 1975, 105, 288—300.
 15. Swank R.: Multiple sclerosis: a correlation of its incidence with dietary fat. *Amer. J. Med. Sci.*, 1950, 220, 421—430.
 16. Thompson R.: A biochemical approach to the problem of multiple sclerosis. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1966, 59, 260—276.
 17. Thompson R.: Fatty acid metabolism in multiple sclerosis. *Biochem. Soc. Symp.*, 1972, 35, 103—111.
 18. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 153—162.
 19. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acid deficient diet on myelin lipids of the developing rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983a, 21, 36—43.
 20. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żórawski A.: Fatty acid composition of myelin lipids in developing rats kept on a fat deficient diet. *Neuropat. Pol.*, 1983b, 21, 363—376.
 21. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z.: Effect of fatty acid enriched diet on myelin lipids of the developing rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983c, 21, 353—362.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań

LUBOMIRA DYDYK, ELŻBIETA MEDYŃSKA, OLGIERD PUCIŁOWSKI

IDENTYFIKACJA PEŁCZERZYKÓW DOPAMINERGICZNYCH
W OBRAZACH MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWYCH
ZBITEJ WARSTWY ISTOTY CZARNEJ SZCZURA *

<http://rcin.org.pl>

Pracownia Mikroskopii Elektronowej Zakładu Neuropatologii
i Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego
Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Wyniki licznych i prowadzonych od kilkunastu lat badań biochemicznych i mikroskopowo-elektronowych nad umiejscowieniem oraz identyfikacją katecholamin w komórce nerwowej są kontrowersyjne. W związku z tym podejmując badania mikroskopowo-elektronowe na modelu doświadczalnym choroby Parkinsona postawiono przed sobą dwa zadania: 1) identyfikację pełczerzyków dopaminergicznych w obrazach mikroskopowo-elektronowych istoty czarnej szczura, 2) określenie zmian liczby pełczerzyków zawierających ziarnistości dopaminy w istocie czarnej i prążkowie szczura w doświadczalnym modelu choroby Parkinsona oraz po wszczepieniu do prążkowie komórek produkujących dopaminę, tzn. płodowej istoty czarnej lub części rdzennej nadnercza.

Bezpośrednim celem niniejszej pracy była próba rozwiązania pierwszego zadania. Na podstawie wyników badań Tennyson i wsp. (1975), które wykazały, że 5-hydroksydopamina (fałszywy neurotransmitter monoaminergiczny) dodana do środowiska inkubacyjnego gromadzi się zarówno w zakończeniach nerwowych noradrenergicznych, serotonergicznych, jak i dopaminergicznych, natomiast po dodaniu do medium inkubacyjnego zawierającego desmetyloimipraminę (inhibitor neuronalnego wychwytu noradrenaliny oraz serotoniny) gromadzi się wyłącznie w zakończeniach dopaminergicznych, postanowiono przeprowadzić badania po przyżyciowym podaniu zarówno desmetyloimipraminy, jak i 5-hydroksydopaminy.

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 10.4.05.2.4, koordynowanego przez CMDiK PAN w Warszawie.

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na ośmiu szczurach rasy Wistar o masie ciała 180—200 g. Zwierzęta podzielono na cztery grupy. W pierwszej grupie doświadczalnej 2 szczurom wstrzykiwano dootrzewnowo roztwór desmetyloimipraminy w fizjologicznym roztworze chlorku sodu w ilości 25 mg w 1 ml /kg masy ciała. W drugiej grupie 2 zwierzętom podawano roztwór 300 μ g 5-hydroksydopaminy w 10 μ l 0,2% kwasu askorbowego, wprowadzany stereotaktycznie do komory trzeciej ($A = 3.0$, $L = 0$, $V = 6.0$, kąt boczny 15°). W trzeciej grupie w godzinę po wstrzyknięciu desmetyloimipraminy podawano 5-hydroksydopaminę (dawki obu substancji i sposób podawania identyczne jak w grupie pierwszej i drugiej). Dwa szczury nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym stanowiły kontrolę.

W 3 godziny po wstrzyknięciu desmetyloimipraminy i w 2 godziny po podaniu 5-hydroksydopaminy wykonywano perfuzję przez lewą komorę serca do tętnicy głównej wstępującej z 200 ml roztworu 2,5% glutaraldehydu i 2% paraformaldehydu w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,3, pod ciśnieniem 80 mm Hg. Mózgi wyjęte z czaszki przechowywano w płynie perfuzyjnym w temp. 4°C do następnego dnia. Do badania pobierano obustronnie warstwę zbitą istoty czarnej. Wycinki umieszczano w płynie utrwalającym o podanym wyżej składzie na 5 godzin, a następnie pozostawiano przez noc w 0,1 M buforze kakodylanowym i utrwalano dodatkowo w 2% czterotlenku osmu przez 2 godziny. Materiał odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie 812. Półcienniki skrawki barwiono błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie oglądano oraz wykonywano zdjęcia w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

Przedmiotem analizy ilościowej były wyłącznie te pęcherzyki synaptyczne, które na podstawie rozmiarów i charakterystyki mikroskopowo-elektronowej opartej na wcześniejszych badaniach ultrastrukturalnych (Pellegrino DeRaldi, De Robertis 1963; Bloom, Aghajanian 1968; Hökfelt 1968; Banks i wsp. 1969; Richards, Tranzer 1970; Jaim-Etcheverry, Zichrer 1971), można było uznać za pęcherzyki prawdopodobnie katecholinergetyczne. Zaliczono do nich małe pęcherzyki ziarniste i jasne o średnicy 40—60 nm oraz duże ziarniste i jasne pęcherzyki o średnicy 70—120 nm. (Znaczna rozpiętość rozmiarów w grupie związana jest z różnicami poziomu przekroju kulistego pęcherzyka w obrazie mikroskopowo-elektronowym). Wylączono z niej natomiast małe jasne pęcherzyki o średnicy 20—30 nm, uznane przez większość autorów za nośniki acetylocholiny (Whitaker i wsp. 1964) oraz pęcherzyki opłaszczone. Pęcherzyki katecholaminergiczne liczone w mikrofotogramach elektronowych przy powiększeniu $30\ 600\times$. W każdej z 4 badanych grup zwierząt określano ich liczbę w 24 polach o powierzchni $14\ 400\ \text{mm}^2$ każde, co odpo-

wiało 0,47 mm² powierzchni preparatu. Badania liczebności pęcherzyków prowadzono na 8 mikrofotogramach obejmujących sam neuropil oraz na 16 obejmujących zarówno neuropil, jak i cytoplazmę obu typów komórek nerwowych wyodrębnionych w warstwie zbitej istoty czarnej. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie według testu t-Studenta. Przedstawiono również w procentach średnie arytmetyczne liczby poszczególnych typów pęcherzyków katecholaminergicznych, uzyskane z 24 pól, przyjmując za 100% średnią arytmetyczną sumy wszystkich pęcherzyków o tym charakterze występujących w 1 polu.

WYNIKI

Badanie jakościowe

<http://rcin.org.pl>

Zwierzęta kontrolne

W zbitej warstwie istoty czarnej obserwowano dwa rodzaje komórek nerwowych: większe z cytoplazmą zawierającą liczne organelle i mniejsze z cytoplazmą ubogą w organelle.

Komórki większe spotykano częściej. Owalne jądro komórkowe z równomiernie rozproszonymi drobnymi ziarnami chromatyny położone było obwodowo. W otocze jądra widoczne były liczne pory (ryc. 1). Cytoplazma była bogata w organelle. Profile ziarnistej siateczki śródplazmatycznej otoczone były licznymi rybosomami i polirybosomami (ryc. 2). Często spotykano skupienia równoległe ułożonych zbiorników ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 3). W cytoplazmie komórki występowały pojedyncze duże pęcherzyki ziarniste o średnicy 70—120 nm. Rdzeń pęcherzyków wypełniony ziarenkami otoczony był jasnym „halo” (ryc. 4). Obserwowano je pomiędzy zbiornikami układu Golgiego, w bezpośrednim sąsiedztwie zbiorników gładkiej i ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 5), a także w otoczeniu mitochondriów (ryc. 6). Perykariony i wypustki komórek nerwowych otoczone były cienkimi wypustkami astrogleju i synapsami.

Rzadziej spotykane mniejsze komórki nerwowe miały cytoplazmę ubogą w organelle. Profile ziarnistej siateczki śródplazmatycznej były nieliczne, a układ Golgiego słabo rozwinięty. Pomiedzy jego pęcherzykami widoczne były pojedyncze małe pęcherzyki ziarniste o średnicy 40—60 nm (ryc. 7). Spotykano je również w sąsiedztwie zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej i w pobliżu mitochondriów (ryc. 8). Owalne jądro komórkowe z drobnoziarnistą, równomiernie rozproszoną chromatyną i z licznymi wgłobieniami położone było centralnie. W jego otocze spotykano pojedyncze pory (ryc. 7). Komórkę otaczały wypustki astrogleju oraz synapsy. W nielicznych aksonach obserwowano pojedyncze duże lub małe pęcherzyki ziarniste (ryc. 9).

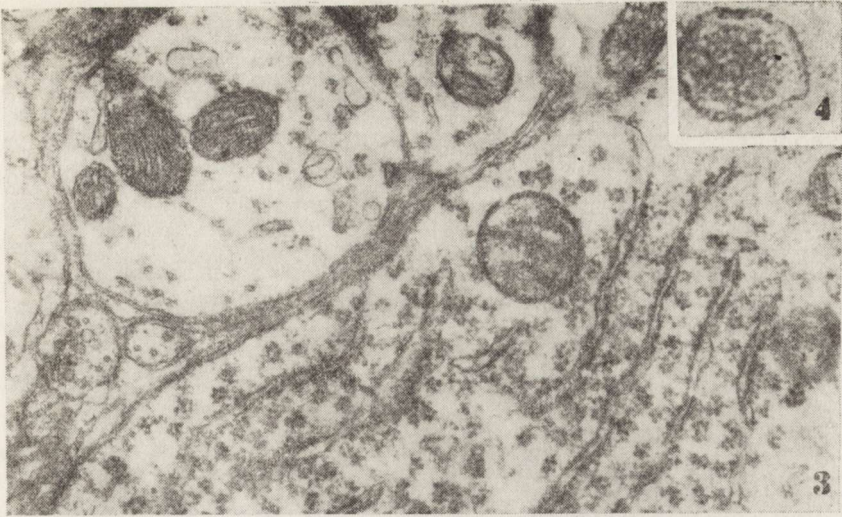


Ryc. 1. Fragment komórki nerwowej z licznymi polirybosomami w cytoplazmie. Jądro (N) z licznymi porami w otoczce (strzałka). Pow. 30 600 ×

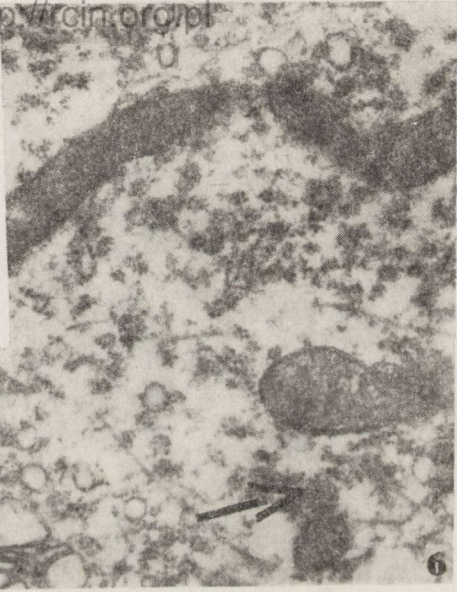
Fig. 1. Fragment of neuron with numerous polyribosomes in cytoplasm. Nucleus (N) with numerous pores in envelope (arrow). × 30 600

Ryc. 2. Fragment komórki nerwowej z licznymi organellami w cytoplazmie. Układ Golgiego (G). Pow. 30 600 ×

Fig. 2. Fragment of neuron with numerous organelles in cytoplasm. Golgi apparatus (G). × 30 600



<http://cin.org.pl>



Ryc. 3. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej z licznymi profilami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Pow. 30 600 ×

Fig. 3. Fragment of cytoplasm of neuron with numerous profiles of granular endoplasmic reticulum. × 30 600

Ryc. 4. Duży pęcherzyk ziarnisty. Pow. 140 000 ×

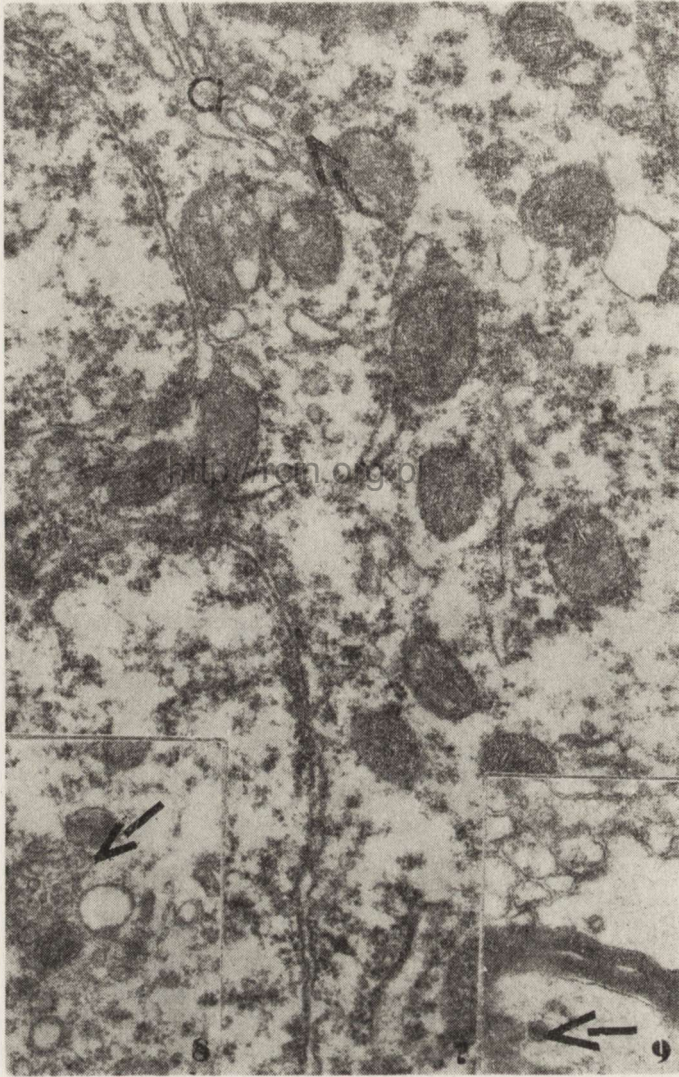
Fig. 4. Large granular vesicle. × 140 000

Ryc. 5. Fragment komórki nerwowej z licznymi profilami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i z licznymi rybosomami. Dwa duże pęcherzyki ziarniste pomiędzy profilami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (strzałka). Pow. 30 600 ×

Fig. 5. Fragment of neuron with numerous profiles of granular endoplasmic reticulum and numerous ribosomes. Two large granular vesicles between profiles of granular endoplasmic reticulum (arrow). × 30 600

Ryc. 6. Fragment komórki nerwowej z licznymi organellami w cytoplazmie. Duży pęcherzyk ziarnisty w pobliżu mitochondrium (strzałka). Pow. 30 600 ×

Fig. 6. Fragment of neuron with numerous organelles in cytoplasm. Large granular vesicle in the vicinity of a mitochondrion (arrow). × 30 600



Ryc. 7. Fragment komórki nerwowej z nielicznymi profilami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i z nielicznymi polirybosomami. Mały pęcherzyk ziarnisty (strzałka) pomiędzy zbiornikami układu Golgiego (G). Pow. 30 600 ×

Fig. 7. Fragment of neuron with not numerous profiles of granular endoplasmic reticulum and with not numerous polyribosomes. Small granular vesicle (arrow) between cisterns of Golgi apparatus (G). × 30 600

Ryc. 8. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej z nielicznymi polirybosomami. Mały pęcherzyk ziarnisty w pobliżu mitochondrium (strzałka). Pow. 30 600 ×

Fig. 8. Fragment of the cytoplasm of neuron with not numerous polyribosomes. Small granular vesicle in the vicinity of a mitochondrium (arrow). × 30 600

Ryc. 9. Mały pęcherzyk ziarnisty w aksonie (strzałka). Pow. 30 600 ×

Fig. 9. Small granular vesicle within axon (arrow). × 30 600

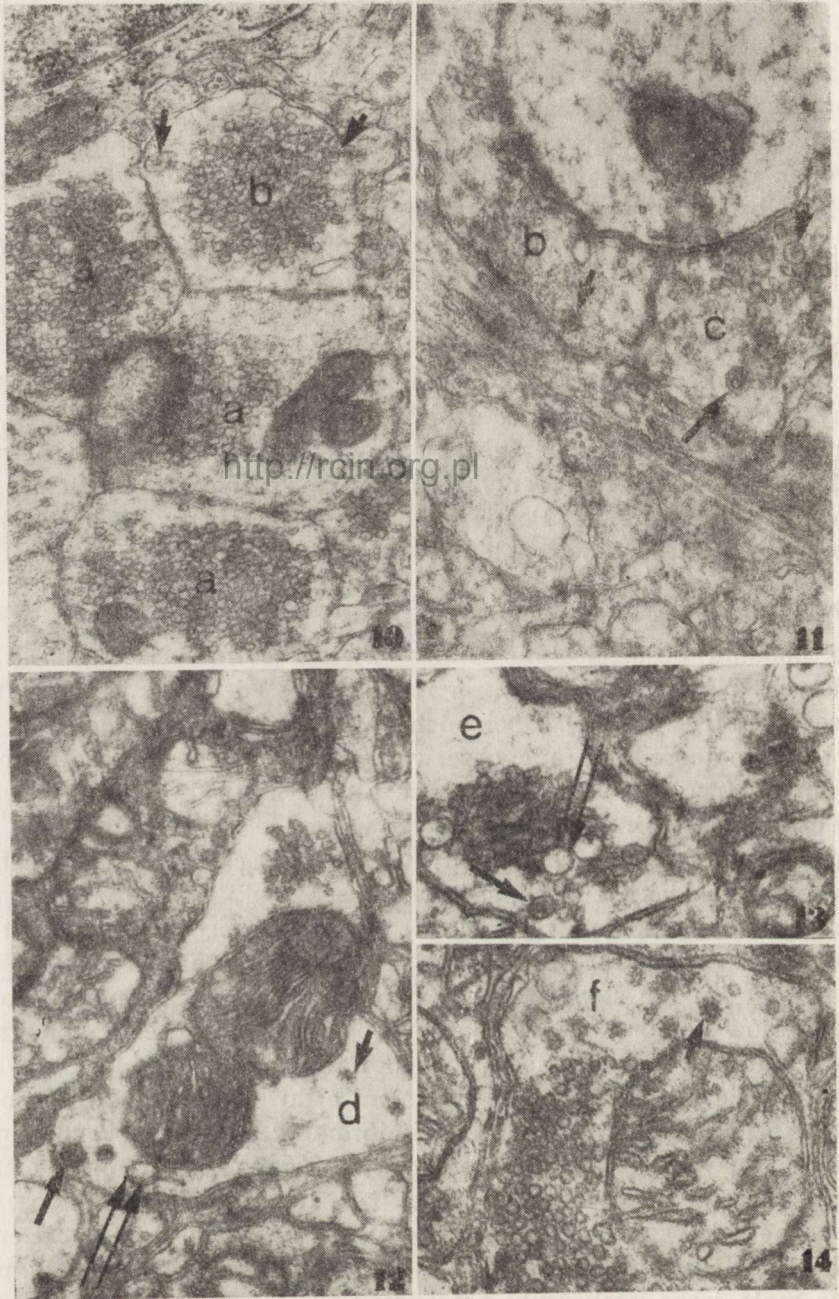
W zakończeniach aksonalnych stwierdzono 5 rodzajów pęcherzyków: małe jasne o średnicy 20—30 nm, małe ziarniste o średnicy 40—60 nm, duże ziarniste o średnicy 70—120 nm, duże jasne o średnicy 70—120 nm oraz opłaszczone o średnicy 30—50 nm. Małe jasne pęcherzyki często wypełniały prawie całą kolbkę synaptyczną (ryc. 10). W innych synapsach obok nich występowały pojedyncze małe pęcherzyki ziarniste (ryc. 10, 11). Obserwowano również synapsy, w których obecne były małe jasne pęcherzyki oraz pojedyncze małe i duże pęcherzyki ziarniste (ryc. 11). Spotykano ponadto synapsy, w których wśród małych jasnych pęcherzyków znajdowały się pojedyncze duże pęcherzyki ziarniste i duże pęcherzyki jasne (ryc. 12), lub synapsy, w których obok małych jasnych pęcherzyków stwierdzano po kilka dużych pęcherzyków ziarnistych i jasnych (ryc. 13). Wśród pęcherzyków ziarnistych zarówno małych, jak i dużych wyróżniono pęcherzyki z jasnym (szarym) rdzeniem o małej gęstości elektronowej i pęcherzyki z ciemnym (czarnym) rdzeniem o dużej gęstości elektronowej. Pomiędzy opisanymi pęcherzykami spotykano pęcherzyki opłaszczone o średnicy 30—50 nm (ryc. 12, 14).

Zwierzęta doświadczalne

Po podaniu desmetyloimipraminy większość małych pęcherzyków ziarnistych o średnicy 40—60 nm miała jasny rdzeń o niskiej gęstości elektronowej (ryc. 15, 16). Obok nich pojawiły się małe jasne pęcherzyki o tej samej średnicy, nie obserwowane w ogóle w grupie zwierząt kontrolnych (ryc. 16). Poza tym obraz ultrastrukturalny zbitej warstwy istoty czarnej nie różnił się od opisanego w kontroli.

Po podaniu 5-hydroksydopaminy większość pęcherzyków ziarnistych, zarówno małych jak i dużych, stanowiły pęcherzyki z ciemnym rdzeniem o dużej gęstości elektronowej (ryc. 17). Duże jasne pęcherzyki synaptyczne spotykano rzadko. Małych jasnych pęcherzyków synaptycznych o średnicy 40—60 nm nie stwierdzono w ogóle. W cytoplazmie perykarionów obu rodzajów komórek nerwowych nie obserwowano pęcherzyków ziarnistych, natomiast w aksonach występowały pojedyncze małe lub duże pęcherzyki ziarniste z ciemnym rdzeniem o dużej gęstości elektronowej.

Po łącznym podaniu desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy większość dużych pęcherzyków ziarnistych w synapsach miała ciemny rdzeń o znacznej gęstości elektronowej (ryc. 18), natomiast większość małych pęcherzyków ziarnistych stanowiły pęcherzyki z jasnym rdzeniem o niskiej gęstości elektronowej (ryc. 19). Obok nich występowały pojedyncze małe jasne pęcherzyki o średnicy 40—60 nm i pojedyncze duże jasne pęcherzyki o średnicy 70—120 nm (ryc. 19). Podobnie jak po podaniu samej 5-hydroksydopaminy, w cytoplazmie perykarionów komórek nerwowych nie stwierdzono pęcherzyków ziarnistych, natomiast w aksonach spotykano pojedyncze pęcherzyki ziarniste z ciemnym rdzeniem.



Ryc. 10. Zakończenia aksonalne (a) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm. Zakończenie aksonalne (b) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm i z dwoma małymi pęcherzykami ziarnistymi (strzałki). Pow. 30 600 ×

Fig. 10. Axonal endings (a) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter. Axonal ending (b) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter and with two small granular vesicles (arrows). × 30 600

Badania ilościowe

Zwierzęta kontrolne

Badanie liczebności pęcherzyków wykazało, że najliczniejsze były duże pęcherzyki ziarniste. Stanowiły one 40% sumy wszystkich liczonych pęcherzyków. Wśród nich 26% przypadało na pęcherzyki z jasnym, a 14% z ciemnym rdzeniem. Małe pęcherzyki ziarniste były mniej liczne i stanowiły 36%. Pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem stanowiły 24%, a z ciemnym rdzeniem 12% ogólnej sumy wszystkich liczonych pęcherzyków. Pozostałe 24% sumy liczonych pęcherzyków przypadało na duże jasne pęcherzyki (ryc. 20, 21).

Zwierzęta doświadczalne

Po podaniu desmetyloimipraminy stwierdzono wysoce statystycznie znamienne w porównaniu z kontrolą obniżenie liczby małych pęcherzyków ziarnistych o średnicy 40–60 nm i dużych jasnych pęcherzyków o średnicy 70–120 nm. Towarzyszący mu wzrost liczby dużych ziarnistych pęcherzyków o średnicy 70–120 nm nie miał cech znamienności statystycznej. Pojawiły się małe jasne pęcherzyki o średnicy 40–60 nm nie występujące w grupie kontrolnej (ryc. 20). Liczba małych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem obniżała się do 4% ogólnej liczby pęcherzyków katecholaminergicznych, a małych pęcherzyków ziarnistych z jasnym rdzeniem do 15%. Zmiany w liczebności dużych pęcherzyków

Ryc. 11. Zakończenie aksonalne (b) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm i z jednym małym pęcherzykiem ziarnistym (krótka strzałka). Zakończenie aksonalne (c) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm, z jednym małym pęcherzykiem ziarnistym (krótka strzałka) i z jednym dużym pęcherzykiem ziarnistym (długa strzałka). Pow. 30 600 ×

Fig. 11. Axonal ending (b) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter and with one small granular vesicle (short arrow). Axonal ending (c) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter, with one small granular vesicle (short arrow) and one large granular vesicle (long arrow). × 30 600

Ryc. 12. Zakończenie aksonalne (d) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm, z jednym dużym pęcherzykiem ziarnistym (długa strzałka), z jednym dużym jasnym pęcherzykiem (podwójna strzałka) i z dwoma pęcherzykami opłaszczonymi (krótka strzałka). Pow. 30 600 ×

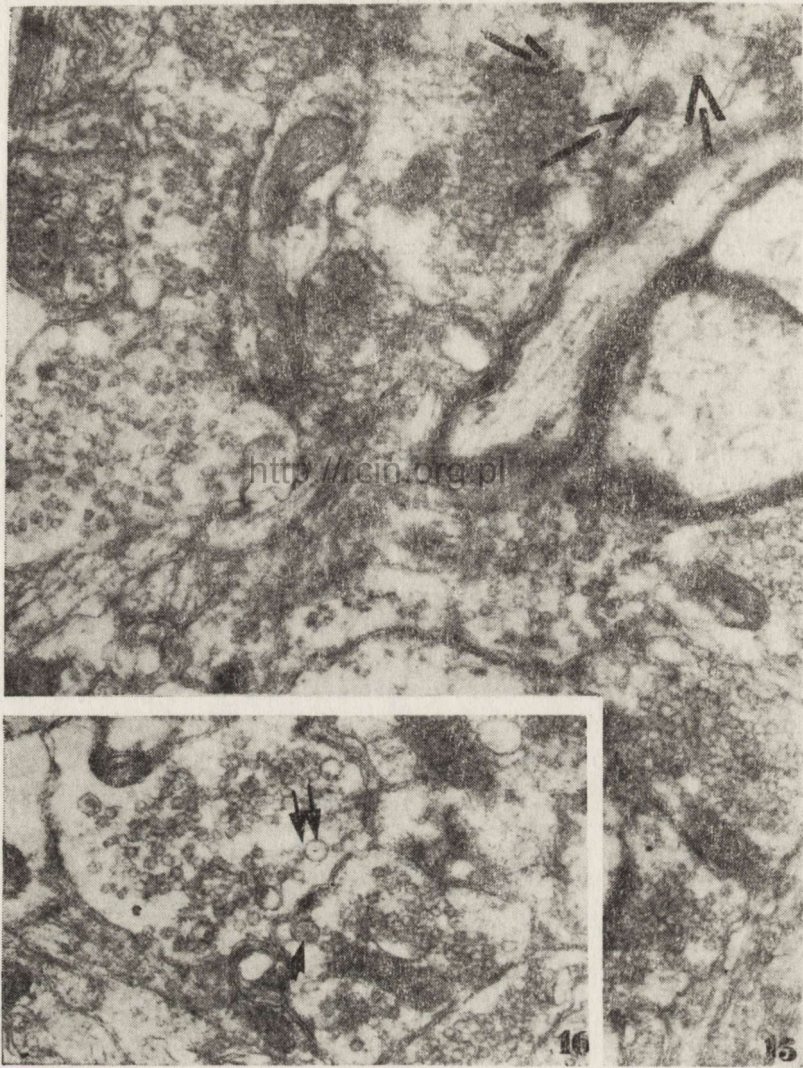
Fig. 12. Axonal ending (d) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter, with one large granular vesicle (long arrow), one large clear vesicle (double arrow) and with two coated vesicles (short arrow). × 30 600

Ryc. 13. Zakończenie aksonalne (e) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm, z trzema dużymi jasnymi pęcherzykami (podwójna strzałka) i z dwoma dużymi pęcherzykami ziarnistymi (długa strzałka). Pow. 30 600 ×

Fig. 13. Axonal ending (e) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter, with three large clear vesicles (double arrow) and with two large granular vesicles (long arrow). × 30 600

Ryc. 14. Pęcherzyki opłaszczone (krótka strzałka) w zakończeniu aksonalnym (f) z licznymi małymi jasnymi pęcherzykami o średnicy 20–30 nm. Pow. 30 600 ×

Fig. 14. Coated vesicles (short arrow) within axonal ending (f) with numerous small clear vesicles 20–30 nm in diameter. × 30 600

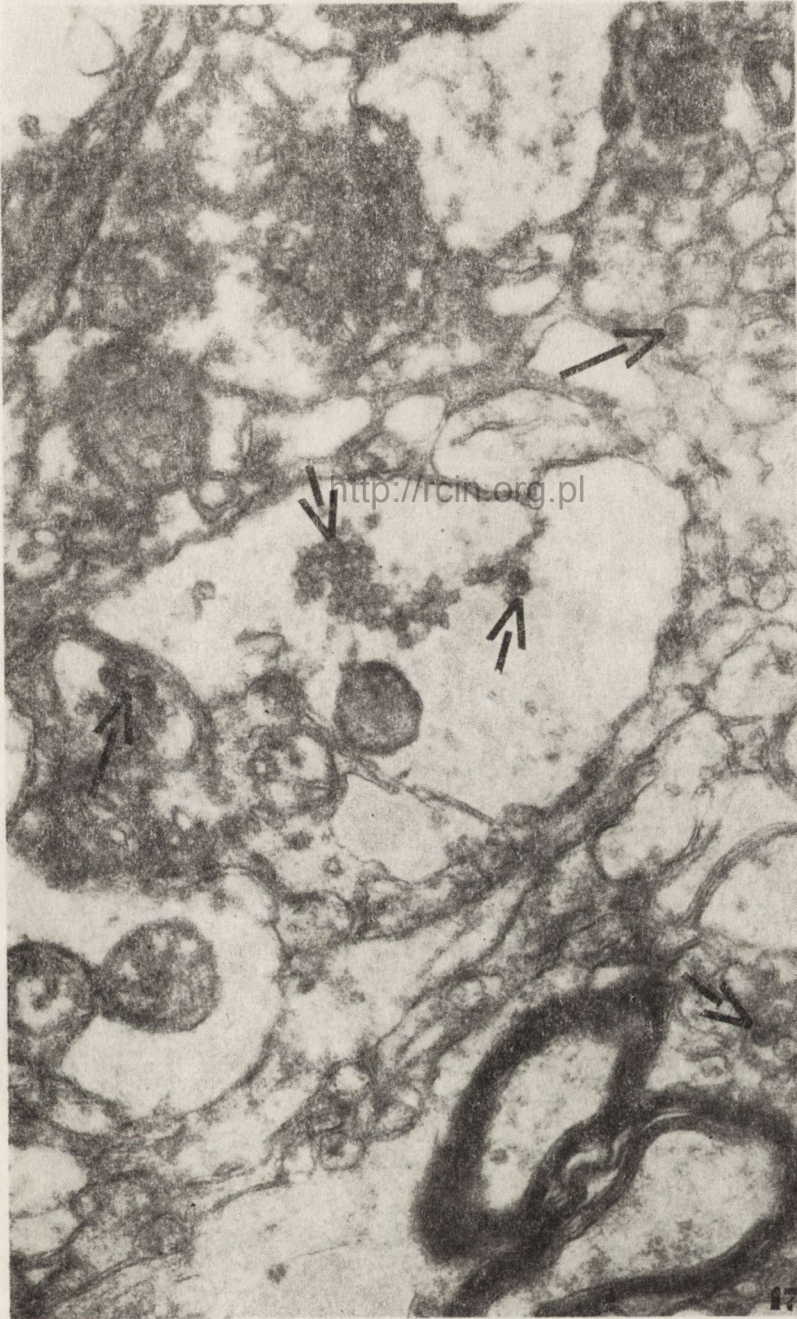


Ryc. 15. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej po podaniu desmetyloimipraminy. Dwa małe pęcherzyki ziarniste (krótkie strzałki) i jeden duży pęcherzyk ziarnisty (długa strzałka) z jasnym rdzeniem o małej gęstości elektronicznej, w zakończeniu aksonalnym. Pow. 30 600 \times

Fig. 15. Fragment of compact zone of substantia nigra after desmethylimipramine administration. Two small granular vesicles (short arrows) and one large granular vesicle (long arrow) with clear core of low electron density within axonal ending. $\times 30\ 600$

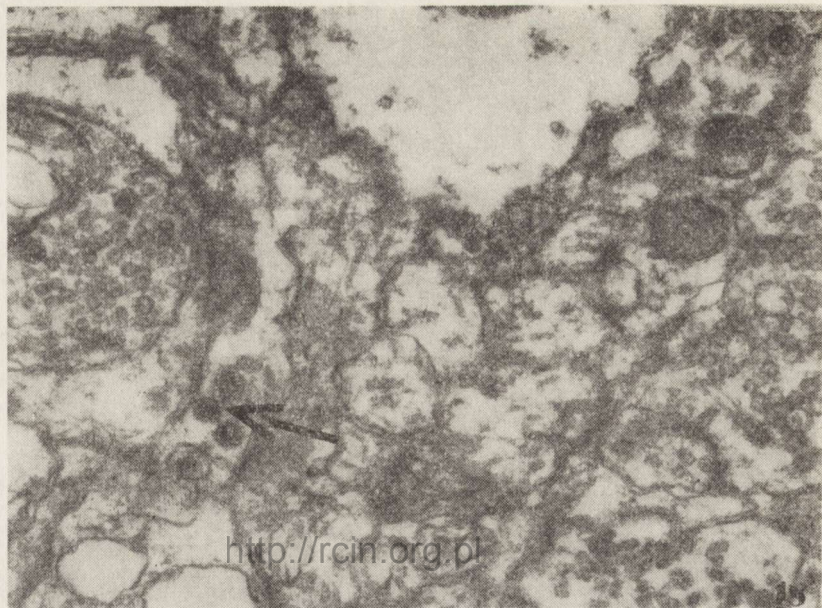
Ryc. 16. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej po podaniu desmetyloimipraminy. Małe pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem o małej gęstości elektronicznej (krótka strzałka) i małe jasne pęcherzyki o średnicy 40–60 nm (podwójna krótka strzałka), w zakończeniu aksonalnym. Pow. 30 600 \times

Fig. 16. Fragment of compact zone of substantia nigra after desmethylimipramine administration. Small granular vesicles with clear core of low electron density (short arrow) and small clear vesicles 40–60 nm in diameter (double short arrow), within axonal ending. $\times 30\ 600$



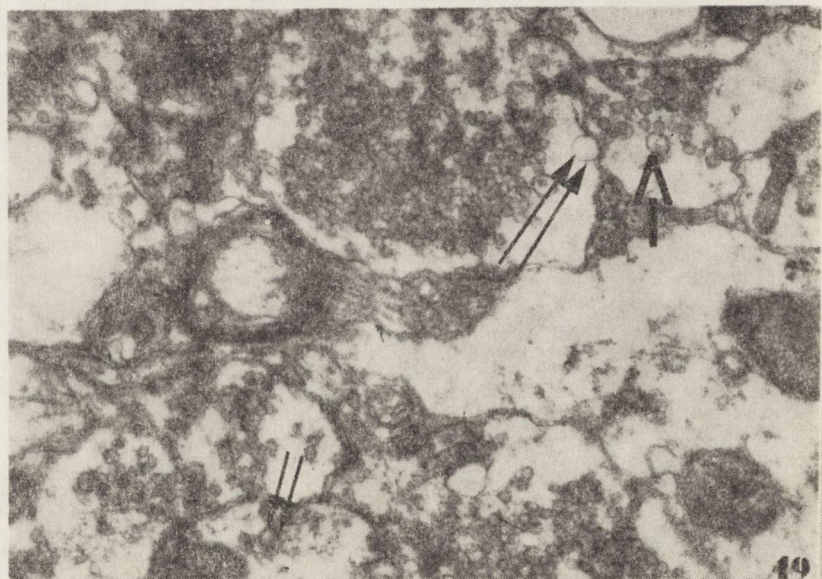
Ryc. 17. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej po podaniu 5-hydroksydopaminy. Małe pęcherzyki ziarniste (krótkie strzałki) i duże pęcherzyki ziarniste (długie strzałki) z ciemnym rdzeniem o dużej gęstości elektronowej, w zakończeniach aksonalnych. Pow. 30 600 ×

Fig. 17. Fragment of compact zone of substantia nigra after 5-hydroxydopamine administration. Small granular vesicles (short arrows) and large granular vesicles (long arrows) with dark core of high electron density, within axonal endings. × 30 600



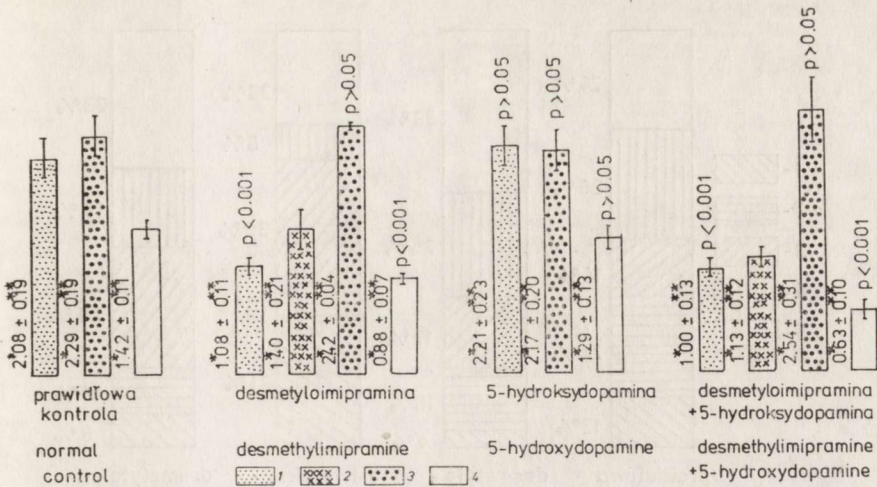
Ryc. 18. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej po podaniu desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy. Duże pęcherzyki ziarniste z ciemnym rdzeniem o dużej gęstości elektronowej (strzałka), w zakończeniu aksonalnym. Pow. 30 600 ×

Fig. 18. Fragment of compact zone of substantia nigra after desmethylimipramine and 5-hydroxydopamine administration. Large granular vesicles with dark core of high electron density (arrow), within axonal ending. × 30 600



Ryc. 19. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej po podaniu desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy. Małe pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem o małej gęstości elektronowej (strzałka), jeden mały jasny pęcherzyk o średnicy 40—60 nm (podwójna krótka strzałka), i jeden duży jasny pęcherzyk o średnicy 70—120 nm (podwójna długa strzałka), w zakończeniach aksonalnych. Pow. 30 600 ×

Fig. 19. Fragment of compact zone of substantia nigra after desmethylimipramine and 5-hydroxydopamine administration. Small granular vesicles with clear core of low electron density (arrow), one small clear vesicle 40—60 nm in diameter (double short arrow), and one large clear vesicle 70—120 nm in diameter (double long arrow), within axonal endings. × 30 600



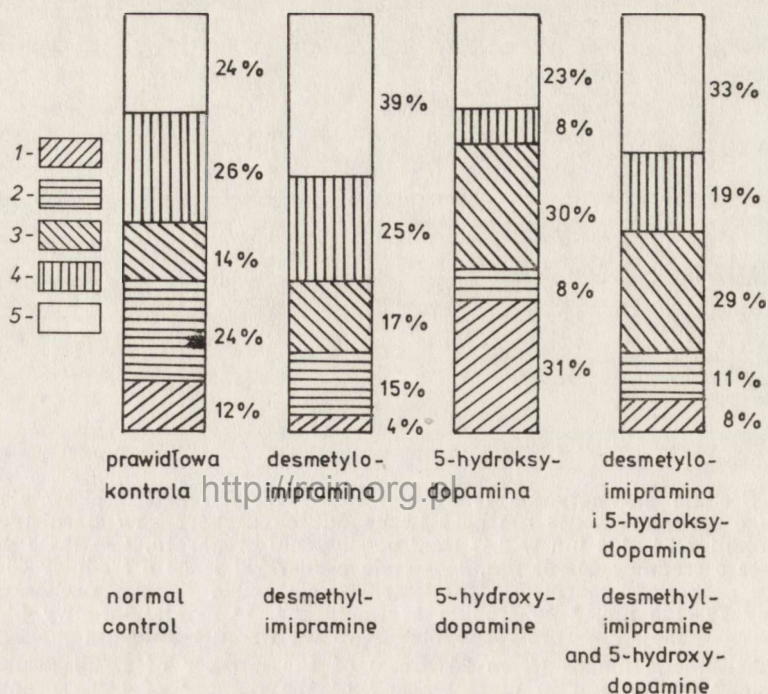
Ryc. 20. Średnie arytmetyczne (z 24 pól) liczby małych pęcherzyków ziarnistych i jasnych o średnicy 40–60 nm oraz liczby dużych pęcherzyków ziarnistych i jasnych o średnicy 70–120 nm w 0,47 mm² powierzchni preparatu. 1 — małe pęcherzyki ziarniste o średnicy 40–60 nm, 2 — małe pęcherzyki jasne o średnicy 40–60 nm, 3 — duże pęcherzyki ziarniste o średnicy 70–120 nm, 4 — duże pęcherzyki jasne o średnicy 70–120 nm, * — średnia arytmetyczna, ** — standardowy błąd średniej, P — prawdopodobieństwo wg wzoru t-Studenta

Fig. 20. Arithmetic means (from 24 areas) of the number of small granular and clear vesicles, 40–60 nm in diameter and of the number of large granular and clear vesicles 70–120 nm in diameter, in 0.47 mm² of specimen area. 1 — small granular vesicles 40–60 nm in diameter, 2 — small clear vesicles 40–60 nm in diameter, 3 — large granular vesicles 70–120 nm in diameter, 4 — large clear vesicles 70–120 nm in diameter, * — arithmetic mean, ** — standard error of the mean, P — probability calculated by the t-Student's test

ziarnistych wyrażały się wzrostem do 170% liczby pęcherzyków z ciemnym rdzeniem i obniżeniem liczby pęcherzyków z jasnym rdzeniem do 250%. Małe jasne pęcherzyki stanowiły 240%, a duże jasne pęcherzyki odpowiednio 150% ogólnej liczby liczonych pęcherzyków (ryc. 21).

Po podaniu 5-hydroksydopaminy obserwowano statystycznie nieznamienne w porównaniu z kontrolą wzrost ogólnej liczby małych pęcherzyków ziarnistych o średnicy 40–60 nm oraz obniżenie ogólnej liczby dużych pęcherzyków ziarnistych i jasnych o średnicy 70–120 nm (ryc. 20). Istotne były natomiast zmiany proporcji zarówno małych, jak i dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym i jasnym rdzeniem. Liczba małych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem o średnicy 40–60 nm wzrastała do 310%, a dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem do 300% ogólnej liczby pęcherzyków katecholaminergicznych. Małe pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem oraz duże pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem stanowiły po 80% ogólnej liczby liczonych pęcherzyków. Duże jasne pęcherzyki o średnicy 70–120 nm stanowiły 230%.

Po łącznym podaniu desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy obserwowano wysoce statystycznie znaczne w stosunku do kontroli obniżenie liczby małych pęcherzyków ziarnistych o średnicy 40–60 nm



Ryc. 21. Wyrażone w procentach średnie arytmetyczne (z 24 pól) liczby małych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym i jasnym rdzeniem, dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym i jasnym rdzeniem oraz innych prawdopodobnie katecholaminergicznych pęcherzyków, w 0.47 mm^2 powierzchni preparatu. 1 — małe pęcherzyki ziarniste z ciemnym rdzeniem, 2 — małe pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem, 3 — duże pęcherzyki ziarniste z ciemnym rdzeniem, 4 — duże pęcherzyki ziarniste z jasnym rdzeniem, 5 — inne prawdopodobnie katecholaminergiczne pęcherzyki

Fig. 21. Percentual values of the arithmetic means (from 24 areas) of the number of small granular vesicles with dark and clear core and of the number of large granular vesicles with dark and clear core and of other probably catecholaminergic vesicles, in 0.47 mm^2 of specimen area. 1 — small granular vesicles with dark core, 2 — small granular vesicles with clear core, 3 — large granular vesicles with dark core, 4 — large granular vesicles with clear core, 5 — other probably catecholaminergic vesicles

i dużych jasnych pęcherzyków o średnicy 70—120 nm oraz statystycznie nieznamienisty wzrost liczby dużych pęcherzyków ziarnistych o średnicy 70—120 nm. Podobnie jak w grupie zwierząt badanych po podaniu wyłącznie desmetyloimipraminy, spotykano małe jasne pęcherzyki o średnicy 40—60 nm. Po łącznym podaniu desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy były one mniej liczne (ryc. 20). Obliczenia procentowe wykazały zmniejszenie liczby małych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem do 8% i liczby małych pęcherzyków ziarnistych z jasnym rdzeniem do 11%. Liczba dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem wzrastała do 29%, natomiast liczba dużych pęcherzyków ziarnistych z jasnym rdzeniem obniżała się do 19% (ryc. 21). Duże jasne pęcherzyki stanowiły 12%, a małe jasne pęcherzyki 21% ogólnej liczby liczonych pęcherzyków.

OMÓWIENIE

Zastosowanie histochemicznej metody fluorescencyjnej do badań nad tkankowym umiejscowieniem amin katecholowych (Falck, 1962) pozwoliło na stwierdzenie, że występują one w zakończeniach aksonalnych i w perykarionach komórek nerwowych (Carlsson i wsp. 1962). Perykariálną lokalizację dopaminy w istocie czarnej wykazali Anden i wsp. (1964). Również Anden i wsp. (1965) w swoich późniejszych pracach oraz Hökfelt i Ungerstedt (1969) udowodnili, że włókna dopaminergiczne w szlaku łączącym istotę czarną z prążkowiem pochodzą wyłącznie z komórek jej warstwy zbitej. Gulley i Wood (1971) wyodrębnili w niej „ciemne” komórki nerwowe o średnicy 15—20 μm oraz komórki „jasne” o średnicy 10—12 μm i wykazali, że średnica aksonów „ciemnych” komórek nerwowych odpowiada średnicy aksonów dopaminergicznych w szlaku nigrostriatalnym. Wyniki tych badań sugerują przeto, że „ciemne” komórki nerwowe warstwy zbitej są komórkami dopaminergicznymi. Sugestię tę potwierdziły badania Hökfelta i Ungerstedta (1973), którzy stwierdzili, że w chorobie Parkinsona dochodzi do zmian zwyrodnieniowych jednego tylko rodzaju komórek nerwowych, obecnych w zbitej warstwie istoty czarnej. Ich opis, podany przez Hökfelta i Ungerstedta (1973), odpowiada „ciemnym” komórkom wyodrębnionym przez Gulleya i Wooda (1971). Wyniki tych właśnie badań skłoniły nas do podjęcia próby identyfikacji pęcherzyków dopaminergicznych w obrazach mikroskopowo-elektronowych zbitej warstwy istoty czarnej.

Obraz mikroskopowo-elektronowy komórek nerwowych zbitej warstwy istoty czarnej oraz występujących w niej pęcherzyków synaptycznych stwierdzony u zwierząt kontrolnych we własnych badaniach nie różnił się istotnie od wcześniejszych opisów innych autorów, takich jak Bak (1967), Gulley i Wood (1971) oraz Gulley i Smithberg (1971). Różnicę w stosunku do nich stanowi dostrzeżenie zróżnicowania gęstości elektronowej ziarnistego rdzenia w pęcherzykach o średnicy zarówno 40—60 nm, jak i 70—120 nm, które stało się podstawą do wyodrębnienia pęcherzyków ziarnistych z ciemnym (czarnym) rdzeniem o dużej gęstości elektronowej oraz pęcherzyków ziarnistych z jasnym (szarym) rdzeniem o małej gęstości elektronowej. Brak badań mikrodensytometrycznych pozwalających na dokładne określenie gęstości elektronowej rdzenia pęcherzyków ziarnistych ogranicza w sposób oczywisty precyzyjność wprowadzonego podziału. Do jego zastosowania skłoniła jednak dostateczna uchwytność stwierdzanych różnic i ich powtarzalność oraz fakt analogicznych podziałów stosowanych przez innych autorów (Bondareff 1969; Richards, Tranzer 1970; Jaim-Etcheverry, Zichrer 1971).

W badaniach jakościowych w grupach zwierząt doświadczalnych zasługują na uwagę dwa zjawiska: 1) brak pęcherzyków ziarnistych w perykarionach komórek nerwowych po podaniu 5-hydroksydopaminy i 5-

-hydroksydopaminy łącznie z desmetyloimipraminą oraz 2) pojawienie się nie obserwowanych w grupie zwierząt kontrolnych małych jasnych pęcherzyków o średnicy 40—60 nm w synapsach zwierząt poddanych działaniu desmetyloimipraminy oraz desmetyloimipraminy łącznie z 5-hydroksydopaminą. Wydaje się, że opierając się na obrazach mikroskopowo-elektronowych wykazujących obecność pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem o dużej gęstości elektronowej w aksonach i kolbkach synaptycznych, pierwsze zjawisko można tłumaczyć natychmiastowym przemieszczaniem się maksymalnie wypełnionych pęcherzyków z komórki do zakończenia aksolnego. Podobne zjawisko opisali Ibata i wsp. (1974), którzy jedynie w jednym przypadku, po podaniu bardzo wysokiej dawki 5-hydroksydopaminy, w perykarionach pojedynczych komórek nerwowych istoty czarnej stwierdzili obecność pęcherzyków ziarnistych z ciemno wybarwionym rdzeniem o średnicy 60—80 nm. Uzyskany wynik uzależniali oni od ilości podanej 5-hydroksydopaminy i od gromadzenia się amin endogennych w pęcherzykach. Wyjaśnienie drugiego zjawiska jedynie na podstawie własnych spostrzeżeń wydaje się niemożliwe. Odwołując się jednakże do wyników badań Blooma i Aghajana (1968), którzy obserwowali wzrost liczby jasnych pęcherzyków pod wpływem rezerpiny, uwalniającej katecholaminy z pęcherzyków synaptycznych, można przypuszczać, że małe jasne pęcherzyki o średnicy 40—60 nm są formą przejściową małych pęcherzyków ziarnistych o tej samej średnicy.

Spostrzeżenia nasze sugerujące zmiany gęstości elektronowej rdzenia pęcherzyków ziarnistych pod wpływem desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy skłoniły do próby oznaczenia liczebności pęcherzyków ziarnistych z jasnym i ciemnym rdzeniem. W przeprowadzonych badaniach ilościowych w grupie zwierząt kontrolnych określano liczebność trzech rodzajów pęcherzyków: małych ziarnistych o średnicy 40—60 nm oraz dużych o średnicy 70—120 nm, zarówno ziarnistych jak i jasnych. Nie oznaczano natomiast liczby małych jasnych pęcherzyków o średnicy 20—30 nm i pęcherzyków opłaszczonych. Oparto się w tym względzie na kryteriach podziału pęcherzyków na prawdopodobnie katecholaminergiczne, prawdopodobnie acetylocholinergiczne i inne.

Małe pęcherzyki ziarniste o średnicy 40—60 nm z rdzeniem o różnej gęstości elektronowej, zależnej od zawartości noradrenaliny w tkance (Jaim-Etcheverry, Zichrer 1971), wykazują wzrost gęstości elektronowej rdzenia po podaniu alfa-metylo-noradrenaliny — jako prekursora noradrenaliny (Bondareff 1969) i 5-hydroksydopaminy, stanowiącej tzw. fałszywy neurotransmitter monoaminergiczny (Richards, Tranzer 1970). Pellegrino De Iraldi i De Robertis (1963) stosując rezerpinę wykazali prostą zależność pomiędzy gęstością elektronową rdzenia małych pęcherzyków ziarnistych a intensywnością fluorescencji oraz oznaczanym biochemicznie poziomem noradrenaliny w tkance. Badania te, łącznie z obser-

wacjami prowadzonymi na innych narządach, doprowadziły do identyfikacji małych pęcherzyków ziarnistych, stwierdzonych w części rdzennej nadnerczy, jako noradrenergicznych (Terland i wsp. 1979).

Duże pęcherzyki ziarniste o średnicy 70—120 nm, z rdzeniem o różnej gęstości elektronowej, malejącej pod wpływem rezerpiny (Banks i wsp. 1969) i wzrastającej po podaniu alfa-metylo-dopaminy — jako prekursora dopaminy (Hökfelt 1968) oraz 5-hydroksydopaminy (Richards, Tranzer 1970), uznano z dużym prawdopodobieństwem za pęcherzyki dopaminergiczne.

Duże jasne pęcherzyki o średnicy 70—120 nm, w oparciu o cytowane uprzednio badania Blooma i Aghajaniana (1968), mogą być uznane za formę przejściową dużych pęcherzyków ziarnistych o tej samej średnicy.

Małe jasne pęcherzyki o średnicy 20—30 nm, spotykane w dużej liczbie w zakończeniach cholinergicznym, gromadzą najprawdopodobniej acetylocholinę (Whitaker i wsp. 1964). Badania Burna i Randa (1959) sugerują, że pęcherzyki o tej charakterystyce mikroskopowo-elektronowej występujące w zakończeniach katecholaminergicznym również zawierają acetylocholinę. Potwierdzają to spostrzeżenia Tranzera i Thoenena (1967b), które wykazały, że po inkubacji skrawków w roztworach o dużym stężeniu noradrenaliny, w zakończeniach katecholaminergicznym wzrasta liczba pęcherzyków ziarnistych, natomiast małe jasne pęcherzyki o średnicy 20—30 nm, podobnie jak w zakończeniach cholinergicznym, nie ulegają zmianie. Pęcherzyki opłaszczone uznane są powszechnie za pęcherzyki uczestniczące w pinocytozie.

Odrębnym zagadnieniem zasługującym na uwagę jest nie stwierdzenie w naszym materiale, podobnie jak w badaniach Baka (1967) oraz Gulleya i Smithberga (1971), pęcherzyków spłaszczonych. Według Uchizono (1965) zawierają one neurotransmitter o działaniu hamującym. Według Obaty i Highsteina (1970) podstawowym neuromediatozem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym jest kwas gama-aminomasłowy. Występuje on w dużych ilościach w istocie czarnej. Kontrowersyjność wyników badań biochemicznych i mikroskopowo-elektronowych wymaga odrębnego wyjaśnienia.

W badaniach ilościowych w grupie zwierząt poddanych działaniu desmetyloimipraminy stwierdzono wysoce statystycznie znamienne w zestawieniu z kontrolą obniżenie liczby małych pęcherzyków ziarnistych przy znacznym spadku liczby małych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem, wraz z jednoczesnym, wprawdzie statystycznie nieznamionym, wzrostem liczby dużych pęcherzyków ziarnistych i nieznacznym podwyższeniem proporcji dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem. Spostrzeżenia te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Shaskana i Snydera (1970) oraz Horna i wsp. (1971), którzy wykazali, że desmetyloimipramina hamuje neuronalny wychwyt noradrenaliny i sero-

toniny, natomiast nie wpływa na neuronalny wychwyt dopaminy. W grupie zwierząt poddanych działaniu wyłącznie 5-hydroksydopaminy stwierdzono natomiast statystycznie nieznamienne w porównaniu z kontrolą wzrost liczby małych pęcherzyków ziarnistych oraz bardzo znaczny wzrost liczby zarówno małych, jak i dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań Tranzera i Thoena (1967a), Richardsa i Tranzera (1969, 1970) oraz Ibaty i wsp. (1974, 1975), którzy stwierdzili, że 5-hydroksydopamina jako „falszywy” neurotransmitter monoaminergiczny wzbogaca ziarnistości zarówno w małych, jak i w dużych pęcherzykach ziarnistych.

Po łącznym podaniu desmetyloimipraminy i 5-hydroksydopaminy obserwowano wysoce statystycznie znamienne w porównaniu z kontrolą obniżenie liczby małych pęcherzyków ziarnistych ze znacznym spadkiem proporcji ich grupy charakteryzującej się obecnością ciemnego rdzenia oraz, wprawdzie statystycznie nieznamienne, wzrost ogólnej liczby dużych pęcherzyków ziarnistych z uderzającym jednak przyrostem proporcji dużych pęcherzyków ziarnistych z ciemnym rdzeniem. Uzyskane przez nas wyniki, podobnie jak spostrzeżenia Shaskana i Snydera (1970), Horna i wsp. (1971) oraz Tennyson i wsp. (1975), wykazują, że 5-hydroksydopamina po podaniu desmetyloimipraminy staje się markerem dopaminy. Wskazują one również, że duże pęcherzyki ziarniste zawierają najprawdopodobniej dopaminę.

Autorzy składają podziękowanie przedstawicielstwu firmy Ciba-Geigy AG w Warszawie za udostępnienie do badań desmetyloimipraminy (Pertofran).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДОФАМИНЭРГИЧЕСКИХ ФОЛЛИКУЛ В ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИХ КАРТИНАХ ПЛОТНОГО СЛОЯ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА КРЫСЫ

Резюме

Электронно-микроскопные исследования относились к большим гранулезным и светлым фолликулам диаметром в 70—120 нм и к малым гранулезным и светлым фолликулам диаметром в 40—60 нм, наблюдаемым в перикарионах нервных клеток и в аксонах и синапсах плотного слоя черного вещества крысы. Материал для исследований составляло 8 крыс, разделенных на 4 группы: 1) после введения десметилоимирамина; 2) после введения 5-гидроксидафамина; 3) после совместного введения десметилоимирамина и 5-гидроксидафамина и 4) животные неподверженные никаким процедурам (контрольная группа). Констатировано, что после введения десметилоимирамина кроме многочисленных малых гранулезных фолликул с сердцевидной с малой электронной плотностью появились многочисленные светлые фолликулы диаметром в 40—60 нм. После введения 5-гидроксидафамина выступали многочисленные малые и большие гранулезные фолликулы с сердцевидной с большой электронной плотностью. После совместного введения обоих соединений были видны многочисленные большие гранулезные фолликулы с сердцевидной с большой электронной плотностью и много-

численные малые гранулезные фолликулы с сердцевиной с малой электронной плотностью. Известно, что после введения десметилоимипрамина 5-гидроксидофамин становится маркером исключительно дофамина и следовательно исследования авторов наводят на мысль, что большие гранулезные фолликулы диаметром в 70—120 нм содержат дофамин. Светлые фолликулы наиболее вероятно являются переходной формой гранулезных фолликул с этим самым диаметром.

ELECTRON MICROSCOPIC IDENTIFICATION OF DOPAMINERGIC VESICLES IN THE COMPACT ZONE OF THE SUBSTANTIA NIGRA IN RATS

Summary

The electron microscopic study concerned large granular and clear vesicles 70—120 nm in diameter and small granular and clear vesicles 40—60 nm in diameter, observed in the perikarya of neurons, and within the axons and synapses of the compact zone of substantia nigra in rats. The studies were carried out on 8 rats divided into 4 groups: 1) after desmethylinipramine (inhibitor of neuronal uptake of noradrenaline and serotonin) administration, 2) after 5-hydroxydopamine (a "false" monoaminergic neurotransmitter) administration, 3) after pretreatment with both compounds and 4) on animals not subjected to any experimental procedure (control group). The vesicles were counted on electron-micrographs at a magnification of X 30 600. In each of the examined 4 groups the number of vesicles was determined on 24 areas of 14 400 mm² each, this corresponding to 0.47 mm² of surface area of the specimen. Moreover, the percentual value of the arithmetic mean of number of small and large granular vesicles with dark and clear core was determined, with arithmetic mean of sum of all vesicles counted on one area, assumed as 100 per cent. The results obtained demonstrated that after desmethylinipramine administration, 5-hydroxydopamine becomes an marker of dopamine. It was also determined that large granular vesicles contain most probably dopamine granules.

PIŚMIENNICTWO

1. Anden N. E., Carlsson A., Dahlaström A., Fuxe K., Hillarp N. A., Larsson K.: Demonstration and mapping out of nigral-neostriatal dopamine neurons. *Life Sci.*, 1964, 3, 523—530.
2. Anden N. E., Dahlaström A., Fuxe K., Larsson K.: Further evidence for the presence of nigro-striatal dopamine neurons in the rat. *Amer. J. Anat.*, 1965, 126, 329—433.
3. Bak I. J.: The ultrastructure of the substantia nigra and caudate nucleus of the mouse and the cellular localization of catecholamines. *Exp. Brain Res.*, 1967, 3, 40—57.
4. Banks P., Kapeller K., Mayer O.: The effects of iproniazid and reserpine on the accumulation of granular vesicles and noradrenaline in constricted adrenergic nerves. *Br. J. Pharmacol.*, 1969, 37, 10—16.
5. Bloom F. E., Aghajanian G. K.: An electron microscopic analysis of large granular vesicles of the brain in relation to monoamine content. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1968, 159, 261—273.
6. Bondareff W.: Submicroscopic morphology of granular vesicles in sympathetic nerves of rat pineal body. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 1969, 67, 211—217.

7. Burn J. H., Rand M. J.: Sympathetic postganglionic mechanism. *Nature (Lond.)*, 1959, 184, 163—165.
8. Carlsson A., Falck G., Hillarp N. A.: Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol. Scand.*, 1962, 56, Suppl. 196, 1—28.
9. Falck G.: Observations on the possibilities of the cellular localization of monoamines by a fluorescence method. *Acta Physiol. Scand.*, 1962, 56, Suppl. 197, 1—26.
10. Gulley R. L., Smithberg M.: Synapses in the rat substantia nigra. *Tissue Cell*, 1971, 3, 691—700.
11. Gulley R. L., Wood R. L.: The fine structures of the neurons in the rat substantia nigra. *Tissue Cell*, 1971, 3, 675—690.
12. Hökfelt T.: In vitro studies on central and peripheral monoamine neurons at the ultrastructural level. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 1968, 91, 1—14.
13. Hökfelt T., Ungerstedt U.: Electron and fluorescence microscopical studies on the nucleus caudatus and putamen of the rat after unilateral lesions of ascending nigrostriatal neurons. *Acta Physiol. Scand.*, 1969, 76, 427—440.
14. Hökfelt T., Ungerstedt U.: Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons: An electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. *Brain Res.*, 1973, 60, 269—297.
15. Horn A. S., Coyle J. T., Snyder S. H.: Catecholamine uptake by synaptosomes from rat brain. Structure-activity relationships of drugs with differential effects on dopamine and norepinephrine neurons. *Mol. Pharmacol.*, 1971, 7, 66—80.
16. Ibata J., Matsuura T., Nojyo J., Inoue T., Sano J.: The effect of 5- and 6-hydroxydopamine on the central monoaminergic neurons of the rat and the cat. Fluorescence histochemistry and electron microscopy. *Acta Histochem. Cytochem.*, 1974, 7, 126—139.
17. Ibata J., Nojyo J., Matsuura T., Joshikawa H., Sano J.: Electron microscopy of the arcuate nucleus of normal and 5-hydroxydopamine treated cats. *Cell Tiss. Res.*, 1975, 160, 139—153.
18. Jaim-Etcheverry G., Zichrer L. M.: Ultrastructural aspects of neuro-transmitter storage in adrenergic nerves. *Adv. Cytopharmacol.*, 1971, 1, 334—341.
19. Obata K., Higstein S. M.: Blocking by picrotoxin of both vestibular inhibition and GABA action on rabbit oculomotor neurons. *Brain Res.*, 1970, 18, 530—541.
20. Pellegrino DeIraldi A., DeRobertis E.: Action of reserpine, iproniazid and pyrogallol on nerve endings of the pineal gland. *Int. J. Neuropharmacol.*, 1963, 2, 231—239.
21. Richards J. G., Tranzer J. P.: Electron microscopic localization of 5-hydroxydopamine a "false" adrenergic neurotransmitter in the autonomic nerve endings of the rat pineal gland. *Experientia (Basel)*, 1969, 25, 53—54.
22. Richards J. G., Tranzer J. P.: The ultrastructural localization of amine storage sites in the central nervous system with the aid of specific marker-5-hydroxydopamine. *Brain Res.*, 1970, 17, 463—469.
23. Shaskan E. G., Snyder S. H.: Kinetics of serotonin accumulation into slices from rat brain. Relationship to catecholamine uptake. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1970, 175, 404—418.
24. Tennyson V., Mytilineou C., Heikkila R., Barrett R. E., Cohen G., Cote L., Duffy P. E., Marco L.: Dopamine-containing neurons of the substantia nigra and their terminals in the neostriatum. [W:] *Brain mechanisms in mental retardation*. Ed: N. A. Buchwald, M. A. B. Brazier. Acad. Press, New York—San Francisco—London 1975, pp. 227—264.
25. Terland O., Flatmark T., Kryvi H.: Isolation and characterization of noradre-

- naline storage granules of bovine adrenal medulla. *Biochem. Biophys. Acta*, 1979, 553, 460—482.
26. Tranzer J. P., Thoenen H.: Electron microscopic localization of 5-hydroxydopamine (3, 4, 5-trihydroxy-phenyl-ethylamine), a new "false" sympathetic transmitter. *Experientia* (Basel), 1967 a, 23, 743-745.
 27. Tranzer J. P., Thoenen H.: Significance of "empty vesicles" in postganglionic nerve terminals. *Experientia* (Basel), 1967 b, 23, 123—124.
 28. Uchizono K.: Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 1965, 207, 642—643.
 29. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kirkland R. J. A.: The separation of synaptic vesicles from nerve-ending particles ("synaptosomes"). *Biochem. J.*, 1964, 90, 293—303.

Adres autorów: Pracownia Mikroskopii Elektronowej Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

<http://rcin.org.pl>

SPIS PRAC OPUBLIKOWANYCH
W „NEUROPATOLOGII POLSKIEJ”
W ROKU 1984 — TOM 22

Adamek Dariusz, Józef Kałuża, Witold Mieżyński, Tadeusz Małek: Osłoniaki złośliwe (<i>schwannoma malignum</i>) u dzieci. Patomorfologia i epikryza kliniczna	225
Albrecht Jan: Zaburzenia metaboliczne w encefalopatii wątrobowej	499
Barcikowska-Litwin Maria: Obraz morfologiczny ogniska rozmiękania mózgowego w wieku starym	563
Brzoso Witold J., Zbigniew K. Laskowski, Barbara Dąbrowska-Bernstein, Dorota Matacz, Jerzy Kulczycki, Janina Płachcińska: Studies on the pathogenesis of subacute sclerosing panencephalitis	23
Dąbska Maria, Danuta Maślińska, Jerzy Onyszkiewicz, Anna Wilmowska-Pietruszyńska: Effect of recurrent seizures in pregnant rabbits on the development of fetal brain	117
Dąbska Maria, Lech Iwanowski, Danuta Maślińska, Maria Ostenda: Blood-brain barrier in young rabbit brain after dichlorvos intoxication	129
Dąbska Maria, Lech Iwanowski: Zmiany w strukturze ścian komór mózgu u dzieci w następstwie uszkodzenia niedojrzałej istoty białej	491
Dydyk Lubomira, Ryszard Pluta: Wpływ wysokiej temperatury na ultrastrukturę kory mózgu i substancji białej podkorowej królika	97
Dydyk Lubomira, Mirosław J. Mossakowski: Ultrastructural alterations of the grey matter structures of the brain due to experimental manganese intoxication	265
Dymecki Jerzy, Elżbieta Medyńska, Michał Walski: Influence of the method of sacrificing of experimental animals on the motor cortex synapses pattern (morphometric evaluation)	63
Gajkowska Barbara, Mirosław J. Mossakowski, Anna Zareba-Kowalska: Action of indomethacin on nucleolar fine structure. Preliminary report	367
Godlewski Antoni, Józef Szczech: Zmiany histoenzymatyczne istoty białej mózgu młodych szczurów zachodzące pod wpływem winkrystyny podawanej w drugiej połowie życia płodowego	415
Hausmanowa-Petrusewicz Irena, Anna M. Kamińska: Diagnostic yield of quantitative electromyography and muscle biopsy in myopathic diseases (report of 464 cases)	307
Hilgier Wojciech, Jan Albrecht: Poziom amoniaku oraz jego metabolitów w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej podczas przedłużonego działania tioacetamidu i w okresie powrotu do normy	179
Iwanowski Lech: Myelin in the senile rat brain. Preliminary report	219
Jedliński Jerzy, Danuta Bryniarska: Objawy kliniczne krwotoków wzgórza	523
Jędrzejewski Jacek, Aniela Gutowska-Maciągowa, Józef Kałuża: Występowanie i topografia krwotoków wzgórza	535
Kida Elżbieta, Krystyna Renkawek, Teresa Piórek: Obraz neuropatologiczny nasilonej dyskinezy twarzowo-językowej	387
Kroh Halina: Intranuclear inclusions in mouse neurons	139

II

Kulczycki Jerzy, Maria Koziak, Lucyna Szemis, Danuta Wierzybicka: Rak tarczycy wywodzący się z komórek Hürthlego z przerzutami do ośrodkowego układu nerwowego	245
Loesch Andrzej: ZIO-impregnowane kolbki synaptyczne w neuropilu jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura pozbawionego wody do picia	39
Łukaszyk Irena, Teresa Wrzolkowa, 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
Maziarz Lesław J., Józef Szczech: Zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w mózgu młodych i dojrzałych szczurów po podaniu CCNU (Lomustine)	399
Mossakowski Mirosław J., Halina Weinrauder: Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy <i>in vitro</i>	161
Mossakowski Mirosław J., Jerzy W. Borowicz, Wojciech Hilgier: Electron microscopy of hepatogenic encephalopathy in rats induced by thioacetamide intoxication	185
Mossakowski Mirosław J.: Mirosław Bernard Kozik 1928—1983	297
Mossakowski Mirosław J., Barbara Gajkowska: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in mongolian gerbils (<i>Meriones unguiculatus</i>)	347
Mossakowski Mirosław J.: Adam Opalski jako neurolog i neuropatolog	457
Mossakowski Mirosław J., Halina Weinrauder: Historia naturalna komórki Opalskiego	471
Olejniczak Piotr: Charakterystyka miażdżycy tętnic podstawy mózgu u chorych z cukrzycą	583
Pluta Ryszard: Zmiany temperatury mózgu i wybranych okolic ciała królika oraz jego zachowania się w podwyższonej temperaturze otoczenia	435
Pluta Ryszard, Jan Albrecht: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. Clinical observations	379
Pryszmont Michał, Eleonora Jankowicz, Emilia Krochmalska: W sprawie obrazu klinicznego podopiecznego zespołu Opalskiego	483
Rafałowska Janina: Dojrzewanie mieliny, demielinizacja i remielinizacja w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym	1
Rafałowska Janina, Hubert Kwieciński, Zygmunt Jamrozik: Rzadko spotykane naczyniopochodne uszkodzenia pnia mózgu. Zespół „locked in”	509
Rafałowska Janina, Maria Barcikowska-Litwin, Ewa Dolińska: W sprawie tzw. ostatnich łąk we wzgórzu i w pniu mózgu	549
Suliński Andrzej, Janina Rostkowska, Włodzimierz Bicz: Acetylcholinesterase activity in rat brain after exposure of the animals to raised temperature of the environment	257
Weinrauder Halina, Anna Zaręba-Kowalska: Immunofluorescent demonstration of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hypophyseal neural lobe <i>in vitro</i>	335
Wrzolkowa Teresa, Tomasz Cofta, Irena Łukaszyk: Capillary blood vessels of the brain. I. Vascularisation density in various parts of the cat and rat cerebral cortex	77
Wysmyk-Cybula Urszula: Badania metabolizmu kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej wywołanej czterochlorkiem węgla	197
Zaręba-Kowalska Anna, Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski: The effect of manganese on the ultrastructure of pituicytes <i>in vitro</i>	281
Zaręba-Kowalska Anna, Barbara Gajkowska: Effect of hyperthermia shock on the ultrastructure of cultured pituicytes	445
Zelman Irmina B., Anna Taraszewska: Patologia mieliny u królika pt	205

INDEKS NAZWISK AUTORÓW

- Adamek D. 225
 Albrecht J. 179, 379, 499

 Barcikowska-Litwin M. 549, 563
 Bicz W. 257
 Borowicz J. W. 185
 Bryniarska D. 523
 Brzosko W. J. 23

 Cofta T. 77, 85

 Dąbrowska-Bernstein B. 23
 Dąbwska M. 177, 129, 491
 Dolińska E. 549
 Dydyk L. 97, 265
 Dymecki J. 63

 Gajkowska B. 281, 347, 367, 445
 Godlewski A. 415
 Gutowska-Maciągowa A. 535

 Hausmanowa-Petrusewicz I. 307
 Hilgier W. 179, 185

 Iwanowski L. 129, 219, 491

 Jankowicz E. 483
 Jamrozik Z. 509
 Jedliński J. 523
 Jędrzejewski J. 535

 Kałuża J. 225, 535
 Kamińska A. M. 307
 Kida E. 387
 Koziak M. 245
 Krochmalska E. 483
 Kroh H. 139
 Kwieciński H. 509

 Laskowski Z. K. 23
 Loesch A. 39

 Łukaszuk I. 77, 85

 Małek T. 225
 Maślińska D. 117, 129
 Matacz D. 23
 Maziarz L. J. 399
 Medyńska E. 63
 Mieżyński W. 225
 Mossakowski M. J. 161, 185, 265, 297,
 281, 347, 367, 471

 Onyszkiewicz J. 117
 Ostenda M. 129

 Piórek T. 387
 Pluta R. 97, 379, 435
 Płachcińska J. 23
 Pryszmont 483

 Rafałowska J. 1, 509, 549
 Renkawek K. 387
 Rostkowska J. 257

 Suliński A. 257
 Szczech J. 399, 415
 Szemis L. 245

 Taraszewska A. 205

 Walski M. 63
 Weinrauder H. 161, 335, 471
 Wierzbicka D. 245
 Wilmowska-Pietruszyńska A. 117
 Wrzołkowa T. 77, 85
 Wysmyk-Cybula U. 197

 Zareba-Kowalska A. 281, 335, 367, 445,
 471
 Zelman I. B. 205

Мечислав Вендер, Зофия Адамчевска-Гонцкевич, Анджей Гонцкевич: Влияние изменений в содержании жирных кислот в диете на восприимчивость животных к действию энцефалитогенного антигена	129
Любомира Дыдык, Ельжбета Медыньска, Ольгерд Пуциловски: Идентификация дофаминэргических фолликул в электронно-микроскопной картине плотного слоя черного вещества крысы	145

CONTENTS

Małgorzata Muranyi: Functional relations between neurohormonal and immunological systems	1
Janusz Szymaś: Diagnostic value of demonstrating glial fibrillary acidic protein in human astrocytomas	23
Janusz Szymaś: Estimation of diagnostic value of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymomas	37
Ewa Matyja, Elżbieta Kida, Teresa Piórek: Case of carcinomatosis of leptomeninges	49
Barbara Gajkowska, Andrzej Loesch, Ryszard Pluta: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei	55
Andrzej Loesch, Barbara Gajkowska, Ryszard Pluta: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons	71
Roman Gadamski, Roman Lasocki: Morphological changes and acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity in reticular formation nuclei and neurosecretive nuclei of the hypothalamus in rabbits subjected to environment hyperthermia	73
Andrzej Kapuściński, Mirosław J. Mossakowski: Pharmacological attempt to prevent ischemic changes in the brain following complete cerebral ischemia in rabbits	97
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Żórawski: Effect of fatty acid-enriched diet on the composition of fatty acids in lipids of cerebral myelin during development	119
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Goncerzewicz: Influence of inappropriate diet during development on the susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis	129
Lubomira Dydyk, Elżbieta Medyńska, Olgierd Puciłowski: Electron microscopic identification of dopaminergic vesicles in the compact zone of the substantia nigra in rats	145

SPIS TREŚCI

Małgorzata Muranyi: Powiązania czynnościowe między układem neurohormonalnym a immunologicznym	1
Janusz Szymaś: Wartość diagnostyczna badania kwaśnego białka włókienek glejowych (GFAP) w gwiazdździakach u ludzi	23
Janusz Szymaś: Ocena znaczenia diagnostycznego kwaśnego białka włókienek glejowych w wyściółczakach	37
Ewa Matyja, Elżbieta Kida, Teresa Piórek: Przypadek rakowatości opon miękkich mózgu	49
Barbara Gajkowska, Andrzej Loesch, Ryszard Pluta: Wpływ wysokiej temperatury na układ podwzgórzowo-przysadkowy królika. I. Jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe	55
Andrzej Loesch, Barbara Gajkowska, Ryszard Pluta: Wpływ wysokiej temperatury na układ podwzgórzowo-przysadkowy królika. II. Neuroprzysadka	71
Roman Gadamski, Roman Lasocki: Zmiany morfologiczne oraz aktywność fosfatazy kwaśnej i pirofosfatazy tiaminowej w jądrach tworzących siatkowatego i jądrach neurosekrecyjnych podwzgórza u królików poddanych działaniu podwyższonej temperatury otoczenia	83
Andrzej Kapuściński, Mirosław J. Mossakowski: Próby farmakologicznego przeciwdziałania rozwojowi zmian niedokrwiennych w mózgu królików po jego całkowitym niedokrwieniu	97
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Żórawski: Wpływ diety z podwyższoną zawartością kwasów tłuszczowych na skład kwasów tłuszczowych lipidów mielin w okresie rozwoju	119
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Goncerzewicz: Wpływ zmian w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie na wrażliwość zwierząt na działanie antygeny encefalitogennego	129
Lubomira Dydyk, Elżbieta Medyńska, Olgierd Puciłowski: Identyfikacja pęcherzyków dopaminergicznych w obrazach mikroskopowo-elektronowych zbitiej warstwy istoty czarnej szczura	145

СОДЕРЖАНИЕ

Малгожата Мураньи: Функциональные связи между нейрогормональной и иммунологической системой	1
Януш Шимась: Диагностическая ценность исследования кислого белка глиозных фибрилл (GFAP) в астроцитоммах у людей	23
Януш Шимась: Оценка диагностического значения кислого белка глиозных фибрилл в эпендимоммах	37
Эва Матья, Эльжбета Киды, Тереса Пюрко: Случай канцероматоза мягких оболочек головного мозга	49
Барбара Гайковска, Анджей Леш, Рышард Плюта: Влияние высокой температуры на гипоталамо-гипофизарную систему кролика. I. Надзрительное ядро и околожелудочковое ядро	55
Анджей Леш, Барбара Гайковска, Рышард Плюта: Влияние высокой температуры на гипоталамо-гипофизарную систему кролика. II. Неврогипофиз	71
Роман Гадамски, Роман Лясоцки: Морфологические изменения и активность кислой фосфатазы и тиаминовой пиррофосфатазы в ядрах ретикулярной формации и нейросекреторных ядрах гипоталамуса у кроликов подвергнутых действию повышенной температуры окружения	73
Анджей Капусьцински, Мирослав Я. Моссаковский: Попытки фармакологического противодействия ишемических изменений в мозге кроликов после глобальной задержки кровоснабжения	97
Мечислав Вендер, Зоя Адамчевска-Гонцевич, Анджей Журавски: Влияние диеты с повышенным содержанием жирных кислот на состав жирных кислот липидов миеллина в периоде развития	119