

p. 105

II epiz. zelan

eqz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 23

1985

ZESZYT 2

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 23

1985

ZESZYT 2

KOMITET REDAKCYJNY

Jan Albrecht, Jolanta Borowska-Lehman, Maria Dąbbska, Jerzy Dymecki, Janusz Groniowski, Józef Kałuża, Adam Kunicki, Mirosław J. Mossakowski, Wielisław Papierz, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓLPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski
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, 49-70-18

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1985.
Nakład: 580 egz. Objętość: ark. wyd. 8, ark. druk. 6,63, ark. A₁-9.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100. Oddano do składania 1985-02-28.
Podpisano do druku 1985-07-12. Druk ukończono w lipcu 1985.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3119/85. R-7 Cena zł 125.—

<http://rcin.org.pl>



JERZY DYMECKI, DANUTA MARKIEWICZ, MACIEJ PÓLTORAK, OLGIERD
PUCIŁOWSKI, WOJCIECH KOSTOWSKI, ANDRZEJ BIDZIŃSKI

EFFECTS OF INTRACEREBRAL TRANSPLANTATION
OF IMMATURE SUBSTANTIA NIGRA IN RATS WITH
EXPERIMENTALLY INDUCED PARKINSON'S DISEASE

I. COMPARATIVE EVALUATION OF TWO MODELS OF PARKINSON'S DISEASE
INDUCED BY UNILATERAL STEREOTAXIC LESION OF THE SUBSTANTIA NIGRA
WITH ELECTROCOAGULATION AND WITH 6-HYDROXYDOPAMINE

Department of Neuropathology, Department of Pharmacology and Physiology, Department of
Biochemistry, Psychoneurological Institute, Warsaw

Parkinson's disease is one of the most frequent degenerative diseases of the nervous system. The intensity of the basic symptoms of this disease — hypokinesia and tremor is directly proportional to the depression of dopamine (DA) metabolism in the striatum. This in turn is connected with the reduced activity of the whole nigro-striatal pathway owing to degeneration of DA-containing cells within the compact zone of substantia nigra (Hornykiewicz 1963). These findings gave a theoretical basis for treatment of Parkinson's disease with L-dihydroxyphenylalanin (L-DOPA), a DA precursor. Its application was a marked progress in the therapy of this disease. The considerable improvement in the clinical course in patients is due to the enhancement of DA metabolism by this drug, especially within the striatum (Lloyd et al. 1975).

Substitutive treatment with L-DOPA is, however, limited, either on account of frequent cases resistant to this drug (Izumi et al. 1971) or because of a number of undesirable symptoms appearing during the cure (Dwoision, Yahr 1972; Larsen, Calne 1982). Moreover, even in cases when the pathologic symptoms recede under pharmacological treatment, the prognosis remains unfavourable as regards healing. Therefore, new methods continue to be searched for in the therapy of this condition. One of the more recent lines of research are investigations on the efficiency of transplantation of fetal substantia nigra (SN) cells directly into the striatum (Björklund et al. 1980; Freed et al. 1980). If this substitutional method could be introduced

Study supported by a grant of the Polish Academy of Sciences within the programme No. 10.4.05.2.4.

into the neurological clinic a great progress and hope of better therapeutic results for patients suffering from Parkinson's disease could be achieved.

For this kind of investigation the experimental model of Parkinson's disease should be elaborated, reflecting two main findings characteristic for human Parkinson's disease — degeneration of the neurons of the compact part of substantia nigra and a reduction of the dopamine level in the striatum. The attention of investigators interested in experimental models of this disease is mainly concentrated on the search for methods of selective damaging of the nigro-striatal dopaminergic system. In order to obtain a lesion of this system a unilateral stereotaxic destruction of pars compacta of the SN was achieved by two methods — electrocoagulation or injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), according to Ungerstedt (1968). The action of the latter is connected with the similarity of its chemical structure to that of DA. Dopaminergic and noradrenergic neurons accumulate actively 6-OHDA which further undergoes intracellular oxidation as the result of which these neurons are destroyed (Hököfeld, Ungerstedt 1973; Ungerstedt et al. 1973; Kostrzewa, Jacobowitz 1974).

The aim in view in the present study was to compare the usefulness of both experimental models, especially their morphological and biochemical effects in dependence on the kind of damaging factor and the time of survival after injury.

The results should serve for the choice of the most suitable model for further experimental investigations on the influence of transplantation of immature SN cells as a method of substitutive compensation of the disturbances evoked by degeneration of the nigro-striatal system.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were performed with rats of the Wistar strain weighing 180–200 g. The material for morphological studies, consisting of 26 animals was divided into two experimental groups. In group A of 12 rats, the compact part of the SN was lesioned by electrocoagulation in a Stoelting stereotaxic apparatus. Rats were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.), and electrolytic lesions were made stereotaxically according to the coordinates of the König and Klippel atlas (1963): A = 2.4 mm, L = 1.8 mm, V = 2.3 mm. Parameters of electric current were: 1.5 mA for 7 sec. In group B of 9 rats unilateral chemical destruction of the dopaminergic cells of the compact part of the SN (area A9) was performed by stereotaxic injection of 6-OHDA. In order to limit the noxious action of 6-OHDA solely to the DA cells, and particularly to spare the noradrenergic neurons, the animals received 45 min before toxin application desipramine HCl (Pertofran, Ciba-Geigy) in a 25 mg/kg dose i.p. 6-OHDA was injected under general chloral hydrate anesthesia (400 mg/kg i.p.). The rats were placed in a Stoelting stereotaxic apparatus so, that the base of the incisors was angled 5° downward to the interaural line. Then through the hole bored in the skull, the needle of a Hamilton syringe (701-N) was introduced into the compact part of the SN, on the right side according to the coordinates of König and Klippel's atlas (1963): A = 2.4 mm, L = 1.8 mm, V =

2.3 mm, and 8 $\mu\text{g}/4 \mu\text{l}$ of freshly prepared 6-OHDA-hydrobromide (Calbiochem-Behring) was injected at a rate of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. As solvent served a cold physiological saline solution containing 0.2 mg/ml ascorbic acid. Group C of 5 rats served as control. They were subjected to sham lesions, that is a cannula was introduced into the pars compacta of the SN identically as in the experimental animals, but without applying electric current or 6-OHDA solution.

The animals were decapitated after 2, 4, 7, 14 and 21 days. For morphological investigation the brains were fixed in 5% formol solution. Paraffin sections were cut serially in the frontal plane. The preparations were stained either with HE or by the Klüver—Barrera method. The efficacy of the damage of the compact part of the SN was evaluated microscopically according to a four-degree score, from 0 to 3 (Tab. 1) at five levels of the stereotaxic rat brain atlas of König and Klippel (1963) at which substantia nigra was visible.

In order to evaluate the efficacy of the lesion of SN the content of DA separately in the right and left brain hemisphere was examined. Biochemical analysis was performed on 19 Wistar rats divided also into three similar experimental groups. Extraction of catecholamines from tissue was carried out according to the method of Haubrich and Denzer (1973). After isolation on aluminium oxide, dopamine concentrations in brain were determined by the fluorimetric method of Chang (1964).

RESULTS

Morphological investigations

In macroscopic examinations a slight defect of tissue of about 0.5 mm diameter corresponding to the pathway of the cannula was visible on the dorsal surface of the rat brain, similar in all experimental groups. This pit had rust-coloured edges, it was localized in the paramedial-posterior area of the occipital lobe of the right cerebral hemisphere. The course of this channel on coronal sections of the brain is illustrated in the diagram (Fig. 1). A cuneate cortical defect penetrated into the channel indicating the pathway of the cannula, reaching finally the pars compacta of the SN. Microscopically necrotic changes were observed along this channel and tissue reaction in the form of single macrophages as well as glia and mesenchymal cells proliferation with microglial rods.

Group A — electrocoagulative lesion of SN

Localization of the lesion is shown in the diagrams (Figs 1, 2). The lesion due to electrocoagulation appeared as focal necrosis of diffusive type, usually destroying completely the compact part of the SN. The shape of the foci and their size varied at different levels within the same brain. The lesioned area usually involved to some extent the lemniscus medialis, the ventral part of the red nucleus, the pars reticularis of the SN and sometimes the dorsal part of the cerebral peduncles. Sometimes the lesion was localized above or below the compact part of the SN and some neurons

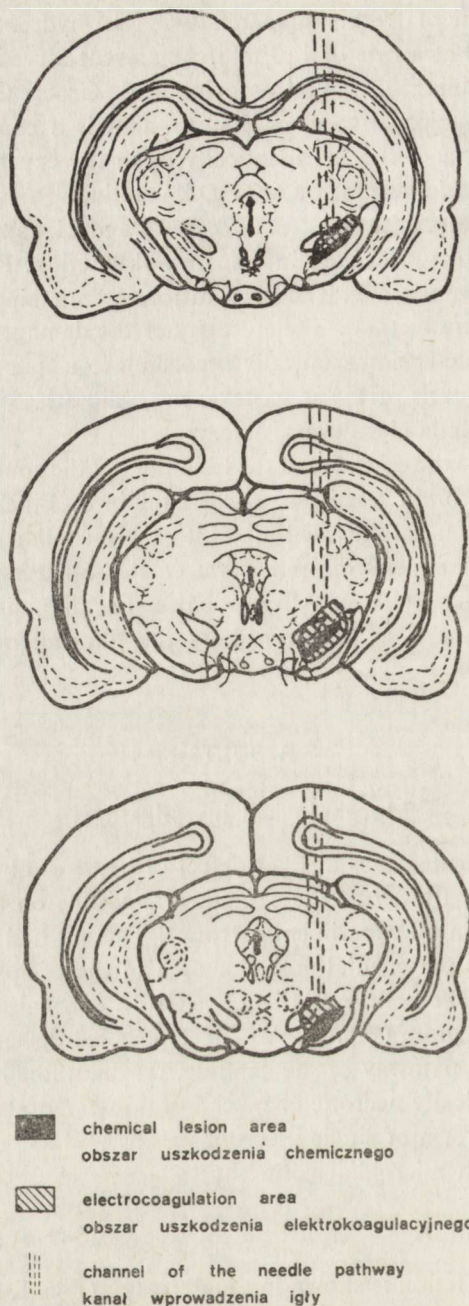


Fig. 1. Diagram representing three levels of the rat brain according to atlas of König and Klippel (1963). The most typical areas of SN lesions after electrocoagulation and application of 6-OHDA. The pathway of cannula introduction is shown

Ryc. 1. Schemat trzech poziomów mózgu szczura wg Atlasu Königa i Klippela (1963), na którym uwidoczniło typową lokalizację uszkodzeń istoty czarnej po zastosowaniu elektrokoagulacji i wstrzyknięciu 6-OHDA. Widoczny jest również kanał wkłucia igły

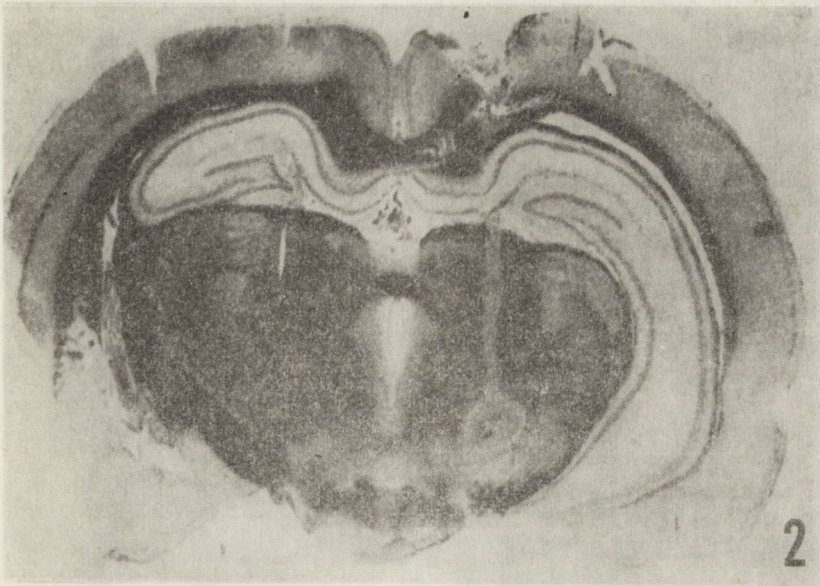


Fig. 2. Localisation of damage by electrocoagulation of right substantia nigra. Klüver-Barrera. Magn. glass

Ryc. 2. Lokalizacja zniszczenia istoty czarnej po stronie prawej po zastosowaniu elektrokoagulacji. Klüver-Barrera. Pow. lupowe

Table 1. Comparison of efficacy of SN destruction by electrocoagulation and chemical method (6-OHDA)

Tabela 1. Porównanie efektywności zniszczenia istoty czarnej przy zastosowaniu elektrokoagulacji i metody chemicznej (6-OHDA)

Degree of destruction Stopień zniszczenia	electrocoagulation elektrokoagulacja	chemical method metoda chemiczna
0	8%	11%
1	58%	22%
2	17%	22%
3	17%	45%

- 0 — complete destruction of neurons of compact part of SN is not noticeable at any of the five examined mesencephalon levels
na żadnym z pięciu badanych poziomów śródmózgowia nie stwierdza się pełnego zniszczenia neuronów części zbitnej SN
- 1 — complete destruction of neurons visible at one level at least
pełne zniszczenie neuronów widoczne co najmniej na jednym poziomie
- 2 — complete destruction of neurons at two levels at least
pełne zniszczenie neuronów co najmniej na dwóch poziomach
- 3 — complete destruction of neurons at three or more levels
pełne zniszczenie neuronów na 3 lub więcej poziomach

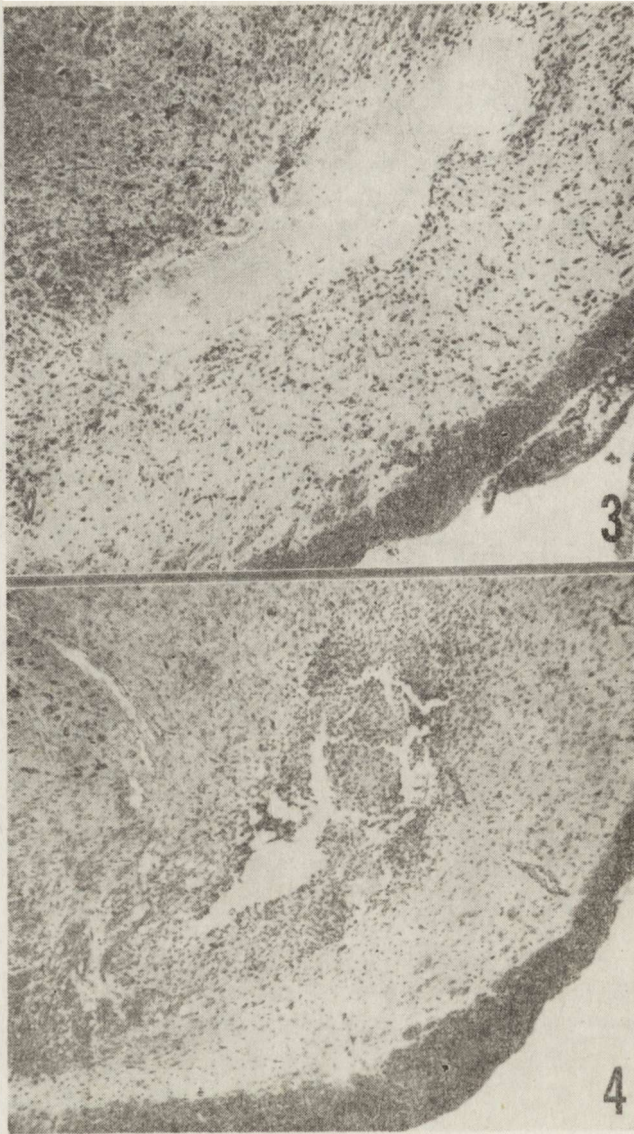


Fig. 3. Electrocoagulation. Survival time — 2 days. Extensive tissue defect in the area of compact part of the SN filled with protein-rich fluid. Klüver-Barrera. $\times 60$

Ryc. 3. Elektrokoagulacja. Czas przeżycia 2 dni. Rozległy ubytek tkanki wypełniony bogatobiałkowym płynem w obszarze części zbitą istoty czarnej. Klüver-Barrera. Pow. $60\times$

Fig. 4. Electrocoagulation. Survival time — 4 days. Large necrotic focus with intensive gliomesodermal reaction. The lesion comprises compact part of the SN and adjacent structures. Klüver-Barrera. $\times 60$

Ryc. 4. Elektrokoagulacja. Czas przeżycia — 4 dni. Duże ognisko martwicy z intensywną reakcją glicjowo-mezodermalną. Obszar uszkodzenia obejmuje część zbitą istoty czarnej i przyległe struktury. Klüver-Barrera. Pow. $60\times$

of this structure were found to be intact. The efficacy of electrolytic damage of the pars compacta of the SN according to the above mentioned score (Tab. 1) was as follows: 0—1 case, 1—7 cases, 2—2 cases, 3—2 cases.

As far as the dynamics of changes is concerned, on the 2nd day after electrocoagulative injury an extensive tissue defect was visible filled with fluid rich in protein (Fig. 3). In higher magnification the surrounding tissue showed spongiosis and

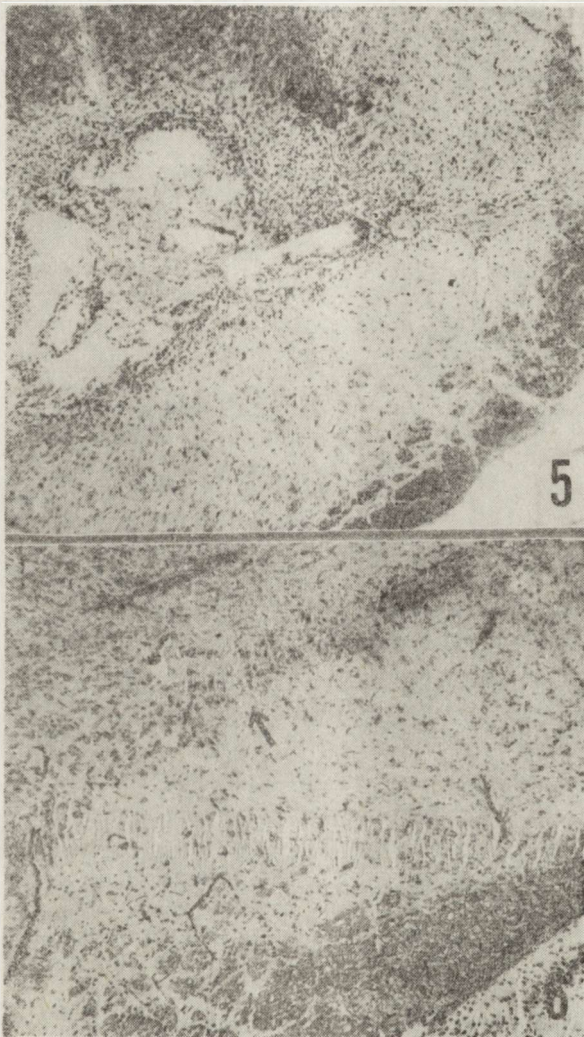


Fig. 5. Electrocoagulation. Survival time — 7 days. Extensive necrotic area, well demarkated, exceeds the compact part of the SN. Klüver—Barrera. $\times 60$

Ryc. 5. Elektrokoagulacja. Czas przeżycia — 7 dni. Dobrze odgraniczone, rozległe ognisko martwicy przekracza obszar części zbitnej istoty czarnej. Klüver—Barrera. Pow. $60 \times$

Fig. 6. Lesion produced by 6-OHDA. Survival time — 2 days. Partial loss of neurons in compact part of the SN (arrow). The preserved neurons show degenerative changes. Klüver—Barrera. $\times 60$

Ryc. 6. Uszkodzenie wywołane przez 6-OHDA. Czas przeżycia — 2 dni. Ubytki neuronów w części zbitnej istoty czarnej (strzałka). Zachowane neurony wykazują zmiany zwyrodnieniowe. Klüver—Barrera. Pow. $60 \times$

a discrete proliferation of glio-mesodermal cells. On the 4th day intensive proliferation of cellular elements in the lesion area and enhanced edematous changes around the lesion were noted (Fig. 4). On the 7th day a distinct demarcation of the edge of the necrotic focus was visible (Fig. 5). The presence of numerous foamy macrophages containing sometimes hemosiderin grains were noted. After 14 and

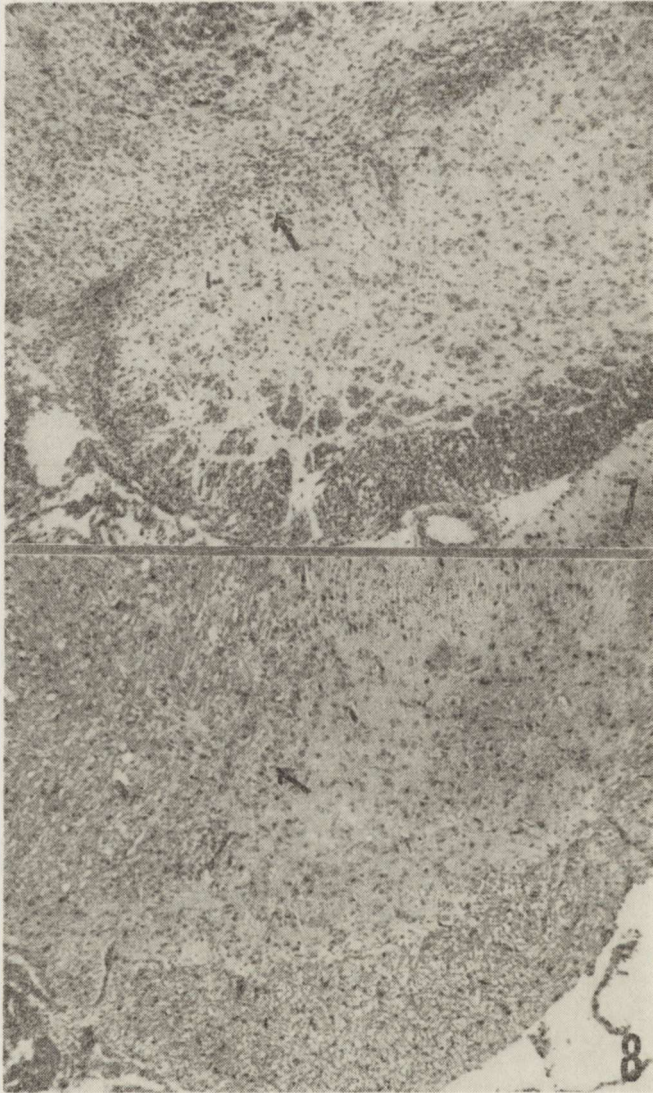


Fig. 7. Destruction caused by 6-OHDA. Time of survival 4 days. Narrow strand of proliferative cell reaction in the lesioned area (arrow). Klüver-Barrera. $\times 60$

Ryc. 7. Uszkodzenie wywołane przez 6-OHDA. Czas przeżycia — 4 dni. Wąskie pasmo rozplemowej reakcji komórkowej w obszarze uszkodzenia (strzałka). Klüver-Barrera. Pow. $60 \times$

Fig. 8. Lesion produced by 6-OHDA. Survival time — 7 days. Selective loss of neurons in compact part of the SN with discrete tissue rarefaction (arrow). H-E. $\times 60$

Ryc. 8. Uszkodzenie wywołane przez 6-OHDA. Czas przeżycia — 7 dni. Wybiórcze ubytki neuronów w części zwartej istoty czarnej z delikatnym rozluźnieniem podłoża (strzałka). H-E. Pow. $60 \times$

21 days repair reactions dominated in the lesion focus. The tissue defects had the form of a single hole or a system of holes, separated by a network of vessels and fibers and covered by loosely lying macrophages. In the surroundings an almost complete extinction of the cellular reaction was observed.

Group B — lesion of SN caused by 6-OHDA

The most typical localization, area and shape of the lesion foci are illustrated in Figure 1. Chemical injury, in contrast to the electrocoagulative damage, had the form of selective necrosis, destroying neurons of the compact part of the SN without distinct features of injury to other structures. The shape of the foci was usually elongated. It is noteworthy that even when the localization of the lesion was not quite correct, frequently a complete loss of neurons of the compact part of the SN was seen, not only at the level of the needle pathway but also on cross sections above and below it. The efficacy of the lesion after 6-OHDA injection according to the adopted score was as follows: 0—1 case, 1—2 cases, 2—2 cases, 3—4 cases.

On the 2nd day of survival after 6-OHDA injection a complete or partial disappearance of the compact part neurons was noticeable. The preserved neurons showed degenerative features (Fig. 6). On the 4th and 7th day of survival a proliferative cell reaction with the participation of macrophages was visible at the site of 6-OHDA injection (Fig. 7). Along the prolongation of the focus in cranial or caudal direction frequently selective loss of neurons of the compact part was seen with discrete rarefaction of the tissue structure (Fig. 8). A narrow strand of glio-mesodermal scar was visible on day 14 and 21 of survival limited almost exclusively to the compact part of the SN. Table 1 shows the comparison of efficacy of the SN lesion by electrocoagulation and by 6-OHDA.

Group C — control (sham lesions)

On coronal sections of the brain the channel of the cannula was visible, like in experimental groups. The compact part of the SN was intact.

Biochemical investigations

Effect of SN electrocoagulation on DA content

The efficacy of lesion was evaluated 5 days after surgery. The biochemical results are presented in table 2. This table shows that the DA content of the lesioned right hemisphere is significantly lower than of the left (non lesioned hemisphere) at the level of $p < 0.001$.

Effect of 6-OHDA lesion on DA content

Table 2 shows that the chemical lesion caused a more pronounced decrease of DA content in the right hemisphere than electrocoagulation ($p < 0.001$). In both groups the mean difference between right and left hemisphere was also significantly higher in rats with SN lesion than in sham-operated control animals ($p < 0.02$).

Table 2. Comparison of dopamine content in left and right hemisphere of rat brains with electrocoagulation and chemical lesion of right compact part of SN

Tabela 2. Porównanie zawartości dopaminy w lewej i prawej półkuli mózgu szczurów po uszkodzeniu elektrokoagulacyjnym i po chemicznym zniszczeniu części zbitej istoty czarnej

Character of lesion Charakter uszkodzenia	n	Dopamine content (ng/g of wet tissue) Zawartość dopaminy (ng/g świeżej tkanki)		
		left hemisphere (nonlesioned) lewa półkula (nieuszkodzona)	right hemisphere (lesioned) prawa półkula (uszkodzona)	mean difference between left and right hemisphere średnia różnica między lewą i prawą półkulą
Electrocoagulation Elektrokoagulacja	8	1517±268 ^a	1084±288 ^{ac}	433±257 ^e
Chemical lesion with 6-OHDA Uszkodzenie chemiczne (6-OHDA)	5	1480±257 ^b	942±374 ^{bd}	538±200 ^f
Sham lesion Uszkodzenie rzekome	6	1607±185	1553±348 ^{cd}	54±322 ^{ef}

Results are means ±SD, n — number of animals

Wyniki podano jako średnie ± odchylenie standardowe, n — liczba zwierząt

Letters indicate the pairs of values subjected to statistical evaluation with the t-Students test. The p values were: a, b, c, d — < 0.001, e, f — < 0.02. The pairs of values not described with letters showed no significant differences

Litery oznaczają pary wartości poddanych ocenie statystycznej testem t-Studenta. Wartość p dla a, b, c, d — < 0,001, dla e, f — < 0,02. Wartości nie oznaczone literami są statystycznie nieznamienne

DISCUSSION

To sum up the present investigations it may be stated that the application of both ways of injuring the SN, electrocoagulative and chemical, under identical stereotaxic conditions gave positive results, they were, however, distinctly better after the use of 6-OHDA. The number of rats exhibiting the highest degree of efficacy of the lesion with best selectiveness in damaging the SN neurons without injury to the tissue matrix and surrounding structures after chemical SN lesion was higher. The fact was also important that the chemically produced lesion caused a loss of neurons of the pars compacta of the SN both rostral and caudal in relation to the point of injection of 6-OHDA. The lesion focus due to the electrocoagulation was usually extensive, at least in its central part and, beside injuring the SN, it frequently involved adjacent structures, causing their destruction, whereas the neurons of the pars compacta of the SN above and below the site of action of the current were intact. Thus, the method of electrocoagulation does not ensure total destruction of the SN.

Our results demonstrate that chemical SN lesion with 6-OHDA caused a more pronounced decrease of DA content in the right (lesioned) hemisphere. On the other hand it seems that the experimental procedure with introduction of 6-OHDA is less traumatizing for animals than electrocoagulation. This leads to the conclusion that the use of 6-OHDA is much more convenient than electrocoagulation for obtaining an experimental model of Parkinson's disease because the chemical lesion of pars compacta is more selective and efficacious.

WYNIKI DOMÓZGOWYCH TRANSPLANTACJI NIEDOJRZĄLEJ ISTOTY CZARNEJ U SZCZURÓW Z DOŚWIADCZALNIE WYWOŁANĄ CHOROBA PАРKINSONA

I. Badania porównawcze nad dwoma modelami choroby Parkinsona wywołanymi przez jednostronne stereotaktyczne uszkodzenie istoty czarnej przy użyciu elektrokoagulacji lub przez wstrzyknięcie 6-hydroksydopaminy

Streszczenie

Przeprowadzono morfologiczną ocenę topografii, struktury i dynamiki zmian występujących po uszkodzeniu części zbitej istoty czarnej (SN) u szczurów, wywołanej przez wstrzyknięcie 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) lub elektrokoagulację.

Materiał obejmował 26 szczurów szczepu Wistar, które podzielono na 3 grupy doświadczalne. W grupie I (12 szczurów) wykonano jednostronne zniszczenie części zbitej SN przy użyciu prądu elektrycznego. W grupie II (9 szczurów) do jednostronnego uszkodzenia części zbitej SN użyto 6-hydroksydopaminy, wybiórczo uszkadzającej neurony katecholaminergiczne. W grupie III kontrolnej (5 szczurów) wprowadzano do pars compacta SN igłę w takich samych warunkach bez użycia prądu lub podawania neurotoksyny. Zwierzęta dekapitowano 2, 4, 7, 14 i 21 dni po zabiegu. Mózgi krojono seryjnie i barwiono HE oraz metodą Klüver-Barrery. Skuteczność uszkodzenia oceniano według 4-stopniowej skali.

Pozytywne wyniki uzyskano w obu stosowanych metodach, jednak przy użyciu 6-OHDA odznaczały się one znacznie większą wybiórczością. Uszkodzenie spowodowane prądem elektrycznym było z reguły bardziej rozległe i na poziomie wkłucia igły przechodziło poza pars compacta SN na sąsiednie struktury pnia mózgu, nie obejmując neuronów położonych dogłowo i doogonowo. Natomiast uszkodzenie przy użyciu 6-OHDA powodowało wybiórcze zniszczenie wszystkich neuronów części zbitej SN zarówno na poziomie wkłucia jak również poniżej i powyżej tego poziomu.

Z przeprowadzonych badań wynika, że dla wytworzenia modelu doświadczalnego parkinsonizmu korzystniejsze jest uszkodzenie pars compacta SN przy pomocy 6-OHDA niż elektrokoagulacji.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВНУТРИМОЗГОВЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИИ НЕЗРЕЛОГО ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

I. Сравнительные исследования двух моделей болезни Паркинсона вызванных односторонним стереотактическим повреждением черного вещества с применением электрокоагуляции или при помощи инъекции 6-гидроксидофамина

Резюме

Проведено морфологическую оценку топографии, строения и динамики изменений выступающих после повреждения плотной части черного вещества (SN) у крыс, вызванного путем инъекции 6-гидроксидофамина (6-OHDA) или путем электрокоагуляции.

Материал охватывал 26 крыс рода Вистар, который был разделен на 3 экспериментальные группы. В I группе (12 крыс) произведено одностороннее уничтожение плотной части SN при помощи электрического тока. Во II группе (9 крыс) для одностороннего повреждения плотной части SN был применен 6-гидроксидофамин, селективно повреждающий катехоламинэргические нейроны. В III — контрольной группе (5 крыс) введено в плотную часть SN иглу в таких самых условиях без применения тока или введения нейротоксина. Животных обезглавлено через 2, 4, 7, 14 и 21 дней после процедуры. Мозги были срезываны серийно и крашены HE и методом Кловер-Барреры. Эффективность повреждения оценивалась по 4-степенной шкале.

Положительные результаты получились в обоих применяемых методах, но при помощи инъекции 6-ОНДА они отличались значительно большей селективностью. Повреждение вызванное электрическим током было как правило более протяженно и на уровне укола иглы распространялось за пределы плотной части SN на соседние структуры мозгового ствола, не охватывая нейронов расположенных в направлении головы и хвоста. Зато повреждение с применением 6-ОНДА вызывало селективное повреждение всех нейронов плотной части как на уровне укола, так также ниже и выше этого уровня.

Из проведенных исследований вытекает, что для образования экспериментальной модели паркинсонизма более выгодно повреждение плотной части SN при помощи 6-ОНДА, чем электрокоагуляции.

REFERENCES

1. Björklund A., Dunnett S. B., Stenevi U., Lewis M. E., Iversen S. D.: Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.*, 1980, 199, 307—333.
2. Chang C. C.: A sensitive method for spectrofluorimetric assay of catecholamines. *Int. J. Neuropharmacol.*, 1964, 3, 643—649.
3. Dvoisin R. G., Yahr M. D.: Behavioral abnormalities occurring in Parkinsonism during treatment with L-Dopa. In: *L-DOPA and Behavior*, Ed. S. Malitz, Raven Press, New York, 1972, 57—72.
4. Freed W. J., Perlow M. J., Karoum F., Seiger A., Olson L., Hoffer B. J., Wyatt R.: Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus. *Ann. Neurol.*, 1980, 8, 510—519.
5. Haubrich D. R., Denzer J. S.: Simultaneous extraction and fluorimetric measurement of brain serotonin, catecholamines, 5-hydroxyindole acetic acid and homovanilic acid. *Ann. Biochem.*, 1973, 55, 306—318.
6. Hornykiewicz O.: Topography and behaviour of noradrenaline and dopamine in the substantia nigra of normal and Parkinsonian patients. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1963, 75, 309—312.
7. Hökfeld T., Ungerstedt U.: Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. *Brain Res.*, 1973, 60, 269—297.
8. Izumi K., Inoue N., Kuroiwa Y.: Non-effective group with L-DOPA on Parkinsonism. *Folia Psychiatr. Neurol. Jap.*, 1971, 25, 37—40.
9. Kostrzewa R. M., Jacobowitz D. M.: Pharmacological action of 6-hydroxydopamine. *Pharmacol. Rev.*, 1974, 26, 199—288.
10. König J. F. R., Klippel R. A.: *The rat brain. A stereotaxic atlas of forebrain and lower parts of the brain stem.* Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1963.
11. Larsen T. A., Calne D. B.: Recent advances in the study of Parkinson disease. *Trend Neurosci.*, 1982, 5, 10—12.
12. Lloyd K. G., Davidson L., Hornykiewicz O.: The neurochemistry of Parkinson's disease: effect of L-DOPA therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, 195, 435—464.

13. Ungerstedt U.: 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Europ. J. Pharmacol.*, 1968, 5, 107–110.
14. Ungerstedt U., Avemo A., Avemo E., Ljunbert T., Ranje C.: Animal models of Parkinsonism. *Advances in Neurology*. Raven Press, New York, 1973, 3, 257–271.

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

JERZY DYMECKI, MACIEJ PÓŁTORAK, OLGIERD PUCIŁOWSKI,
DANUTA MARKIEWICZ, WOJCIECH KOSTOWSKI

EFFECTS OF INTRACEREBRAL TRANSPLANTATION
OF IMMATURE SUBSTANTIA NIGRA IN RATS WITH
EXPERIMENTALLY INDUCED PARKINSON'S DISEASE

II. RESULTS OF HISTOPATHOLOGICAL AND HISTOFLUORESCENT STUDIES

Department of Neuropathology, and Department of Pharmacology and Physiology, Psychoneurological Institute, Warsaw

In recent years there have been many reports on trials of substitutive treatment of experimental Parkinson's disease in animals by intracerebral implantation of fetal tissue containing substantia nigra (SN) cells (Björklund et al. 1980 a, b; Freed et al. 1980). As known today the central nervous system is immunologically privileged. Owing to this, transplants not only of nervous tissue, but various others, may be accepted by the host brain (Scheinberg et al. 1964). Lately successful transplantation of heterogeneous tissue (from mouse) into the rat striatum has also been described (Björklund et al. 1982).

The survival of the transplant may be tested by several methods. The basic one is histopathological examination. However, the lack of characteristic features for dopaminergic neurons of rat SN in routine examination, which, contrary to the human brain, do not contain melanin grains makes their identification difficult. These examinations may, however, bring abundant data concerning the behaviour of the host tissue in response to the transplant.

Histofluorescence techniques based chemically on condensation of biogenic amines with paraformaldehyde (Björklund et al. 1972; Bloom, Battenberg 1976) allow to establish the presence of dopamine-synthesising neurons in the transplant, and thus demonstrate its survival in the host brain. When this technique is applied, neurons containing dopamine (DA) exhibit characteristic fluorescence, allowing their identification and distinction from other CNS cells.

The purpose of the present study was to evaluate whether neonatal SN cells transplanted into the vicinity of the striatum are capable of surviving in the adult

rat brain with unilateral destruction of the neurons of the nigro-striatal system. The effects of transplantation were tested by the histological and histofluorescence methods.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed with 40 albino Wistar, male rats, weighing 180–200 g, in which the compact part of the SN was damaged on the right side by stereotaxic administration of 8 μ g 6-hydroxydopamine (6-OHDA) after Ungerstedt et al. (1973). For details of the method see Dymecki et al. (1985). Two weeks after SN lesion, dopaminergic neurons were intracerebrally transplanted. The tissue was taken from brains of newborn Wistar rats of the same litter. The donor animal was decapitated, the brain was removed and placed with dorsal surface upward on a glass slide. The ventro-lateral part of the mesencephalon was extracted with a sterilised scalpel and placed in a Petri dish, containing Ringer's solution. The host rat was anaesthetised with chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) and placed in a Stoelting stereotaxic apparatus. The skin on the head was transected in sagittal line and the periosteum was retracted to the sides. Then on the right side a hole was drilled in the skull with coordinates: 0.5 mm anterior to the bregma and 1.5 mm laterally to the right of the middle sagittal suture.

Material from the midbrain of the newborn rat, containing dopaminergic neurons, was aspirated into a modified puncture needle. Its volume was 1–3 mm³. The needle was introduced at a 180° angle vertically into the brain through the hole in the skull to a depth of 4 mm below the outer skull bone surface, into the area between corpus callosum and striatum. The tissue of the transplant was pushed into the host brain with a mandrin. The needle was removed after one minute. Powdered crystalline penicillin was spread in the region of skin section, then clips were placed on the edges of the wound.

The material was divided into three groups. In the group I, consisting of 25 rats, fragments of newborn SN were transplanted. Group II consisted of 8 rats in which, two weeks after lesion of the SN, fragments of the sciatic nerve, neutral tissue not producing DA, taken from young rats, were transplanted (sham transplantation). The transplantation technique was identical as in SN transplantation. This group served as a control group. For verifying the efficacy of the lesion and the survival of the transplant, histopathological investigations were performed. Serial paraffin sections were stained by the Klüver-Barrera and HE methods. In group III, consisting of 7 rats, for verifying DA synthesis by the graft histofluorescence studies were performed. In 3 rats of this group only the SN was damaged with 6-OHDA without transplantation. This subgroup served for histofluorescence evaluation of the influence of 6-OHDA on the SN neurons.

The animals were perfused with fluid, constituting a combination of two solutions: 150 ml of 0.3 M phosphate buffer, (pH 7.4) and 1.5 g paraformaldehyde (Merck). The latter was dissolved in an electric mixer with simultaneous warming to 70–80°C. After complete paraformaldehyde depolymerization the solution

was cooled to room temperature. The second solution was prepared by adding 150 ml of Ringer's solution (Polfa) and 6.0 glyoxylic acid (Sigma). Both solutions were mixed and adjusted to pH 7.4 with 10 N NaOH. The perfusion fluid thus prepared was cooled to 0–4°C and then placed in a container with water and ice.

The animals were anaesthetised by intraperitoneal injection of chloral hydrate (400 mg/kg). The rat was stretched on a cooled section plate in supine position. The animal's head was cooled by placing it in crumbled ice. Then, the thoracic wall was bilaterally cut and the heart was exposed. The needle with the perfusion fluid was introduced into the left ventricle. The auricle was punctured with a needle of the same diameter. The mean pressure of the perfusing fluid was 250–330 mm Hg, this making possible ending of the procedure within 60–90 s. During perfusion the descending aorta was closed with surgical pincers.

After perfusion the rat was decapitated and the brain was rapidly removed. It was cut with a cooled razor blade into blocks about 4–5 mm thick which were immediately frozen in carbon dioxide. The frozen tissue was placed in a Pearse cryostat chamber and then cut into 10 μ m sections which were transferred to cold microscopic slides. The preparations were immediately immersed in the incubation solution at 0–4°C for 3–5 min. The solution was obtained by mixing 50 ml Ringer's solution with 2 g glyoxylic acid dissolved in 50 ml of phosphate buffer (0.3 M, pH 7.7). The incubation solution was adjusted to pH 7.4 with 10 N NaOH and then cooled to 0–4°C.

The perfusion and incubation fluids were prepared freshly on the day of the investigation.

The sections were air-dried (37°C) until the surface became semitransparent (3 to 8 min). Then the sections with the material were placed at 95–100°C for 10 min. Paraffin oil was put dropwise on the sections and they were covered with coverslips.

The preparations were inspected in a Zeiss fluorescence microscope (Fluoval) with an excitation filter UG1 and a barrier OG7 filter.

RESULTS

Morphological examination of the brains with transplants was performed four weeks after transplantation.

In group I the implanted tissue was as a rule localized at the boundary between the striatum and the corpus callosum or within the latter (Fig. 1). Sometimes the tissue transplant was visible in the lumen of the lateral ventricle. In such cases it was usually attached along a larger or smaller segment to the ventricular wall, thus, it tightly adhered to the striatum. Within the transplant neurons could be identified mixed with reactive glia cells (Fig. 2). Around the transplants proliferation of mesenchymal tissue and some few macrophages were noted. On some sections the pathway of the needle was visible with a mesodermal and glial reaction and the presence of some macrophages overloaded with hemosiderin was noted. In ten cases the implanted tissue could not be found, only a hole with fimbriate edges, probably a trace of the transplant which underwent resorption.

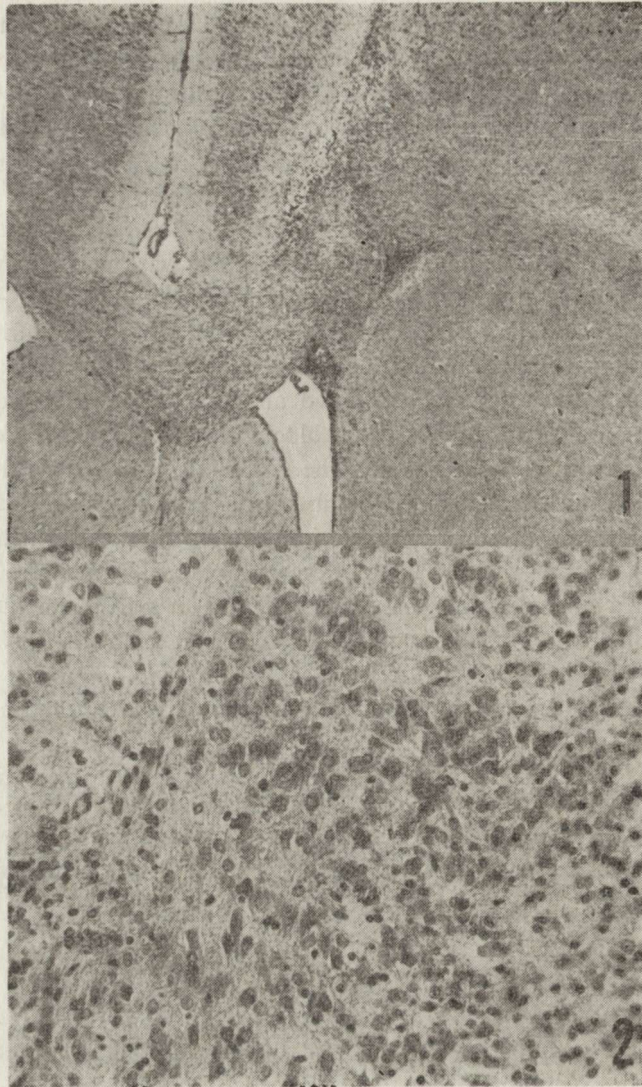


Fig. 1. Four-week-old transplant of immature SN fragment, localized at the boundary of the striatum. H-E. $\times 60$

Ryc. 1. 4-tygodniowy przeszczep fragmentu niedojrzałej istoty czarnej, zlokalizowany na pograniczu prążkowie. H-E. Pow. $60 \times$

Fig. 2. Neurons of transplant surrounded by reactive glial cells. H-E. $\times 200$

Ryc. 2. Neurony przeszczepu otoczone przez komórki gleju reaktywnego. H-E. Pow. $200 \times$

The control material (group II) examined four weeks after transplantation showed that localization of the implanted fragments of the sciatic nerve was similar as in the experimental group. The transplants mostly lay at the boundary of the corpus callosum and the striatum, sometimes in the lumen of the lateral ventricle. The Klüver-Barrera method visualised the desintegrating myelin sheaths with a profuse glio-mesodermal reaction and numerous macrophages around the lesion.

In the group III of animals the histofluorescence method revealed 14 to 21 days after transplantation the presence of dopaminergic cells, with fluorescence intensity and colour identical with those in the intact SN. Transplants containing dopaminergic neurons lay in the region of the right caudate nucleus at its boundary with corpus callosum and sometimes within it. Around these cells there appeared a fine network of nerve fibres (Fig. 3). In one case the dopaminergic neurons could also be seen along the needle pathway (Fig. 4). In two cases the fluorescence, characteristic for dopaminergic neurons was not observed at the site of transplantation. It may be assumed that in these cases the transplant had been resorbed.

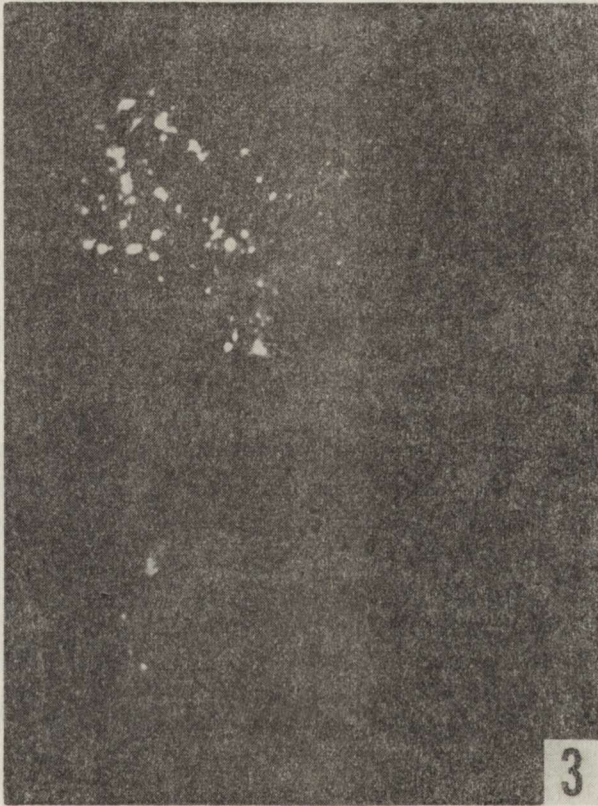


Fig. 3. DA-containing cells in intracerebral transplant, located between the striatum and the corpus callosum. Histofluorescence method. $\times 100$

Ryc. 3. Komórki zawierające dopaminę w obrębie domózgowego transplantatu zlokalizowanego między prążkowiem i ciałem modzelowatym. Metoda histofluorescencyjna. Pow. $100 \times$

The rat midbrains with right side SN lesion and without transplant were studied by the histofluorescence method at various times from 7 to 21 days after producing the lesion. Independently of the time of survival, in the inspected midbrains complete disappearance of dopaminergic cells was noted in the SN compact zone on the damaged side in all cases. In intact SN these cells were visible in the form of a strand, corresponding to the compact part of the SN (Fig. 5).



Fig. 4. Dopaminergic neurons visible within the transplant and the pathway of the needle. Histofluorescence method. $\times 100$

Ryc. 4. Neurony dopaminergiczne widoczne w obrębie przeszczepu oraz wzdłuż kanału igły. Metoda histofluorescencyjna. Pow. $100 \times$



Fig. 5. Dopaminergic neurons of compact part of normal substantia nigra. Histofluorescence method. $\times 200$

Ryc. 5. Neurony dopaminergiczne części zwartej prawidłowej istoty czarnej. Metody histofluorescencyjna. Pow. $200 \times$

DISCUSSION

As the result of the experiments performed, fluorescence characteristic for dopaminergic neurons was revealed within the SN grafts, indicating the capability of survival, and DA synthesis of the transplanted mesencephalon fragments. Most investigations on the transplantation of the substantia nigra were carried out with the use of embryonal tissue (Björklund et al. 1980 a, b; Freed et al. 1980). Some authors believe that survival of the transplant depends on the maturity of the donors nerve cells. They suggest that embryonal tissue has a greater capability of survival in the host brain than mature nervous tissue (Björklund et al. 1980 a, b; Das et al. 1980; Hallas et al. 1980). Other investigators did not notice differences in the acceptance of intracerebral transplants of embryonal and newborn rat tissue (Sunde, Zimmer 1981), however, they used hippocampal tissue for transplantations.

On account of the technical difficulties in precise collection of the compact part of the SN region because of the small dimensions of the mesencephalon and the jelly-like consistence of the embryonal brain, it was attempted to transplant material taken from newborn rats and to evaluate the possibilities of survival of the dopaminergic cells from the newborn.

Unsuccessful transplantation noted by us in several cases may have been due to several factors, among them the age of the donor. Moreover, histopathological examinations demonstrate that transplanted cells of newborn rats arouse a rather strong macrophage-lymphocytic and glial reaction in the host tissue. It is possible that this is connected with the maturation of the surface antigens of dopaminergic neurons. The macrophage-lymphocytic reaction of the host may cause resorption of the transplanted cells and may be partially responsible for rejection of the transplants. The tissue reaction of the host may also be connected with heavy traumatization of the brain in the course of the transplantation procedure. On the other hand, contact of the transplanted neurones with the richly vascularised surface or the cerebrospinal fluid exerts a favourable influence on the survival of the transplanted fragments (Sunde, Zimmer 1981).

In order to improve the survival of the graft Björklund et al. (1980 a, 1981) applied a method consisting in aspiration of the nervous tissue from the site, where the transplantation is planned, and formation of a cavity which was further filled with spongostan. After several weeks, when the cavity became lined with richly vascularised reaction tissue, the authors removed the spongostan and introduced the transplant instead. This gave better results than immediate stereotaxic implantation of embryonal tissue, as is also confirmed by the studies of Freed et al. (1980).

The group of Björklund et al. (1980 b, 1983) undertook recently interesting trials of transplantation of a suspension of SN cells obtained by trypsinisation of the fetal midbrain, instead of the solid tissue fragment. They obtained good results in the survival of dopaminergic cells which were visualised by the histofluorescence method. Behavioural tests also confirmed the favourable results of this method. It would seem that this technique, on account of the low degree of traumatization of the host brain, is noteworthy in planning further steps of the research on intrace-

rebral transplantations. Our histological and histofluorescence results confirm the ability of survival, development, maturation and DA production of SN neurons from the newborn, transplanted into adult rat brain.

WYNIKI DOMÓZGOWYCH TRANSPLANTACJI NIEDOJRZĄLEJ ISTOTY CZARNEJ U SZCZURÓW Z DOŚWIADCZALNIE WYWOŁANĄ CHOROBA PАРKINSONA

II. Wyniki badań histopatologicznych i histofluorescencyjnych

Streszczenie

Przeprowadzono badania histopatologiczne i histofluorescencyjne mózgów szczurów z chorobą Parkinsona wywołaną przez jednostronne wstrzyknięcie do części zbitęj istoty czarnej (SN) 6-hydroksydopaminy (6-OHDA), u których w 2 tygodnie później wykonano domózgowe przeszczepy niedojrzałej istoty czarnej. Doświadczenie przeprowadzono na 40 szczurach. Materiał do transplantacji pobierano z brzuszno-bocznej części śródmózgowia noworodków szczurzych tego samego szczepu. Przeszczep umieszczano po stronie uszkodzenia SN w okolicy jądra ogoniastego na pograniczu z ciałem modzelowatym. Grupę kontrolną stanowiły szczury z przeszczepionym fragmentem nerwu kulszowego. Dla histofluorescencyjnej oceny wpływu 6-OHDA na neurony SN u dodatkowej grupy zwierząt wykonano uszkodzenie SN bez transplantacji.

Badania morfologiczne wykazały, że przeszczepione neurony przeżyły i można je było zidentyfikować w mózgu gospodarza. Wokół przeszczepów obserwowano proliferację odczynowego gleju i tkanki łącznej. Badanie śródmózgowia po uszkodzeniu SN przy użyciu 6-OHDA, wykazało zanik komórek dopaminergicznych w obrębie SN po stronie uszkodzenia. W przeszczepach niedojrzałych neuronów SN metoda histofluorescencyjna wykazała obecność komórek świecących identycznie jak komórki dopaminergiczne SN.

Dane te wskazują na zdolność do przeżycia, rozwoju i dojrzwania przeszczepionego fragmentu śródmózgowia noworodków szczurzych oraz na jego zdolność do syntetyzowania dopaminy.

РЕЗУЛЬТАТЫ ВНУТРИМОЗГОВЫХ ТРАНСПЛАНТАЦИЙ НЕЗРЕЛОГО ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

II. Результаты гистопатологических и гистофлюоресценционных исследований

Резюме

Проведены гистопатологические и гистофлюоресценционные исследования мозгов крыс с болезнью Паркинсона вызванной при помощи инъекции в плотную часть черного вещества (SN) 6-гидроксидафмина (6-OHDA), у которых две недели позже произведено внутримозговые трансплантаты, незрелого черного вещества. Эксперименты были проведены с 40 крысами. Материал для трансплантации авторы брали из брюшно-боковой части среднего мозга крысиных новорожденных того же самого рода. Трансплантат локализовано по стороне повреждения SN в области хвостатого ядра на границе с мозолистым телом. Контрольную группу составляли крысы с трансплантированным фрагментом седалищного нерва. Для гистофлюоресценционной оценки влияния 6-OHDA на нейроны SN у дополнительной группы животных произведено повреждение SN без трансплантации.

Морфологические исследования показали, что трансплантированные нейроны пережили и они могли быть идентифицированы в мозгу хозяина. Вокруг трансплантатов авторы наблюдали пролиферацию реактивной глии и соединительной ткани. Исследование среднего мозга после повреждения SN с применением 6-OHDA проявило атрофию дофаминергичес-

ких клеток в области SN со стороны повреждения. В трансплантатах незрелых нейронов SN гистофлюоресценционный метод проявил наличие клеток светящихся идентично как дофамин-эргические клетки SN.

Эти данные указывают на способность к переживанию, развитию и созреванию трансплантированного фрагмента среднего мозга крысиных новорожденных и на его способность к синтезизации дофамина.

REFERENCES

1. Björklund A., Falck B., Owman C. H.: Fluorescence microscopic and microspectrofluorimetric techniques for the cellular localization and characterization of biogenic amines. In: *Methods of investigative and diagnostic endocrinology*. Ed. S. A. Berson, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1972, v. 1, 318–368.
2. Björklund A., Dunnett S. B., Stenevi U., Lewis M. E., Iversen S. D.: Reinnervation of the denervated striatum by substantia nigra transplants: functional consequences as revealed by pharmacological and sensorimotor testing. *Brain Res.*, 1980 a, 199, 307–333.
3. Björklund A., Schmidt R. G., Stenevi U.: Functional reinnervation of the neostriatum in the adult rat by use of intraparenchymal grafting of dissociated cell suspensions from substantia nigra. *Cell Tiss. Res.*, 1980 b, 212, 39–45.
4. Björklund A., Stenevi U., Dunnett S. B., Gage F. H.: Cross-species neural grafting in rat model of Parkinson's disease. *Nature*, 1982, 298, 652–654.
5. Björklund A., Stenevi U., Dunnett S. B., Iversen S. D., Schmidt R. H., Gage F. H.: Intracerebral grafting of neuronal cell suspensions. *Acta Physiol. Scand.*, 1983, Suppl. 522, 1–75.
6. Bloom F. F., Battenberg E. L. F.: A rapid, simple and more sensitive method for the demonstration of central catecholamine-containing neurons and axons by glyoxylic acid induced fluorescence. II. A detailed description of methodology. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, 24, 561–571.
8. Dymecki J., Markiewicz D., Póltorak M., Puciłowski O., Kostowski W., Bidziński A.: Effects of intracerebral transplantations of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. I. Comparative evaluation of two models of Parkinson's disease, obtained by unilateral stereotaxic lesion of substantia nigra by electrocoagulation and 6-hydroxydopamine. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 167–179.
9. Freed W. J., Perlow M. J., Karoum F., Seiger A., Olson L., Hoffer B. J., Wyatt R. J.: Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long term behavioral, biochemical and histochemical studies. *Ann. Neurol.*, 1980, 8, 510–519.
10. Hallas B. H., Das G. D., Das K. G.: Transplantation of brain tissue in the brain of rat. II. Growth characteristics of neocortical transplants in hosts of different ages. *Am. J. Anat.*, 1980, 158, 147–159.
11. Scheinberg L. C., Edelman F. L., Lewy W. A.: Is the brain an "immunologically privileged site?". Studies based on intracerebral tumors homotransplantation and isotransplantation to sensitized hosts. *Arch. Neurol.*, 1964, 11, 248–264.
12. Sunde N., Zimmer J.: Transplantation of central nervous tissue and introduction with results and implications. *Acta Neurol. Scand.*, 1981, 63, 323–335.
13. Ungerstedt U., Avemo A., Avemo E., Ljunberg T., Ranje C.: Animal models of Parkinsonism. *Adv. Neurol.*, 1973, 3, 257–271.

Authors' address: Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, Sobieskiego str. 1/9, 02-957 Warsaw, Poland

Wydawnictwo MECNIEREBA Akademii Nauk Gruzjińskiej Socjalistycznej Republiki Radzieckiej wydało w 1984 r. książkę „Obrzęk mózgu” pod redakcją G. I. Mczesliszwili (objętość 15 arkuszy, drukowana w języku rosyjskim, cena 2 ruble 50 kopiejek).

Książka przedstawia wyniki wielokierunkowych badań nad mechanizmami rozwoju obrzęku mózgu, przeprowadzonych przez wybitnych specjalistów. Mogą one stanowić przedmiot zainteresowania zarówno dla podstawowych nauk biomedycznych, jak i dla medycyny praktycznej. Problem obrzęku mózgu rozpatrywano w oparciu o wstępną analizę tego zagadnienia przeprowadzoną na V Międzynarodowym Sympozjum na temat krążenia mózgowego, które odbyło się w Tbilisi w kwietniu 1983 r. z udziałem wybitnych specjalistów z Węgier, Danii, Berlina Zach., Kanady, Norwegii, Polski, ZSRR, USA, RFN i Japonii.

W książce przedstawiono osiągnięcia nauki światowej w zakresie poznania patofizjologicznych mechanizmów rozwoju i zwalczania obrzęku mózgu, bez znajomości których jest niemożliwa prawidłowa ocena i skuteczne leczenie tego procesu.

Książka jest przeznaczona dla szerokiego kręgu specjalistów biomedycznych nauk podstawowych oraz klinicystów zainteresowanych patologią ośrodkowego układu nerwowego i krążenia mózgowego.

BARBARA KOSICKA, TERESA E. BUGERA, MAREK KITTEL, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

POZIOM KWASU GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA) ORAZ
AKTYWNOŚĆ DEKARBOKSYLAZY GLUTAMINIANOWEJ (GAD)
W MÓZGU SZCZURA Z ZESPOŁEM POZAPIRAMIDOWYM PO OSTRYM
ZATRUCIU CHLORKIEM MANGANAWYM

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa;
Zakład Farmakologii Doświadczalnej, Instytut Nauk Fizjologicznych AM, Warszawa

W patogenezie choroby Parkinsona i zespołów parkinsonowskich zasadniczą rolę przypisywano obniżeniu poziomu dopaminy w mózgu (Ehringer, Hornykiewicz 1960; Bernheimer, Hornykiewicz 1964), w następstwie jej zmniejszonej syntezy na poziomie katalizowanym przez hydroksylazę tyrozyny (Hornykiewicz 1972). W dalszych badaniach nad regulacyjnym wpływem innych neuroprzekaźników na szlaki dopaminergiczne w zespołach pozapiramidowych zwrócono między innymi uwagę na znaczenie kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), występującego w dużym stężeniu zarówno w prądkowiu, jak i w istocie czarnej (Kim, Hassler 1975, Pycocck 1978).

W tak zwanym parkinsonizmie manganowym z zespołem klinicznym zbliżonym do choroby Parkinsona, poza charakterystyczną triadą objawów: akinezyją, wzmożonym napięciem mięśniowym i drżeniem (Banta, Markesbery 1977; Sarič i wsp. 1977), obserwowano dystonię, co sugerowało uszkodzenie układu GABA-ergicznego (Barbeau i wsp. 1976). Podobnie jak w chorobie Parkinsona analiza pośmiertna w tych przypadkach wykazała obniżenie poziomu dopaminy (Mustafa, Chandra 1971; Hornykiewicz 1972). Stwierdzono ponadto, że u pracowników narażonych na zatrucie manganem objawy pozapiramidowe szybciej występują w warunkach niedotlenienia (Rodier 1955).

W badaniach doświadczalnych obserwowano objawy pozapiramidowe u szczurów po domózgowym podaniu manganu. Po jednostronnym wstrzyknięciu jonów Mn^{++} do komory bocznej mózgu objawy były podobne jak po zatruciu 6-hydroksydopaminą (Garattini, Samanin 1977), a obustronne ich podanie do prądkowia wywołało u zwierząt takie objawy, jak po zatruciu rezerpiną (Inoue i wsp. 1975). Pozamózgowe podanie manganu małym gryzoniom nie wywoływało klinicznych objawów pozapiramidowych (Jonderko 1970; Śmiałek, Mossakowski 1981). W doświadczeniach na małpach poddanych inhalacjom związków manganu tylko u części zwierząt uzyskano objawy zatrucia z zespołem pozapiramidowym (van Bogaert 1953).

Zarówno w objawowych, jak i bezobjawowych modelach zatrucia manganem stwierdzono obecność biochemicznego zespołu parkinsonowskiego ze spadkiem zawartości dopaminy w całym mózgu (Mustafa, Chandra 1971) lub w niektórych jego strukturach, w tym głównie w prążkowie (Neff i wsp. 1969; Autissier i wsp. 1982). Obserwowano także obniżenie lub przyrost poziomu GABA w mózgu (Bonnilla 1978; Chandra i wsp. 1982; Kosicka i wsp. 1983).

Wobec braku sprecyzowanych poglądów dotyczących wpływu GABA na powstawanie zespołów pozapiramidowych w zatruciu manganem podjęto próbę stworzenia objawowego modelu uszkodzenia układu pozapiramidowego dołączając dodatkowy czynnik w postaci częściowego niedokrwienia mózgu. Szczegółowym celem badań była ocena zawartości GABA oraz jego syntezy na poziomie katalizowanym przez dekarboksylazę glutaminianową w wybranych strukturach OUN.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 120 szczurach rasy Wistar, samcach o masie ciała 150 g, które usypiano gammabutyrolaktonem wstrzykiwanym dootrzewnowo w dawce 500 mg/kg masy ciała. Zwierzętom izolowano i podwiązywano obie tętnice szyjne wspólne, następnie do lewej tętnicy wstrzykiwano ponad podwiązką chlorek manganawy ($MnCl_2$) w fizjologicznym roztworze NaCl, w ilości 0,1, 0,5 i 1 mg Mn^{++} w objętości 50 μl . Natychmiast po podaniu $MnCl_2$ tętnicę podwiązywano w dogłowym odcinku od miejsca wstrzyknięcia. Ponadto wykonano ten sam zabieg operacyjny z jednostronnym niedokrwieniem mózgu, bez podwiązywania prawej tętnicy szyjnej wspólnej. Część zwierząt obserwowano przez okres 3 tygodni od zatrucia. Szczury przeznaczone do badań biochemicznych uśmiercano po 24, 48 i 72 godzinach od podania $MnCl_2$.

Zwierzęta kontrolne podzielono na 4 grupy: w grupie I wykonano sam zabieg operacyjny bez podwiązywania tętnic szyjnych wspólnych i bez wstrzykiwania roztworów soli; w grupie II — szczurom podwiązano obie tętnice szyjne wspólne; w grupie III wykonano podobny zabieg podwiązania tętnic i wstrzykiwano roztwór soli fizjologicznej w objętości 50 μl ; grupę IV (norma) stanowiły zwierzęta nie poddane żadnym zabiegom. Szczury doświadczalne i kontrolne dekapitowano. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszkowej oziębiano na suchym lodzie i izolowano prążkowie, istotę czarną, zakręt hipokampa, korę centralną oraz robak mózdzku. Próbkę natychmiast zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem i ważono.

Oznaczanie poziomu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA)

Pobrany materiał homogenizowano w 5 objętościach 0,01 N HCl, pobierano 200 μl homogenatu i dodawano 200 μl 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Homogenat wirowano przez 20 minut w temperaturze 4°C przy 900 g. Otrzymany nadsącz po dodaniu 20 μl 50 mM kwasu glutaminowego i 200 μl 14 mM ninhydryny inkubowano w łaźni wodnej przez 30 minut w temperaturze 60°C. Następnie dodawano 5 ml odczynnika miedziowego (winian miedziowy z węglanem sodu).

Fluorescencję odczytywano na spektrofлуorymtrze Aminco-Bowman przy długościach fal 380–450 nm według metody Love i wsp. (1958) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974).

Oznaczanie aktywności dekarboksylazy glutaminianowej (GAD)

Tkanekę homogenizowano w 5 objętościach buforu substratowego, przygotowanego *ex tempore*, o składzie: 0,2 M buforu fosforanowego, 100 mM kwasu glutaminowego, 50 mM fosforanu pirydoksalu. Homogenat o objętości 200 μ l inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 60 minut. Po inkubacji do homogenatu dodawano 0,2 ml 10% TCA. Do próbki standardu wewnętrznego dodawano zamiast TCA 0,2 ml roztworu GABA w 10% TCA (1 mg GABA w 20 ml 10% TCA) i wirowano w ciągu 20 minut przy 900 g. Dalszy etap oznaczania aktywności GAD był identyczny jak oznaczanie GABA, z tym, że do prób nie dodawano kwasu glutaminowego (Love i wsp. 1958; Sutton, Simmonds 1974).

Obliczenia statystyczne wyników wykonano według testu t-Studenta.

WYNIKI

Nie uzyskano zespołu pozapiramidowego u zwierząt z jednostronnym niedokrwieniem mózgu, jak również u szczurów z obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych, którym wstrzykiwano $MnCl_2$ w dawkach 0,1 i 0,5 mg Mn^{++} . Po podaniu $MnCl_2$ w ilości 1 mg Mn^{++} 9 zwierząt padło bezpośrednio po iniekcji wśród objawów niewydolności układu krążenia i oddechowego. U większości pozostałych przy życiu zwierząt po 24 godz. od podania $MnCl_2$ obserwowano zaburzenia pozapiramidowe w postaci spowolnienia ruchowego, okresowego drżenia żuchwy i głowy oraz wzmożonego napięcia mięśni kończyn i grzbietu. Nasilenie tych objawów po 3–4 dniach zmniejszało się. Stopniowo zwiększała się aktywność ruchowa, rzadziej występowały drżenia głowy i żuchwy. Po 6–7 dniach szczury po zatruciu nie różniły się od zwierząt z grup kontrolnych.

Wyniki stężenia GABA w badanych strukturach OUN u zwierząt doświadczalnych i w kontroli podano w tabeli 1.

Prążkowie. U zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom poziom GABA wynosił $1,82 \pm 0,15 \mu\text{mola/g}$ tkanki. W pozostałych grupach kontrolnych 1,90, 1,87 i 1,81 $\mu\text{mola/g}$ tkanki. W stosunku do normy różnice te były nieznamiennie statystycznie ($p > 0,05$). Po 24 godz. od podania $MnCl_2$ obserwowano statystycznie istotny przyrost stężenia GABA (o 23%). Po 48 godz. poziom GABA był wyższy o 187% od normy ($p < 0,05$), a po 72 godz. o 89% ($p < 0,01$).

Istota czarna. Stężenie GABA w normie wynosiło $1,67 \pm 0,10 \mu\text{mola/g}$ tkanki. Wyniki w grupach kontrolnych nie różniły się istotnie od normy ($p > 0,05$). W grupie doświadczalnej po 24 godz. od zatrucia obserwowano znamienne statystycznie przyrost poziomu GABA o 273%, po 48 godz. o 109%. Po 72 godz. poziom tego neuroprzekaźnika powracał do normy ($1,77 \pm 0,18 \mu\text{mola/g}$ tkanki).

Zakręt hipokampa. Poziom GABA w normie wynosił $0,74 \pm 0,07 \mu\text{mola/g}$ tkanki. Różnice między normą i pozostałymi grupami kontrolnymi były nieznamiennie

Tabela 1. Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w wybranych strukturach mózgowia szczura w ostrym zatruciu MnCl₂ (μmole GABA/g świeżej tkanki)

Table 1. GABA level in the selected structures of the rat brain in acute MnCl₂ poisoning (μmol GABA/g of the wet tissue)

Struktury mózgu Brain structures	Norma Norm	Grupa zwierząt Animals group					
		Kontrola Control			MnCl ₂ współistniejące z niedokrwieniem MnCl ₂ concomitant with ischemia		
		zabieg rzekomy sham operation	niedokrwienie ischemia	niedokrwienie + 0,9% NaCl ischemia + 0.9% NaCl	24 godz h	48 godz h	72 godz h
Striatum	1,82±0,15 (8)	1,81±0,16 (9)	1,87±0,19 (8)	1,90±0,17 (8)	6,12±0,64 (7) *	5,24±0,17 (7) *	3,44±0,21 (9) *
Substantia nigra	1,67±0,10 (9)	1,65±0,22 (7)	1,72±0,15 (8)	1,71±0,19 (10)	6,33±0,16 (8) *	3,05±0,12 (9) *	1,77±0,18 (8) *
Hippocampus	0,74±0,07 (9)	0,76±0,10 (7)	0,80±0,21 (9)	0,79±0,09 (8)	5,70±0,15 (9) *	3,75±0,26 (10) *	1,37±0,25 (9) *
Cortex centralis	0,92±0,08 (8)	0,93±0,17 (8)	0,34±0,14 (9)	0,97±0,18 (7)	4,64±0,19 (8) *	2,35±0,32 (8) *	1,58±0,19 (9) *
Vermis cerebelli	0,39±0,08 (7)	0,43±0,19 (7)	0,37±0,13 (7)	0,42±0,21 (8)	3,22±0,15 (9) *	1,86±0,16 (10) *	1,39±0,16 (8) *

Wyniki przedstawiono jako średnią arytmetyczną ± średni błąd średniej

The results are given as mean ± standard error of the mean

W nawiasach liczba zwierząt

In brackets number of animals

* – znamienność – p < 0,05

* – significance – p < 0.05

Tabela 2. Aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w wybranych strukturach mózgowia szczura w ostrym zatruciu MnCl₂ (μmole GABA/g świeżej tkanki)

Table 2. GAD activity in the selected structures of the rat brain in acute MnCl₂ poisoning (μmol GABA/g wet tissue)

Struktury mózgu Brain structures	Norma Norm	Grupa zwierząt Animals group					
		Kontrola Control			MnCl ₂ współistniejące z niedokrwieniem MnCl ₂ concomitant with ischemia		
		zabieg rzekomy sham operation	niedokrwienie ischemia	niedokrwienie + 0,9 NaCl ischemia + 0,9 NaCl	24 godz h	48 godz h	72 godz h
Striatum	21,78±0,34 (9)	21,76±0,65 (7)	21,84±0,56 (8)	22,71±0,42 (8)	20,95±0,62 (8)	19,92±0,60 (7)	18,91±0,81 (9)
Substantia nigra	25,51±1,15 (8)	25,64±0,72 (8)	24,91±0,87 (7)	24,37±1,03 (9)	18,50±0,53 (9) *	20,72±0,41 (10) *	20,06±0,89 (10) *
Hippocampus	20,52±0,66 (8)	20,01±0,41 (7)	19,86±0,79 (8)	20,98±0,71 (7)	19,03±0,73 (8)	17,92±0,45 (8)	17,83±0,71 (9)
Cortex centralis	18,48±1,17 (9)	18,31±0,72 (8)	17,93±0,98 (7)	18,11±0,65 (9)	15,92±0,39 (10) *	15,77±0,56 (8)	14,44±0,87 (7)
Vermis cerebelli	15,78±1,12 (8)	14,92±1,10 (7)	14,32±0,91 (8)	15,01±0,95 (8)	12,12±0,45 (9) *	12,26±0,66 (9) *	12,51±0,49 (9) *

Objaśnienia jak w tabeli 1

Description as in table 1

statystycznie ($p > 0,05$). W grupie doświadczalnej po 24 godz. od wstrzyknięcia $MnCl_2$ stwierdzono przyrost poziomu GABA o 670%, po 48 godz. o 406%, a po 72 godz. o 85%.

Kora centralna. Poziom GABA w normie wynosił $0,92 \pm 0,08$ $\mu\text{mola/g}$ tkanki. Pomiędzy grupami kontrolnymi i normą nie było statystycznie istotnych różnic ($p > 0,05$). Różnice między normą i grupą zwierząt doświadczalnych były znamienne statystycznie we wszystkich przedziałach czasu. Obserwowano wzrost stężenia GABA odpowiednio o 404%, 155% i 71%.

Mózdzek (robak). Stężenie GABA w normie wynosiło $0,39 \pm 0,08$ $\mu\text{mola/g}$ tkanki. Poziom GABA w grupach kontrolnych w porównaniu z normą nie uległ istotnym zmianom ($p > 0,05$). Różnice wyników w grupie zwierząt doświadczalnych we wszystkich przedziałach czasu były statystycznie znamienne w porównaniu z normą. Poziom GABA po zatruciu $MnCl_2$ był wyższy po 24 godz. o 725%, po 48 godz. o 378%, a po 72 godz. o 256%.

Uzyskane wyniki aktywności dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) przedstawiono w tabeli 2.

Prążkowie. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w aktywności enzymu w 3 grupach kontrolnych w stosunku do normy jak również w stosunku do grupy doświadczalnej, w której stwierdzono nieznaczące obniżenie aktywności GAD ($p > 0,05$).

Istota czarna. Nie zanotowano znamienych statystycznie zmian w aktywności GAD w grupach kontrolnych w porównaniu z normą. Stwierdzono natomiast znamieny spadek aktywności enzymu w czasie 24–72 godz. od zatrucia, odpowiednio o 28%, 19% i 20%.

Zakręt hipokampa. U zwierząt kontrolnych aktywność GAD nie odbiegała od normy. Po zatruciu $MnCl_2$ obserwowano niewielki, statystycznie nieznamieny spadek aktywności enzymu w porównaniu z normą.

Kora centralna. Nie zanotowano znamienych statystycznie zmian w aktywności GAD w grupach kontrolnych w stosunku do normy jak również w grupach doświadczalnych, w których stwierdzono nieznaczne obniżenie aktywności enzymu ($p > 0,05$).

Mózdzek. W grupach kontrolnych nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w stosunku do normy. Stwierdzono natomiast znamieny statystycznie spadek aktywności GAD po zatruciu $MnCl_2$ we wszystkich przedziałach czasu odpowiednio o 30%, 28% i 26%.

OMÓWIENIE

W zastosowanym modelu doświadczalnym stwierdzono znaczny przyrost zawartości GABA (od 71% do 725%) we wszystkich badanych strukturach OUN. Między 24 a 72 godz. od podania $MnCl_2$ obserwowano stopniowe obniżanie się stężenia GABA, przy czym w istocie czarnej po 72 godz. nastąpił powrót do normy. Należy zwrócić uwagę na zróżnicowaną wrażliwość poszczególnych struktur OUN na neurotoksyczne działanie jonów Mn^{++} . Mimo znacznego przyrostu GABA we

wszystkich badanych strukturach, w niektórych z nich nie stwierdzono istotnych różnic w aktywności GAD w porównaniu z normą. W mózdku oraz w istocie czarnej w okresie między 24–72 godz. od zatrucia manganem zanotowano nawet znamieny spadek obrotów GAD. Wzrost stężenia GABA przy braku zmian lub obniżeniu syntezy tego enzymu stanowi zagadnienie otwarte. Z piśmiennictwa wiadomo, że w następstwie zatrucia manganem dochodzi do spadku albo do przyrostu puli GABA w mózgu w zależności od drogi podania, dawki i czasu trwania doświadczenia (Bonilla 1978; Chandra i wsp. 1982; Gianutsos, Murray 1982). Jony Mn^{++} należą do znaczących inhibitorów enzymów zależnych od witaminy B_6 , a więc zarówno GAD, enzymu syntetyzującego, jak i GABA-T, enzymu rozkładającego GABA (Wu 1976). W warunkach zatrucia manganem różnica w stopniu zahamowania syntezy lub rozpadu może stanowić jeden z czynników decydujących o puli metabolicznej GABA w mózgu (Baxter 1976). Inne inhibitory GAD i GABA-T jak kwas walproinowy, kwas 3-merkaptopropionowy, kwas aminomasłowy wywołują *in vitro* różny stopień hamowania tych enzymów w zależności od dawki (Wood, Peesker 1973; Fowler i wsp. 1975; Löscher i wsp. 1984). Stwierdzono również, że podniesienie stężenia tych inhibitorów do dawki przeciwdrgawkowej zwiększa aktywność GAD (Löscher, Frey 1977).

Podwyższenie poziomu GABA przy równoczesnym braku zmian lub obniżeniu aktywności GAD może wynikać również z charakteru uszkodzenia OUN. Badania morfologiczne w zatruciu $MnCl_2$ wykazały wybiórcze uszkodzenie niemal wszystkich struktur istoty białej, ze zmianami głównie we włóknach mielinowych (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1983). Taki charakter zmian może przemawiać za upośledzeniem przewodnictwa i wtórnego uwalniania GABA, co z kolei może mieć wpływ na pulę neuroprzebieżnikową GABA (Baxter 1976). W zatruciu manganem należy także uwzględnić możliwość zmian w transporcie błonowym neuroprzebieżników, ponieważ mangan należy do czynników blokujących kanały wapniowe (Baker 1972). Również ten czynnik może mieć istotny wpływ na tak znaczny przyrost GABA w zastosowanym przez nas modelu zatrucia szczura jonami manganowymi.

Wyniki biochemiczne przemawiają za tym, że obserwowany u zwierząt doświadczalnych przejściowy zespół pozapiramidowy związany był z wysokim przyrostem GABA w OUN. Ustępowanie objawów neurologicznych wykazywało zbieżność czasową ze stopniowym obniżaniem się puli GABA i powrotem do poziomu kontrolnego stężenia w istocie czarnej po 72 godz. od początku doświadczenia. W dalszych badaniach nad zatruciem manganem warto zwrócić uwagę w jakim stopniu zaburzenia stosunku ilościowego GABA/DA w poszczególnych strukturach OUN może być odpowiedzialne za wystąpienie zespołu pozapiramidowego.

Na odrębną uwagę zasługuje rola niedotlenienia OUN w rozwoju zespołu pozapiramidowego u szczura poddanego zatruciu manganem. U zwierząt z jednostronnie podwiązaną tętnicą szyjną wspólną nie obserwowano objawów neurologicznych. W badaniach *in vitro* stwierdzono, że w zależności od stopnia niedotlenienia w zatruciu jonami manganu dochodzi do produkcji różnej ilości wolnych rodników O_2 , H_2O_2 , OH, które między innymi warunkują neurotoksyczne działanie manganu

(Donaldson i wsp. 1980). Te obserwacje mogą tłumaczyć zwiększenie toksyczności manganu po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych wspólnych. Z innych badań wiadomo, że podwiązanie obu tętnic szyjnych u szczura powodowało przejściowe zaburzenia metabolizmu węglowodanów, podstawowych substratów przemian energetycznych w mózgu (Śmiałek i wsp. 1971). Z kolei zatrucie manganem obniża aktywność niektórych etapów przemian cyklu kwasów trójkarboksylowych (Hietaanen i wsp. 1981). Można sądzić, że równoczesne działanie jonów manganowych i niedotlenienia warunkuje całokształt zaburzeń biochemicznych prowadzących do wystąpienia przejściowego zespołu pozapiramidowego.

WNIOSKI

1. Wystąpienie zespołu pozapiramidowego w ostrym zatruciu manganem u szczura zależy od zastosowanej dawki i stopnia niedotlenienia OUN.
2. Ostremu zatruciu solami manganowymi towarzyszy wysoki przyrost stężenia GABA w OUN.
3. W ostrym zatruciu $MnCl_2$ u szczura dochodzi do wybiórczego zahamowania aktywności GAD w istocie czarnej i w mózdzku.
4. W zespole pozapiramidowym w wyniku zatrucia manganem istnieje korelacja pomiędzy ustępowaniem zaburzeń neurologicznych i normalizacją poziomu GABA w istocie czarnej mózgu szczura.

УРОВЕНЬ ГАММА-АМИНОМАСЛЯННОЙ КИСЛОТЫ (GABA) И АКТИВНОСТЬ ГЛУТАМАТНОЙ ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ (GAD) В МОЗГУ КРЫС С ЭКСТРАПИРАМИДАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ ВЫЗВАННЫМ ОСТРЫМ ОТРАВЛЕНИЕМ ХЛОРИСТЫМ МАРГАНЦЕМ

Резюме

Эксперименты проводили на 120 самцах крыс породы Вистар в условиях гаммабутиролактатного наркоза. Внутриаартериальное введение Mn^{++} в количестве 1 мг/мозг совместно с перевязкой общих сонных артерий вызывало выступление экстрапирамидального синдрома.

Авторы наблюдали прирост уровня GABA в стриатуме, в центральной коре, черной субстанции, в извилии гиппокампа и в мозжечке спустя 24 часов до 72 часов с момента инъекции $MnCl_2$. В черной субстанции повышенный уровень GABA держался 24 часа и возвращался к норме спустя 72 часа. Констатировано ингибирование синтеза GABA в черной субстанции. Наблюдалась корреляция между занижением неврологических синдромов и нормализацией уровня GABA в черной субстанции.

EFFECT OF ACUTE MANGANESE INTOXICATION WITH EXTRAPYRAMIDAL SYNDROME ON GABA LEVEL AND GAD ACTIVITY IN THE RAT BRAIN

Summary

The experiment was carried out on 120 male Wistar rats under GBL anesthesia. Intraarterial injection of Mn^{++} 1 mg/brain and bilateral occlusion of both carotids produced a transient extrapyramidal syndrome.

A high increase of GABA level in striatum, central cortex, hippocampus and cerebellum was observed 24 and 72 h after injection. In s. nigra the increased GABA concentration after 24 h, returned after 72 h to the normal level. Inhibition of GABA synthesis in s. nigra and cerebellum was found. A correlation between disappearance of neurological disorders and normalization of GABA level in s. nigra was noted.

PIŚMIENNICTWO

1. Autissier N., Rochette L., Dumas P., Beley A., Loireau A., Bralet J.: Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic manganese chloride administration. *Toxicology*, 1982, 24, 175–182.
2. Baker P. F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1972, 24, 177–223.
3. Banta R. G., Markesbery W. R.: Elevated manganese levels associated with dementia and extrapyramidal signs. *Neurology*, 1977, 27, 213–218.
4. Barbeau A., Inoue N., Clouter T.: The role of manganese in dystonia. *Adv. Neurol.*, 1976, 14, 339–351.
5. Baxter C. F.: Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. W: *GABA in nervous system function*. Red.: E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower, Raven Press, New York 1976, 61–87.
6. Bernheimer H., Hornykiewicz O.: Das Verhalten des Dopamin-Metaboliten Homovanillinsäure im Gehirn von normalen und Parkinsonkranken Menschen. *Arch. Pharmakol.*, 1964, 247, 305–306.
7. Bonilla E.: Increased GABA content in caudate nucleus of rats after chronic manganese chloride administration. *J. Neurochem.*, 1978, 31, 551–552.
8. Chandra S. V., Malhotra M., Shukla G. S.: Gabaergic neurochemistry in manganese exposed rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1982, 51, 5.
9. Donaldson J., LaBella F. S., Gesser D.: Enhanced autooxidation of dopamine as a possible basis of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 1980, 2, 53–64.
10. Ehringer H., Hornykiewicz O.: Verteilung von Noradrenalin und Dopamine (3-Hydroxytyramine) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin. Wschr.*, 1960, 38, 1236–1239.
11. Fowler L. J., Beckford J., John R. A.: An analysis of the kinetics the inhibition of rabbit brain γ -aminobutyrate aminotransferase by sodium n-diprophylacetate and some other simple carboxylic acids. *Biochem. Pharmacol.*, 1975, 24, 1267–1270.
12. Garattini S., Samanin R.: Selective neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. W: *Neurotoxicology*. Red. L. Roizin, H. Shiraki, N. Grcevič. Raven Press, New York 1977, 15–23.
13. Gianutsos G., Murray M. T.: Alterations in brain dopamine and GABA following inorganic or organic manganese administration. *Neurotoxicology, (Park Forest II)* 1982, 3, 75–81.
14. Hietanen E., Kilpio J., Savolainen H.: Neurochemical and biotransformational enzyme response to manganese exposure in rats. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 1981, 10, 339–345.
15. Hornykiewicz O.: Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis.*, 1972, 50, 390–412.
16. Inoue N., Tsukada Y., Barbeau A.: Behavioural effects in rats following intrastriatal microinjection of manganese. *Brain Res.*, 1975, 95, 103–124.
17. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. Śląska Akademia Medyczna, Katowice, 1970, 3–59.
18. Kim J. S., Hassler R.: Effects of acute haloperidol intoxication on the gamma-aminobutyric acid system in rat striatum and substantia nigra. *Brain Res.*, 1975, 88, 150–153.
19. Kosicka B., Bugera T. E., Członkowski A., Śmiałek M.: Wpływ doświadczalnego zatrucia chlorkiem manganawym na poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) i receptor dopaminergiczny D-2 w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 411–418.

20. Love I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8–13.
21. Löscher W., Frey H.-H.: Zum Wirkungsmechanismus von Valproinsäure. *Arzneimittelforsch.*, 1977, 27, 1081–1082.
22. Löscher W., Vetter M., Muller F., Bohme G., Stoltenburg-Didinger G.: Development of a synaptosomal model to determine drug-induced in vivo changes in GABA levels of nerve endings in 11 brain regions of the rat. *Neurochem. In.*, 1984, 6, 441–451.
23. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 393–410.
24. Mustafa S. J., Chandra S. V.: Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 931–933.
25. Neff N. H., Barrett R. E.; Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese dioxide administration in squirrel monkeys. *Experientia*, 1969, 25, 1140–1141.
26. Pycock Ch.: Other neurotransmitters in Parkinson' disease. W: *Neurotransmitter system and their clinical disorders*. Red. N. J. Legg. Acad. Press, London, New York, San Francisco 1978, 99–114.
27. Rodier J.: Manganese poisoning in Marrocan miners. *Br. J. Ind. Med.*, 1955, 12, 21–35.
28. Sarič M., Markicevič A., Hrustič O.: Occupational exposure to manganese. *Br. J. Ind. Med.*, 1977, 34, 114–118.
29. Śmiałek M., Mossakowski J.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego szczurów w zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377–387.
30. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz B., Mossakowski M. J.: UDPglucose: glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) and α -1-4-glucan: orthophosphate glucosyltransferase (EC 2.4.1.1.) activity in experimental ischemia. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1971, 19, 241–248.
31. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801–1805.
32. van Bogaert L. 1953, Za: Baschung P.: *Le manganisme professionnel*. Thèse. Faculté de Médecine de Strasbourg, Strasbourg 1962, 138–139.
33. Wood J. D., Peesker S. J.: The role of GABA metabolism in the convulsant and anticonvulsant actions of aminoxyacetic acid. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 379–387.
34. Wu Jang-Yen: Purification, characterisation and kinetic studies of GAD and GABA from mouse brain. W: *GABA in nervous system function*. Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York 1976, 7–55.

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

BARBARA KOSICKA, MAREK KITTEL, MIECZYSLAW ŚMIAŁEK

WPLYW ZATRUCIA CHLORKIEM MANGANAWYM W OKRESIE CIAŻY I LAKTACJI U SZCZURÓW NA POZIOM I SYNTEZĘ KWASU GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA) W MÓZGU

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Zakład Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Nauk Fizjologicznych AM, Warszawa

Zarówno w przewlekłym zatruciu manganem, jak i w chorobie Parkinsona oraz zespołach parkinsonowskich u człowieka podstawową zmianą biochemiczną jest obniżenie stężenia dopaminy i jej metabolitów w mózgu (Hornykiewicz 1972; Cotziaz i wsp. 1974, 1976). Również u szczurów po podaniu manganu stwierdzono obniżenie puli dopaminy i stężenia kwasu homowanilinowego. Leczenie L-dopą doprowadzało do normy poziom dopaminy. Przemawiało to za hamowaniem przez mangan hydrolazy tyrozyny, enzymu syntetyzującego dopaminę (Bonilla, Diaz-Ewald 1974).

Ostre zatrucie manganem po jego domózgowym podaniu wywoływało u dorosłych szczurów zaburzenia ze strony układu pozapiramidowego (Inoue i wsp. 1975; Garattini, Samanin 1977). Również jednorazowe iniekcje chlorku manganawego do tętnicy szyjnej wspólnej przy współistniejącym niedokrwieniu mózgu powodowało pojawienie się przejściowego zespołu pozapiramidowego (Kosicka i wsp. 1985). Natomiast, w przeciwieństwie do kliniki ludzkiej, przewlekłe i podostre zatrucie manganem u dorosłych szczurów nie prowadziło do wystąpienia objawów pozapiramidowych (Jonderko 1970; Śmiałek, Mossakowski 1981). Nie udało się również ich uzyskać u młodych szczurów poddawanych zatruciu $MnCl_2$ natychmiast po urodzeniu, jakkolwiek wiadomo skądinąd, że mangan nie zostaje wydalony z organizmu rozwijającego się zwierzęcia do 17–18 dnia życia ze względu na wysoką zdolność do wiązania metalu przez tkanki (Miller i wsp. 1975; Cotziaz i wsp. 1976) oraz szczególną łatwość jego przenikania do mózgu w tym okresie życia (Mena i wsp. 1974). Powszechny jest przy tym pogląd, że rozwijający się mózg jest bardziej wrażliwy na toksyczne działanie manganu (Seth i wsp. 1977; Chandra, Shukla 1978). W doświadczalnym przewlekłym zatruciu manganem w czasie ciąży u królika objawy neurologiczne obserwowano częściej u potomstwa niż u matek (Grünstein, Popowa 1929).

Neuroprzebieżnikiem odgrywającym zasadniczą rolę w rozwoju zaburzeń ze

strony układu pozapiramidowego jest, poza dopaminą, kwas gamma-aminomasłowy (Barbeau i wsp. 1976). U zwierząt, zarówno z objawami pozapiramidowymi, jak i bez zaburzeń neurologicznych, stwierdzano nieprawidłowości metaboliczne w układzie GABA-ergicznym zróżnicowane w zależności od modelu doświadczalnego (Bonilla 1978; Gianutsos, Murray 1982; Kosicka i wsp. 1983). W poszukiwaniu przewlekłego modelu zaburzeń pozapiramidowych u szczurów postanowiono poddać je toksycznemu działaniu manganu w okresie życia płodowego i po urodzeniu w czasie dojrzewania układu nerwowego oraz ocenić poziom GABA i jego syntezę w wybranych strukturach OUN, a uzyskane dane porównać z wynikami zatrucia manganem samic w okresie ciąży i laktacji.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 20 ciężarnych samicach szczura szczepu Wistar oraz ich potomstwie obu płci w liczbie około 140 sztuk. Dziesięć samic poddano przewlekłemu zatruciu chlorkiem manganawym. Zwierzęta tej grupy zamiast wody otrzymywały do picia 0,8% wodny roztwór $MnCl_2$ począwszy od 10 dnia ciąży oraz przez 3 tygodnie okresu laktacji. Mioty wszystkich samic zredukowano do 8 sztuk. Matki oraz potomstwo dekapitowano po 3 tygodniach od urodzenia. Kontrolę stanowiły samice oraz ich potomstwo pojone wodą.

Mózgi po wyjęciu z jamy czaszki chłodzono na suchym lodzie i pobierano prążkowie, istotę czarną, zakręt hipokampa, korę centralną oraz robak mózdzku. Próbkę natychmiast zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem i ważono.

Oznaczanie poziomu GABA

Pobrane struktury homogenizowano w 5 objętościach 0,01 N HCl, pobierano 200 μ l homogenatu i dodawano 200 μ l 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Wytrącano w ten sposób białko, które następnie odwirowywano w temperaturze 4°C przy 900 g. Wirowanie trwało 20 min. Otrzymany nadsącz inkubowano w łaźni wodnej przez 30 min w temperaturze 60°C po dodaniu 20 μ l 50 mM kwasu glutaminowego i 200 μ l 14 mM ninhydryny. Następnie dodawano 5 ml odczynnika miedziowego (winian miedziowy z węglanem sodu). Fluorescencję odczytywano na spektrofлуorymetrycznej Aminco-Bowman przy długościach fal 380–450 nm według metody Love i wsp. (1958) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974).

Oznaczanie aktywności dekarboksylazy glutaminianowej (GAD)

Tkanekę homogenizowano w 5 objętościach buforu substratowego, przygotowanego *ex tempore*, o składzie: 0,2 M buforu fosforanowego, 100 mM kwasu glutaminowego, 50 mM fosforanu pirydoksalu. Homogenat o objętości 200 μ l inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 38°C przez 60 min. Po inkubacji do homogenatu dodawano 0,2 ml 10% TCA. Do próbki standardu wewnętrznego dodawano zamiast TCA 0,2 ml roztworu GABA w 10% TCA (1 mg GABA w 20 ml 10% TCA). Następnie w ciągu 20 min próby wirowano przy 900 g. Dalszy etap oznaczania

aktywności GAD był identyczny jak oznaczanie GABA, różnił się jedynie tym, że do prób, w których oznaczano aktywność GAD nie dodawano kwasu glutaminowego (Love i wsp. 1958; Sutton, Simmonds 1974).

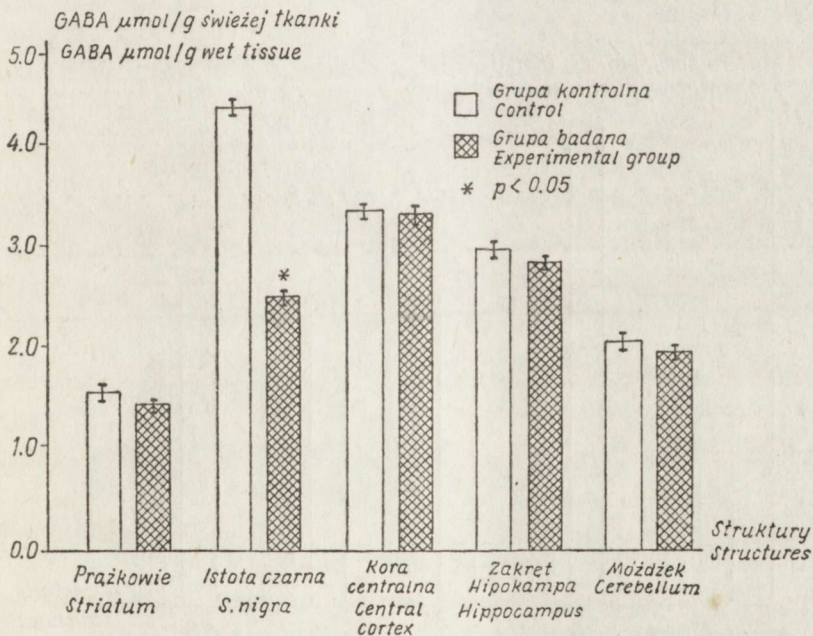
Obliczenia statystyczne wykonano według testu t-Studenta.

WYNIKI

Pojenie ciężarnych samic 0,8% roztworem $MnCl_2$ począwszy od 10 dnia ciąży do końca 3 tygodnia po urodzeniu potomstwa nie wywołało żadnych objawów neurologicznych zarówno u samic, jak i młodych szczurów. U potomstwa w wieku 3 tygodni obserwowano tylko obniżenie masy ciała oraz zmatowienie sierści.

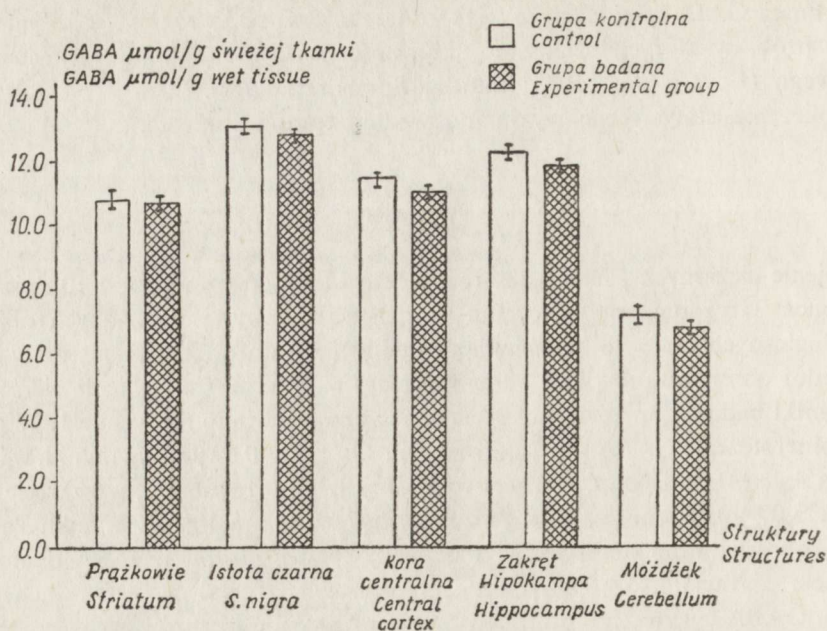
Wyniki badania poziomu GABA u samic przedstawiono na rycinie 1. W grupie kontrolnej stężenie GABA w prążkowie wynosiło $1,50 \pm 0,09 \mu\text{mol/g}$ tkanki, w istocie czarnej $4,48 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}$, w korze centralnej $3,39 \pm 0,16 \mu\text{mol/g}$, w zakręcie hipokampa $3,07 \pm 0,18 \mu\text{mol/g}$, a w mózdzku $2,37 \pm 0,18 \mu\text{mol/g}$. W wyniku zatrucia $MnCl_2$ obserwowano statystycznie znamienne spadki poziomu GABA około 45% w istocie czarnej ($2,45 \pm 0,08 \mu\text{mol/g}$ tkanki). W pozostałych strukturach OUN poziom GABA był zbliżony do wartości stwierdzanych u szczurów grupy kontrolnej.

Wyniki aktywności GAD u badanych samic przedstawiono na rycinie 2. W prążkowie samic kontrolnych aktywność GAD wynosiła $10,87 \pm 0,09 \mu\text{mol GABA/g}$



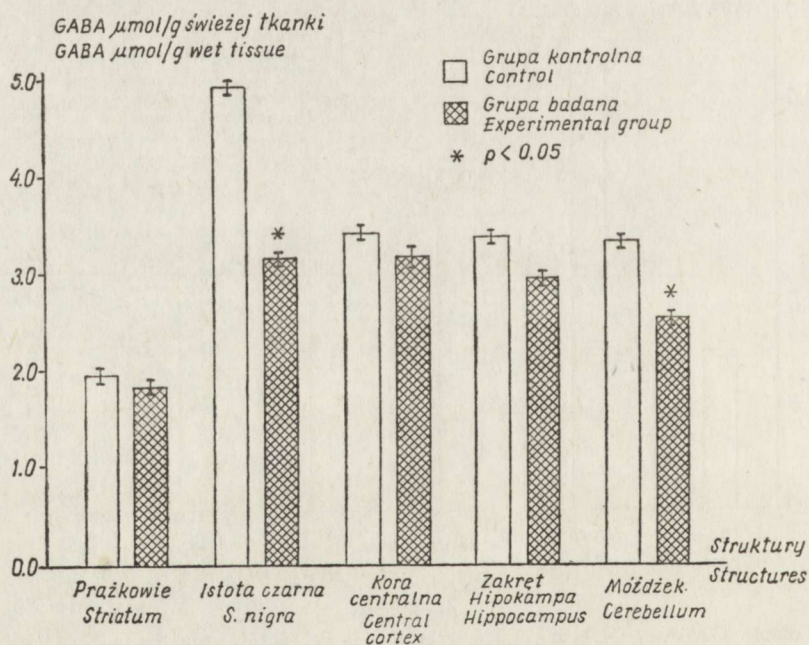
Ryc. 1. Poziom GABA w OUN u samicy szczura w doświadczalnym zatruciu $MnCl_2$ w okresie ciąży i laktacji

Fig. 1. GABA-level in adult female rat brain after $MnCl_2$ intoxication during pregnancy and lactation



Ryc. 2. Aktywność GAD w OUN u samicy szczura w doświadczalnym zatruciu MnCl_2 w okresie ciąży i laktacji

Fig. 2. GAD-activity in female rat brain after MnCl_2 intoxication during pregnancy and lactation



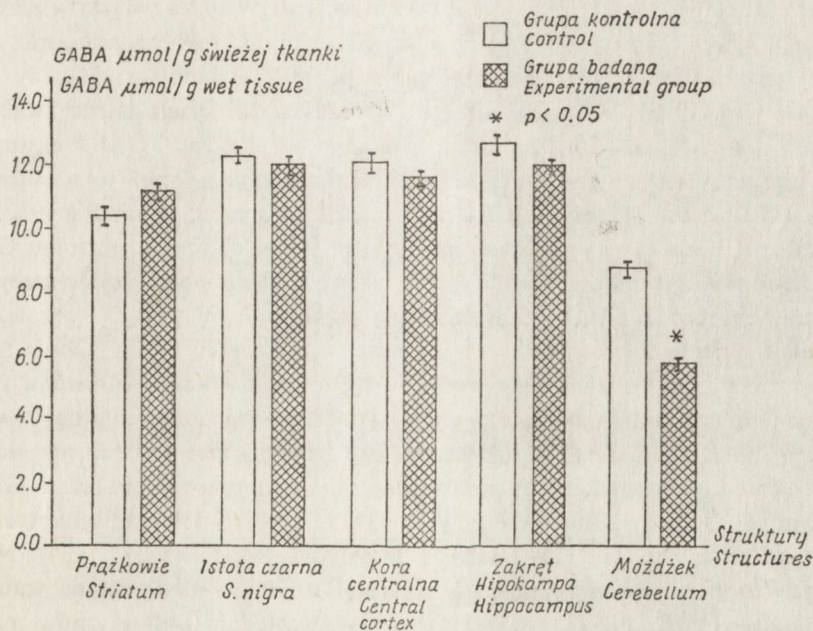
Ryc. 3. Poziom GABA w OUN rozwijających się szczurów w doświadczalnym zatruciu MnCl_2

Fig. 3. GABA-level in growing rat brain after MnCl_2 intoxication

tkanki, w istocie czarnej $13,05 \pm 0,55$, w mózdzku $6,77 \pm 0,27$ μmol GABA/g tkanki. Nie uzyskano istotnych różnic w aktywności enzymu pomiędzy samicami zatrawanymi MnCl_2 i kontrolą.

Poziom GABA w mózgu młodych szczurów przedstawia rycina 3. U zwierząt kontrolnych poziom neuroprzekaźnika wynosił w prążkowie $1,85 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$ tkanki, w istocie czarnej $4,74 \pm 0,06$, w korze centralnej $3,64 \pm 0,08$, w zakręcie hipokampa $3,44 \pm 0,07$, w mózdzku $3,41 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$ tkanki. W wyniku zatrucia MnCl_2 obserwowano statystycznie istotny spadek stężenia GABA w istocie czarnej około 37% ($2,99 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$ tkanki) oraz w mózdzku o 27% ($2,48 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$ tkanki). W pozostałych strukturach nie zanotowano znamienych różnic w porównaniu z kontrolą.

Aktywność GAD w mózgach szczurów młodych (przedstawiona na ryc. 4) wynosiła w prążkowie $4,88 \pm 0,17$ μmol GABA/g tkanki, w istocie czarnej $11,62 \pm 0,19$, w korze centralnej $12,56 \pm 0,25$, w mózdzku $8,63 \pm 0,12$ μmol GABA/g tkanki. U zwierząt zatrawianych MnCl_2 zaobserwowano znamieny statystycznie spadek aktywności enzymu w mózdzku około 29% ($6,08 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/g}$ tkanki). W pozostałych strukturach OUN aktywność GAD była zbliżona do stwierdzonej u zwierząt grupy kontrolnej.



Ryc. 4. Aktywność GAD w OUN rozwijających się szczurów w doświadczalnym zatruciu MnCl_2
 Fig. 4. GAD-activity in growing rat brain after MnCl_2 intoxication

OMÓWIENIE

W przedstawionym w niniejszej pracy modelu przewlekłego zatrucia szczura MnCl_2 nie uzyskano zespołu pozapiramidowego ani u matek ani u ich potomstwa. Mimo braku klinicznych wykładników neurotoksycznego działania manganu,

u młodych szczurów obserwowano bardziej zaznaczone cechy zatrucia. Masa ciała zwierząt zmniejszała się średnio o 20% w porównaniu do kontroli. Można przypuszczać, że mangan wykazuje bardziej szkodliwy wpływ na organizm szczura w okresie płodowym. Zatrucie potomstwa w okresie od 1 do 24 dnia po urodzeniu w innym modelu doświadczalnym nie spowodowało bowiem różnic w masie ciała (Deskin i wsp. 1979). Z nielicznych prac potwierdzających toksyczne transłożyskowe działanie manganu wiadomo np., że przewlekłe zatrucie samicy królika przez cały okres ciąży powodowało śmierć części potomstwa oraz obecność zespołu neurologicznego u pozostałej części miotu (Grünstein, Popowa 1929). Być może brak objawów neurologicznych w zastosowanym przez nas modelu wynika z różnic gatunkowych oraz długości okresu działania manganu na płód, samice ciężarne były bowiem poddane zatruciu dopiero od połowy ciąży, a więc po zakończeniu embriogenezy.

W badaniach biochemicznych nie stwierdzono także znacznych różnic w poziomie GABA oraz aktywności GAD. Z pięciu badanych struktur OUN obniżenie poziomu GABA stwierdzono jedynie w istocie czarnej w obu grupach wieku, a w mózdku tylko u młodych zwierząt. Natomiast aktywność GAD uległa statystycznie znaczącemu obniżeniu wyłącznie w mózdku młodych szczurów. Uzyskane wyniki przemawiają za odmiennym mechanizmem działania jonów Mn^{++} na poszczególne struktury OUN w zależności od wieku zwierząt. Wpływ związków manganu na układ GABA-ergiczny jest również zależny od drogi i czasu podania oraz zastosowanej dawki (Bonilla 1978; Chandra i wsp. 1982; Gianutsos, Murray 1982; Kosicka i wsp. 1983). W związku z tym w różnych modelach zatruc związkami manganu obserwowano zróżnicowane zmiany w układzie GABA-ergicznym: wzrost stężenia GABA w mózgu (Bonilla 1978), brak zmian w puli tego neuroprzebieżnika (Gianutsos, Murray 1982) jak również jego spadek (Chandra 1982).

Uzyskane przez nas wyniki sugerują, że mechanizm obniżenia poziomu GABA w mózdku zwierząt młodych może być związany z obniżeniem jego syntezy przy zmniejszonym obrocie GAD. Mangan należy do inhibitorów GAD i w zależności od stężenia może hamować jej aktywność nawet w 80% (Wu 1972). Obniżenie zarówno poziomu GABA, jak i aktywności GAD można również tłumaczyć innym mechanizmem działania manganu na rozwijający się mózg. Przyjmuje się, że szereg czynników nakładających się na toksyczny efekt działania manganu, między innymi niedotlenienie komórkowe, może powodować zmiany ilościowe w układzie GABA-ergicznym w następstwie zmniejszenia liczby komórek i ich połączeń synaptycznych oraz zmian w mitochondriach (Baxter 1976; Dydyk, Mossakowski 1984). Należy rozważyć również możliwość neurotoksycznego działania manganu na transport i uwalnianie GABA. Przede wszystkim należy uwzględnić wpływ jonów manganawych na aktywny transport GABA drogą kanałów wapniowych w różnych strukturach OUN (Baker 1972). Być może odgrywa tu pewną rolę wpływ jonów Mn^{++} na inne układy neuroprzebieżnikowe powiązane z układem GABA-ergicznym, w tym przede wszystkim na układ dopamin-ergiczny (Mustafa, Chandra 1971). Istnieje ścisła korelacja w funkcji tych dwóch neuroprzebieżników w patogenezie zatrucia manganem i rozwoju zespołu pozapiramidowego (Pycocock 1978).

Badania morfologiczne OUN u szczurów po zatruciu manganem wykazują nie-

wielkie i często odwracalne zmiany w neuronach. Jednak komórki nerwowe w strukturach układu pozapiramidowego bogatych zarówno w dopaminę, jak i GABA w niektórych modelach doświadczalnych przez dłuższy okres czasu wykazują cechy uszkodzenia (Dydyk, Mossakowski 1984).

Określenie stosunków ilościowych dopamina/GABA w OUN w zastosowanym przez nas modelu doświadczalnym może wyjaśnić brak zaburzeń pozapiramidowych u szczurów obu grup wieku. Wiadomo, że znaczne obniżenie stosunku dopamina/GABA u szczura w zatruciu manganem stanowi jeden z czynników warunkujących występowanie zespołu pozapiramidowego (Kosicka i wsp. 1985). W zastosowanym modelu doświadczalnym zarówno u matek, jak i ich potomstwa nie stwierdzono zaburzeń w układzie GABA-ergicznym w prążkowie mogące mieć również znaczenie dla neurologicznie bezobjawowego przebiegu zatrucia.

WNIOSKI

1. Zatrucie szczura jonami manganu w okresie ciąży i laktacji powoduje odmienny efekt toksyczny u matki i u potomstwa.
2. Obniżenie puli GABA po zatruciu manganem zależy od wieku zwierząt i od wrażliwości poszczególnych struktur OUN.
3. Zatrucie manganem w okresie ciąży i laktacji prowadzi do zahamowania syntezy GABA w mózdzku u potomstwa.

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ХЛОРИСТЫМ МАРГАНЦЕМ НА УРОВЕНЬ И СИНТЕЗ ГАММА-АМИНОМАСЛЯННОЙ КИСЛОТЫ В МОЗГУ У КРЫСЫ В ПЕРИОД БЕРЕМЕННОСТИ И ЛАКТАЦИИ

Резюме

Хроническое отравление 0.8% водным раствором $MnCl_2$ в течение беременности и лактации не вызвало неврологических расстройств ни у взрослых животных и ни у их потомства. Авторы наблюдали снижение резерва GABA в головном мозгу в зависимости от возраста и селективной чувствительности его структур. Отмечено достоверное статистическое снижение уровня GABA в черном веществе у взрослых крыс, а также в черном веществе и в мозжечке молодых крыс. Отравление марганцем ведет к заторможению синтеза GABA в мозжечке молодых крыс.

EFFECT OF MANGANESE CHLORIDE INTOXICATION ON GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID LEVEL AND SYNTHESIS IN THE RAT BRAIN DURING PREGNANCY AND LACTATION

Summary

Chronic poisoning with 0.8% $MnCl_2$ in drinking water during pregnancy and lactation did not evoke any neurological syndrome both in the adult animals and in the newborn. A different toxic effect of Mn^{++} on GABA metabolism has been observed in some structures of the brain in dependence on age. A significant decrease of GABA level was noted in substantia nigra in adult animals and in the cerebellum of the newborn. Manganese poisoning inhibited GABA synthesis in young rat cerebellum.

PIŚMIENICTWO

1. Barbeau A., Inoue N., Clouter T.: The role of manganese in dystonia. *Adv. Neurol.*, 1976, 14, 339–351.
2. Baker P. F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1972, 24, 177–223.
3. Baxter C. F.: Some recent advances in studies of GABA metabolism and compartmentation. W: GABA in nervous system function. Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York 1976, 61–87.
4. Bonilla E.: Increased GABA content in caudate nucleus of rats after chronic manganese chloride administration. *J. Neurochem.*, 1978, 31, 551–552.
5. Bonilla E., Diaz-Ewald M.: Effects of L-dopa concentration on dopamine and homovanilic acid in rats after chronic manganese chloride administration. *J. Neurochem.* 1974, 22, 297–299.
6. Chandra S. V., Shukla G. S.: Manganese encephalopathy in growing rats. *Environ. Res.*, 1978, 15, 28–37.
7. Chandra S. V., Kiran M. Malotra, Grijia S., Shukla G. S.: GABA-ergic neurochemistry in manganese exposed rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1982, 51, 5.
8. Cotzias G. C., Papavasiliou P. S., Mena I., Tang L. C., Miller S. T.: Manganese and catecholamines. *Adv. Neurol.* 1974, 5, 235–243.
9. Cotzias G. C., Miller S. T., Papavasiliou P. S., Tang L. C.: Interaction between manganese and rat brain dopamine. *Med. Clin. North. Am.*, 1976, 60, 729–738.
10. Deskin R., Bursian S. J., Edens F. W.: Neurochemical alterations induced by manganese chloride in neonatal rats. *Neurotoxicol.*, 1980, 2, 65–73.
11. Dydyk L., Mossakowski M. J.: Ultrastructural alterations of the grey matter structures of the brain due to experimental manganese intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 265–280.
12. Garattini S., Samanin R.: Selective neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. W: *Neurotoxicology*. Red. L. Roizin, H. Shiraki, N. Grcevič. Raven Press, New York 1977, 15–23.
13. Gianutsos G., Murray M. T.: Alterations in brain dopamine and GABA following inorganic or organic manganese administration. *Neurotoxicol. (Park Forest II)*, 1982, 3, 75–81.
14. Grünstein A. M., Popowa N.: Experimentelle Manganvergiftung. *Arch. Psychiat. Nervenkrankh.*, 1929, 87, 742–747.
15. Hornykiewicz O.: Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction. *Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis.*, 1972, 50, 390–412.
16. Inoue N., Tsukada Y., Barbeau A.: Behavioural effects in rats following intrastriatal micro-injection of manganese. *Brain Res.*, 1975, 95, 103–124.
17. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. *Śląska Akademia Medyczna* 1970, 3–59.
18. Kosicka B., Bugera T. E., Śmiałek M., Członkowski A.: Wpływ doświadczalnego zatrucia chlorkiem manganawym na poziom kwasu gamma-aminomasłowego i receptor dopaminergiczny D-2 w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 411–418.
19. Kosicka B., Bugera T. E., Kittel M., Śmiałek M.: Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) oraz aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w mózgu szczura z zespołem pozapiramidowym po ostrym zatruciu chlorkiem manganawym. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 201–209.
20. Love I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.* 1958, 3, 8–13.
21. Mena I., Horiuchi K., Lopez G.: Factors enhancing entrance of manganese into the brain: iron deficiency and age. *J. Nucl. Med.*, 1974, 15, 516.
22. Miller S. T., Cotzias G. C., Evert H. A.: Control of tissue manganese: initial absence and sudden emergence of excretion in the neonatal mouse. *Am. J. Physiol.*, 1975, 229, 1080–1084.
23. Mustafa S. J., Chandra S. V.: Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.* 1971, 18, 931–933.

24. Seth P. K., Husain R., Mushtag M., Chandra S. V.: Effect of manganese on neonatal rat: manganese concentration and enzymatic alterations in brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1977, 40, 553–560.
25. Pycocock Ch.: Other neurotransmitters in Parkinson's disease. W: *Neurotransmitter systems and their clinical disorders*. Red. N. J. Legg, Acad. Press, London, New York, San Francisco 1978, 99–114.
26. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego szczura w zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377–387.
27. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in the brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801–1805.
28. Wu J-Y.: Purification, characterisation and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain. W: *GABA in nervous system function*. Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York 1976, 7–55.

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

URSZULA RAFAŁOWSKA, ZBIGNIEW DĄBROWIECKI,
ANNA PASTUSZKO, MARIA ROSNOWSKA

EFFECT OF CHRONIC LITHIUM ADMINISTRATION
ON NEUROTRANSMITTER METABOLISM IN SYNAPTOSOMES
FROM RAT BRAIN

Department of Neurochemistry, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw
and Psychoneurological Institute, Warsaw

Lithium interacts with many biological systems and affects cellular functions by altering enzyme activities, the membrane transport mechanism and receptor processes (Bunney, Mandell 1978). Much evidence suggests that brain neurotransmitters may be involved in affective disorders (Murphy, Redmond 1975; Murphy et al. 1978). Although it is well established that lithium is effective in the treatment of mania, the precise neurochemical effects of this ion are still unknown. Numerous studies have been conducted in an attempt to answer this question, but the results are often conflicting, presumably because of the variability in the dose, mode, time of duration of lithium administration and species studied (Knapp, Mandell 1975; Vizi 1975; Murphy 1976; Pert et al. 1978).

Since lithium may have different effects in various brain regions, more may be learned about this drug by studying the effects in selected brain areas, or subcellular fractions of these areas, rather than in the whole brain.

Moreover, since lithium must be given chronically to be effective in man, it would seem that the most relevant neurochemical changes would be those which occur after chronic (not acute) administration of a dose that can maintain the blood level of this ion in the clinically effective range (Maggi, Enna 1980). In the present study, we describe data concerning the effect of chronic ingestion of lithium on the neurotransmitters' metabolism in a pure synaptosomal fraction from brain hemispheres.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on Wistar rats weighing ca 200 g. Lithium was introduced via gastric tube directly into the stomach in a 150 mg/kg body weight dose, each day for 6 weeks. After this time, the animals were decapitated and the synaptosomal fraction was prepared. The level of lithium in the blood was 1.1 mmol/l.

Synaptosomes were obtained from the hemispheres of animals according to the method of Booth and Clark (1978). The high purity and good energy metabolism of this fraction was characterised (Deutsch, Rafałowska 1979; Rafałowska et al. 1980; Deutsch et al. 1981).

Synaptosomes were homogenized in 50 vol. of ice-cold 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) and centrifuged at $50\,000 \times g$ for 10 minutes. The pellet was washed once in the Tris-HCl buffer and finally suspended in the same medium containing 0.1% L-ascorbic acid and $10\ \mu\text{M}$ pargyline.

Synaptosomes were preincubated with glucose in Krebs-Henseleit saline buffer and shaken in a water bath at 30°C for 10 min. Aliquots were then diluted to the protein concentration of 2–3 mg/ml and uptake measurements started with the addition of radioactive neurotransmitters: [^3H] dopamine, spec. activity 21.53 Ci/mmol; [^3H] serotonin, spec. activity 30.1 Ci/mmol; [^3H] noradrenaline, spec. activity 46.5 Ci/mmol; [^3H] GABA, spec. activity 226 mCi/mmol.

200 μl samples were withdrawn at the intervals indicated and rapidly centrifuged through a layer of silicone oil (spec. grav. 1.03). Radioactivity in the supernatants and in the pellets was counted in 10 ml of Bray's scintillation mixture.

Synaptosomes (about 8–10 mg protein/ml) were suspended in Krebs-Henseleit, pH 7.3 buffer containing 10 mM glucose and preincubated for 6 min. At the end of this preincubation period one of the radioactive neurotransmitters was added (GABA $2.0\ \mu\text{M}$, dopamine $0.4\ \mu\text{M}$, norepinephrine $0.4\ \mu\text{M}$ and serotonin $0.2\ \mu\text{M}$) and the suspension was further incubated for 4 min. Aliquot samples were then taken and diluted 10-fold in the Krebs-Henseleit medium with or without $10\ \mu\text{M}$ veratridine. For release measurements samples (200 μl) were removed at the time intervals specified and centrifuged through a layer of silicone oil (Specific gravity 1.02, General Electric, Waterford, NY). Radioactivity was measured both in the pellet and the supernatant.

[^3H] spiroperidol (New England Nuclear, 33.2 Ci/mmol) binding assay was carried out in triplicate by a filtration technique, essentially as described by Burt et al. (1976). Aliquots of membrane fractions (0.5 ml containing 0.3–0.5 mg protein) were incubated for 20 min at 37°C in the presence of varying concentrations of [^3H] spiroperidol (0.1–3.2 nM) and in the presence or absence of $1\ \mu\text{M}$ (+) – butaclamol. After incubation, the samples were rapidly filtered through Whatman GF/B glass filters and washed three times with cold 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.4 (total wash volume about 10 ml and total operation time about 20 sec), air-dried and transferred to counting vials. The radioactivity was counted in scintillation counter. The binding constants (K_D and B_{max}) were derived from Scatchard plot analyses of specific binding, i.e. the difference in binding between samples in the presence and absence of (+) butaclamol.

The effect of lithium administered *in vivo* on ^{45}Ca uptake in brain synaptosomes was measured in standard, low potassium and in high potassium solutions to determine the depolarization-induced portion of Ca influx. For separation of internal calcium from that present in the external incubation medium we used the ion-exchange method described by Gasko et al. (1976).

Protein was determined by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as standard.

RESULTS

In the experiment described in Figure 1, we obtained a high uptake of neurotransmitters to synaptosomes. The rate of this uptake depended on the kind of neurotransmitter. As seen, the uptake of GABA was faster than that of the other neurotransmitters.

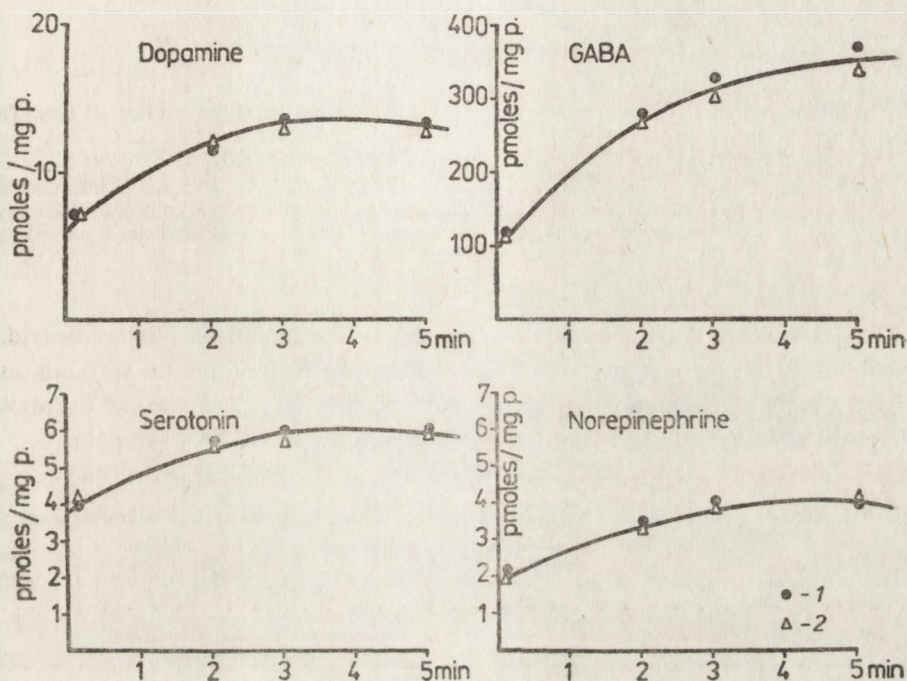


Fig. 1. Uptake of dopamine, GABA, serotonin and noradrenaline by synaptosomes obtained from control and chronic lithium-treated rats. Each point represents a mean of 8 experiments where 1 - Li, 2 - control. SD was less than 5%

Ryc. 1. Pobieranie dopaminy, GABA, serotoniny i noradrenaliny przez synaptosomy otrzymane ze szczurów kontrolnych i karmionych litem. Każdy punkt reprezentuje średnie z 8 doświadczeń. 1 - Li, 2 - kontrola. Odchylenie standardowe było mniejsze od 5%

After chronic lithium administration to rats, we observed no changes in the uptake to synaptosomes of dopamine, serotonin, noradrenaline, and GABA.

Spontaneous release of neurotransmitters from synaptosomes was very slow. This process was stimulated in the presence of veratridine.

Release of dopamine and serotonin after chronic ingestion of lithium did not change either with veratridine present or absent (data not shown). Only in the case of GABA did we observe enhanced veratridine-dependent release of this neurotransmitter from synaptosomes obtained from lithium-fed rats (Fig. 2).

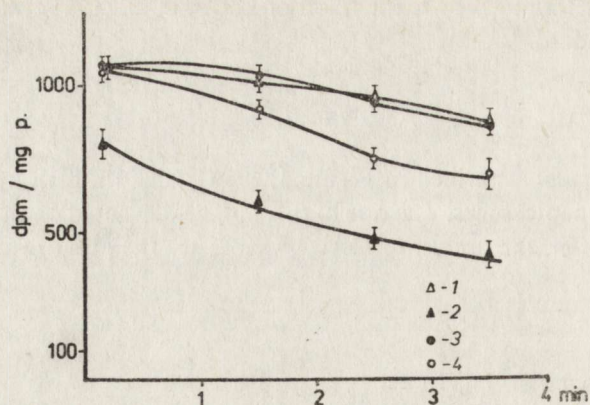


Fig. 2. Release of GABA from synaptosomes obtained from control and lithium-treated rats. The concentration of veratridine was $40 \mu\text{M}$. 1 - control, 2 - control + veratridine, 3 - Li, 4 - Li + veratridine. Each point represents a mean of 4 experiments. SD was less than 5%

Ryc. 2. Uwalnianie GABA z synaptosomów otrzymanych ze szczurów kontrolnych i karmionych litem. Każdy punkt reprezentuje średnie z 4 doświadczeń. 1 - kontrola, 2 - kontrola + weratrydyna, 3 - Li, 4 - Li + weratrydyna. Stężenie weratrydyny było $40 \mu\text{M}$. Odchylenie standardowe było mniejsze od 5%

The sensitivity of dopaminergic receptors obtained by binding of [^3H] spiroperidol to membranes of synaptosomes was changed after treatment of the rats with lithium.

The apparent maximum number of binding sites (B_{max}) decreased by about 16% and the dissociation constant (K_{D}) decreased by about 33% (Tab. 1).

Table 1. Effects of chronic lithium treatment on [^3H] spiroperidol binding to membranes from rat brain synaptosomes

Tabela 1. Wpływ przewlekłego podawania litu na wiązanie [^3H] spiroperidolu do błon z synaptosomów mózgu szczura

	K_{D} (nM)	B_{max} (fmol/mg protein) (fmol/mg białka)
Control Kontrola	0.165 ± 0.032 (4)	81.80 ± 4.59 (4)
Lithium Lit	0.111 ± 0.014 (4) * $p < 0.05$	68.88 ± 1.84 (4) * $p < 0.01$

K_{D} - equilibrium binding constant
stała dysocjacji

B_{max} - number of binding sites
stała wiązania receptora

Values are means \pm SD for the number of experiments indicated in parentheses

* p represents the significance of the difference between control and Li-treated synaptosomes

Wartości są średnimi arytmetycznymi \pm odchylenie standardowe dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach

* p odpowiada różnicom statystycznie znaczącym między kontrolą i grupą doświadczalną

Lithium administered *in vivo* enhanced ^{45}Ca uptake to synaptosomes in low-potassium medium, but had no effect on the uptake in the depolarizing high-potassium medium (Tab. 2).

Table 2. Effects of lithium administered *in vivo* on ^{45}Ca accumulation by synaptosomes

Tabela 2. Wpływ podawania litu *in vivo* na akumulację ^{45}Ca przez synaptosomy

Concentration Stężenie	^{45}Ca accumulation ^{45}Ca akumulacja 5 K ⁺	(nmol/mg protein/min) (nmole/mg białka/min) 100 K ⁺
Control Kontrola	6.99 ± 0.81 (3)	12.73 ± 2.28 (3)
Lithium Lit	8.83 ± 0.78 (3) *p < 0.05	12.23 ± 2.84 (3)

Mean ± SD. Number of experiments given in parentheses *p represents the significance of the difference between uptake in control and Li-treated synaptosomes

Wartości są średnimi arytmetycznymi ± odchylenie standardowe dla ilości doświadczeń podanych w nawiasach

*p odpowiada różnicom statystycznie znaczącym między kontrolą i grupą doświadczalną

DISCUSSION

Up till now, lithium effects on neurotransmitter metabolism have been investigated mainly in the whole brain or its anatomical parts. Only few authors have shown effects of lithium on the mechanism of neurotransmission in the synaptosomal brain fraction, and the fractions used were heterogenic and less than satisfactory for metabolic investigations (Whittaker 1969).

The synaptosomal fraction used in our experiments proved an appropriate and accurate model for the study of neuronal processes *in vivo*. The fraction was highly homogeneous and the parameters of the energy of this fraction were very similar to the values for the intact brain (Rafałowska et al. 1980; Deutsch et al. 1981). The membrane potential was high and depolarization could be achieved by high extracellular potassium (Deutsch, Rafałowska 1979). This fraction could synthesize, store and release neurotransmitters (Pastuszko et al. 1982).

In our experiments, chronic lithium administration maintained a level of this ion in the blood similar to that found to be clinically effective, so the obtained neurochemical changes may be related to the action of lithium in prophylactic treatment of recurrent manic-depressive disorders. The present results indicate that chronic lithium administration does not lead to changes in the uptake and release of neurotransmitters, the release of GABA excepted.

These data show that the action of lithium during chronic administration *in vivo* on the presynaptic parts of nerve endings is rather insignificant and connected only with the GABA-ergic system.

De Feudis (1974) observed the increase of GABA efflux from superfused rat cerebral cortex. He indicated that this effect is connected with substitution of Na by Li, which may cause changes as a depolarized factor (Dose, Deisch 1982). Our experiments on the synaptosomal fraction do not confirm this suggestion, because we have not found any effect of lithium on the release of GABA when the synaptosomes were not depolarized by veratridine.

Changes in GABA release from synaptosomes in depolarization conditions are not connected with changes of Ca ion movements because we observed enhanced Ca uptake to synaptosomes only in low-potassium medium, but found no effect on the uptake in the depolarizing high-potassium medium. Further studies are necessary to explain the mechanism of GABA release from synaptosomes in chronic digestion of lithium.

Primarily, neurotransmitter hypotheses of affective illness have focused on the presynaptic neuron (Bunney, Davis 1965; Schildkrant 1973). Such hypotheses have not been fully supported by clinical data. Bunney et al. (1977) have recently proposed that manic-depressive illness might rather be caused in part by oscillation in catecholamine receptor sensitivity. While it would be difficult to test this hypothesis in a clinical setting, animal model for altered states of receptor sensitivity are available.

It has been shown that chronic neuroleptic administration in rats causes dopamine receptor hypersensitivity. Pert et al. (1978) have shown that long-term treatment of rats with haloperidol produced an increased sensitivity to the locomotor and stereotypical action of apomorphine. This behavioural dopaminergic hypersensitivity was accompanied by increased binding of [³H] spiroperidol in the striatum. Rats treated concurrently with lithium and haloperidol failed to develop either behavioural sensitivity to apomorphine or increased striatal dopamine receptor binding.

Our experiments, did not include hypersensitivity of receptors, so the experimental conditions can be related to the periods of improvement in the patients. In these conditions prophylactic chronic lithium administration led to a decrease of synaptosomal dopamine receptor binding (B_{max}) similar to that in hypersensitivity of receptors, but simultaneously we observed a decrease in the binding equilibrium constant (K_D). This effect probably allows maintenance of dopaminergic receptor sensitivity at an unchanged level.

This effect is selectively specific for dopaminergic receptors. In the case of GABA receptors, Maggi and Enna (1980) observed changes in B_{max} but not in K_D .

WPLYW PRZEWLEKŁEGO PODAWANIA LITU NA PRZEMIANĘ NEUROTRANSMITERÓW W SYNAPTOZOMACH MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

W wyniku przewlekłego podawania litu szczerom poziom tego jonu we krwi był taki, jak u pacjentów poddawanych kuracji klinicznej. Toteż obserwowane zmiany neurochemiczne mogą odpowiadać działaniu litu w profilaktycznym leczeniu nawracających zespołów maniako-depresyjnych.

Stwierdzono, że przewlekłe podawanie litu nie prowadzi do zmian w pobieraniu przez synaptosomy dopaminy, GABA, serotoniny i noradrenaliny. Także uwalnianie tych neurotransmiterów (z wyjątkiem GABA) nie zmienia się. Uwalnianie GABA w obecności weratrydyny wzrastało około 50%. Czulość receptorów dopaminergicznych była oznaczana przez wiązanie ^3H spiroperidolu do błon synaptosomalnych. W warunkach podawania litu B_{max} — stała wiązania receptora malała około 16%, a K_D — stała dysocjacji około 33%. Prawdopodobnie równoległe zmniejszenie ilości miejsc wiążących oraz stałej dysocjacji pozwala utrzymać aktywność receptora dopaminergicznego na niezmiennym poziomie. Dane powyższe wskazują, że przewlekłe podawanie litu wpływa stabilizująco na większość badanych procesów związanych z transmisją synaptyczną.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ЛИТИЯ НА ОБМЕН НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ В СИНАПСОМАХ МОЗГА КРЫСЫ

Резюме

В результате хронического применения лития крысам уровень этого иона в крови был такой как у пациентов подвергаемых клиническому лечению. Кажется, что наблюдаемые нейрохимические изменения могут отвечать действию лития в профилактическом лечении рецидивирующей маниакальной депрессии. Констатируется, что хроническое применение лития не приводит к изменениям в потреблении дофамина, GABA, серотонина и норадреналина синапсоматами.

Также освобождение этих нейротрансмиттеров (за исключением GABA) не изменяется. Освобождение GABA при наличии вератридина возрастает на около 50%. Чувствительность дофаминэргических рецепторов обозначалась при помощи связи ^3H спироперидола к синаптосомальным мембранам. В условиях применения лития B_{max} — константа связи рецептора уменьшалась на около 16%, а K_D — константа диссоциации на около 33%.

Вероятно параллельное уменьшение количества связывающих мест и константы диссоциации позволяет удержать активность дофаминэргического рецептора на неизменном уровне. Вышеупомянутые данные указывают на то, что хроническое применение лития влияет стабилизирующим способом на большинство исследованных процессов связанных с синаптической нейротрансмиссией.

REFERENCES

1. Booth R. F., Clark J. B.: A rapid method for the preparation of relatively pure, metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.*, 1978, 176, 365—370.
2. Bunney W. E., Jr., Davis I. M.: Norepinephrine in depressive reactions. *Arch. Gen. Psychiatry*, 1965, 13, 483—494.
3. Bunney W. E. Jr., Post R. M., Anderson A. E., Kopanda R. T.: Catecholamine receptor sensitivity in manic-depressive illness. *Commun. Psychopharmacol.*, 1977, 1, 393.
4. Bunney W. E. Jr., Mandell A. J.: In: *Lithium controversies and unresolved issue. Proc. of the Internat. Lithium Conference, New York, 1978.* Eds.: T. Cooper, S. Gershon, N. S. Kline, M. Schou, Excerpta Medica, Amsterdam.
5. Burt D. R., Creese I., Snyder S. H.: Properties of ^3H -haloperidol and ^3H dopamine binding associated with dopamine receptors in calf brain membranes. *Molec. Pharmacol.*, 1976, 12, 800—812.
6. De Feudis F. V.: Studies on the collectability of ^3H -gamma-aminobutyric acid from rat cerebral cortex: Effect of lithium. *Experientia*, 1974, 30, 525—526.
7. Deutsch C., Rafałowska U.: Transmembrane electrical potential measurements in rat brain synaptosomes. *FEBS Letters*, 1979, 108, 274—278.

8. Deutsch C., Drown C., Rafałowska U., Silver I. A.: Synaptosomes from rat brain: morphology, compartmentation and transmembrane pH and electrical gradients. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 2063–2072.
9. Dose M., Deish R. A.: Lithium effects in the GABA synapse of crayfish stretch receptor neurons. In: *Basic mechanisms of the action of lithium*. Proc. of a Symposium held at Schloss Ringberg, Bavaria, FRG (1981). Eds. H. M. Emrich, J. B. Aldenhof, H. D. Lux, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 1982, 175–182.
10. Gasko O. D., Knowles A. F., Shertzer H. G., Suoliuna A. M., Racker E.: The use of ion-exchange resins for studying ion transport in biological systems. *Analytical Biochem.*, 1976, 72, 57–65.
11. Knapp S., Mandell A. J.: Effect of lithium chloride on parameters of biosynaptic capacity for 5-hydroxytryptamine in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975, 193, 812–823.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
13. Maggi A., Enna S. J.: Regional alterations in rat brain neurotransmitter systems following chronic lithium treatment. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 888–892.
14. Murphy D. L., Redmond D. E.: The catecholamines: Possible role in affect, mood and emotional behavior in man and animals. In: *Catecholamines and Behavior*. Ed. S. Fiedhoff, Plenum Press, New York, 1975, 73–117.
15. Murphy D. L.: Effects of lithium on catecholamines and other brain neurotransmitters. In: *The Neurobiology of Lithium*. Eds. W. E. Bunney, Jr., D. L. Murphy, *Neurosciences Res. Prog. Bull.*, 1976, 14, 165–182.
16. Murphy D. L., Campbell I., Costa J. L.: The brain serotonergic system in the affective disorders. *Prog. Neuro-Psychopharmacology*, 1978, 2, 1–31.
17. Pastuszko A., Wilson D. F., Erecińska M.: Neurotransmitter metabolism in rat brain synaptosomes. Effect of anoxia and pH. *J. Neurochem.*, 1982, 38, 1657–1667.
18. Pert A., Sivit R. C., Pert C. B., Bunney W. E., Jr.: Long-term treatment with lithium prevents the development of dopamine receptor supersensitivity. *Science*, 1978, 201, 171–173.
19. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F.: Energy metabolism in rat brain synaptosomes from nembutal-anesthetized and nonanesthetized animals. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 1380–1386.
20. Schildkrant J. J.: Pharmacology — the effects of lithium on biogenic amines. In: *Lithium*. Eds. S. Gershon, B. Shopsin, Plenum Press, New York, 1973, 51–75.
21. Vizi E. S.: Lithium and acetylcholine metabolism. In: *Lithium research and therapy*. Ed. F. N. Johnson, Academic Press, New York, 1975, 319–423.
22. Whittaker V. P.: The synaptosomes. In: *Handbook of Neurochemistry*, Ed. A. Lajtha, Plenum Press, New York, London, 1969, 2, 327–364.

Authors' address: Department of Neurochemistry, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Dworkowa str., 00-784 Warsaw

ANNA TARASZEWSKA, IRMINA B. ZELMAN

MORFOMETRYCZNA OCENA PROCESU MIELINIZACJI W MÓZGU KRÓLIKA pt

I. NERW WZROKOWY

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
PAN, Mińsk Maz.

Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym wykonane na materiale królików pt wykazały, u tego mutantu, nieprawidłowy rozwój osłonek mielinowych w postaci opóźnienia, osłabienia i przedłużenia procesu mielinizacji (Taraszevska 1983; Zelman, Taraszevska 1984). Fakt ten skłonił nas do przeprowadzenia badań morfometrycznych umożliwiających ilościową ocenę tych zaburzeń.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły króliki pt z typowym zespołem objawów klinicznych, w wieku 2, 4, 8 tygodni i 90 dni oraz zdrowe króliki w tym samym wieku, hodowane w takich samych warunkach.

Króliki w odpowiednim dniu życia usypiano 4% wodzianem chloralu i wykonywano przez aortę wstępującą perfuzję 3,9% roztworem aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym, pH 7,6. Po wyjęciu mózgu pobierano śródczaszkowy odcinek nerwu wzrokowego. Część materiału przeznaczoną do badań w mikroskopie świetlnym przed przeprowadzeniem do Eponu barwiono hemetoksyliną Kulczyckiego według metody opisanej przez Jędrzejowską i wsp. (1972). Z półcienkich skrawków fotografowano w każdym przypadku 3–4 pola i na mikrofotografiach w ostatecznym powiększeniu 900× liczono w 200 kwadratach o powierzchni 1 cm² zmielinizowane aksony dla określenia gęstości włókien.

Materiał przeznaczony do badań w mikroskopie elektronowym przeprowadzano w sposób typowy i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki krojono na ultramikrotomie LKB, kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie oglądano i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM 100 B. W każdej grupie wieku badano 2 króliki pt i 2 kontrolne. Na 10 elektronogramach w pow. 18.000× obliczano dla każdego przypadku liczbę zmielinizowanych i nie-

zmielinizowanych włókien oraz średnicę aksonów. Na 12 elektronogramach w pow. $40.000\times$ obliczano liczbę blaszek w osłonkach mielinowych z uwzględnieniem średnicy aksonów.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych badań przedstawiono w tabelach 1–5.

Gęstość zmielinizowanych włókien w nerwie wzrokowym kontrolnych królików zwiększa się do 8 tygodnia życia, natomiast w następnej grupie wieku nie ulega już wyraźnym zmianom (tab. 1). U królików pt wzrost gęstości włókien wraz z wiekiem jest mniejszy, ponadto widoczny jest również pomiędzy 8 a 12 tygodniem życia. Liczba włókien przypadająca na taką samą powierzchnię jest znacznie niższa u mutantów we wszystkich grupach wieku. Różnice w gęstości włókien u królika pt i w kontroli wynikają nie tylko z mniejszej liczby zmielinizowanych aksonów, ale również ze znacznie większej liczby elementów glejowych u mutantu (ryc. 1 i 2). Ponadto u królika pt włókna są rozproszone i nie tworzą zbitych układów pęczkowych charakterystycznych dla normalnego nerwu wzrokowego.

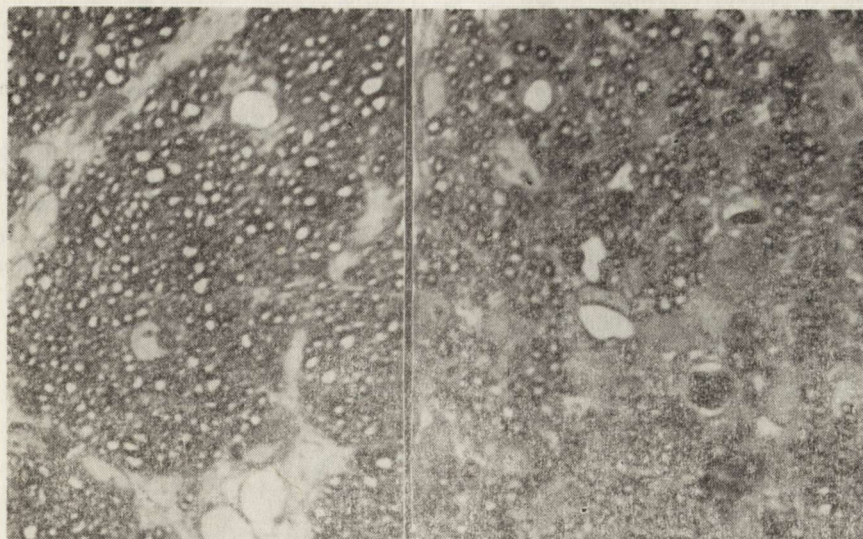
Tabela 1. Liczba zmielinizowanych włókien przypadająca na taką samą powierzchnię w nerwie wzrokowym królika pt i w kontroli

Table 1. Number of myelinated fibres in the same area of the cross section of optic nerve in pt and control rabbits

Wiek królika Rabbit's age	Liczba zmielinizowanych włókien Number of myelinated fibres	
	kontrola control	pt
	14 dni days	3750 3496
28 dni days	5577 5020	2249 2066
56 dni days	7000 6790	2923 2359
90 dni days	7290 6900	3530 2979

Włókna w nerwie wzrokowym królików pt i kontrolnych w większości należą do grupy drobnych aksonów o średnicy nie przekraczającej $1\mu\text{m}$, z tym, że ilość włókien większego kalibru zwiększa się wraz z wiekiem zwierząt (tab. 2).

Odsetki włókien, obliczone dla poszczególnych grup wielkości aksonów, nie wykazują wyraźnych różnic pomiędzy królikami pt i kontrolą, przy czym w materiale kontrolnym pomiędzy poszczególnymi przypadkami w tym samym wieku występuje większe zróżnicowanie wielkości odsetków.



Ryc. 1. Królik kontrolny 4-tygodniowy. Widoczne zmielinizowane aksony. Zwraca uwagę regularny układ włókien tworzących pęczki oddzielone przegrodami glejowymi. Półcienki skrawek eponowy. Hematoksylina Kulczyckiego. Pow. 900 ×

Fig. 1. Control rabbit 4-week-old. Myelinated axons. Regularly arranged fibres are separated by glial elements. Semithin epon section. Kulczycki hematoxylin. × 900

Ryc. 2. Objawowy królik pt 4-tygodniowy. Zmielinizowane aksony mniej liczne, nieregularnie rozproszone. Zwraca uwagę duża liczba jąder glejowych. Półcienki skrawek eponowy. Hematoksylina Kulczyckiego. Pow. 900 ×

Fig. 2. Symptomatic pt rabbit 4-week-old. Myelinated fibres less numerous, irregularly arranged. Increased number of glial nuclei. Semithin epon section. Kulczycki hematoxylin. × 900

U mutantu pt, podobnie jak w kontroli, istnieje wyraźna zależność pomiędzy ilością zmielinizowanych włókien i wielkością aksonów oraz wiekiem zwierząt (tab. 3). Aksony o średnicy powyżej 1 μm są zmielinizowane w ponad 90% w obu badanych grupach już u 2-tygodniowych królików. Pomiedzy królikiem pt i kontrolą występują natomiast wyraźne różnice w odsetkach zmielinizowanych aksonów o średnicy do 0,5 μm i od 0,5 do 1 μm . U mutantów odsetki tych włókien są znacznie niższe we wszystkich grupach wieku. U królików pt w 28 dniu życia są one podobne do stwierdzonych u 14-dniowych królików kontrolnych. U królików kontrolnych w wieku 8 tygodni (56 dni) prawie wszystkie włókna, włącznie z drobnymi aksonami o średnicy do 0,5 μm , są zmielinizowane, natomiast u królików pt w tym samym wieku i starszych (90 dni życia) odsetki zmielinizowanych włókien o średnicy do 0,5 μm pozostają niskie. Ogólne odsetki zmielinizowanych i niezmielinizowanych włókien obliczone łącznie dla wszystkich aksonów również wskazują na mniejsze zaawansowanie mielinizacji u królika pt.

U kontrolnych królików odsetki niezmielinizowanych aksonów zmniejszają się bardzo znacznie między 2 a 4 tygodniem życia, a od 8 tygodnia stanowią one mniej niż 1%. U królików pt odsetki niezmielinizowanych aksonów również obniżają się wraz z wiekiem, ale w znacznie mniejszym stopniu i u mutantów w wieku 8 tygodni oraz starszych (90 dni) stanowią od 9 do 25% wszystkich włókien.

Tabela 2. Rozkład odsetkowy włókien w nerwie wzrokowym królika pt i w kontroli w zależności od średnicy aksonów

Table 2. Percentage distribution of fibres according to axon diameters in optic nerve of pt and control rabbit

Królik Rabbit	Wiek Age	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)				Liczba liczonych włókien Number of counted fibres
		< 0,5	0,5–1	1–1,5	> 1,5	
pt	14 dni	47,1	45,8	6,5	0,6	1145
	days	47,5	45,9	5,8	0,8	777
	28 dni	32,1	52,5	11,9	3,5	712
	days	22,4	52,8	17,2	7,6	545
	56 dni	7,9	53,9	22,5	15,5	519
	days	9,0	54,4	25,3	11,3	458
	90 dni	8,6	49,8	22,8	18,8	421
	days	11,2	53,5	22,2	13,1	419
	14 dni	43,9	46,5	8,6	1,0	985
	days	55,9	31,2	7,4	5,5	760
kontrola control	28 dni	25,7	49,1	20,0	5,2	641
	days	17,4	55,6	20,7	6,3	579
	56 dni	13,9	49,5	23,1	13,5	555
	days	11,9	60,1	17,8	10,2	535
	90 dni	4,6	47,6	31,2	16,6	414
	days	10,3	54,5	24,7	10,5	477

W zmielinizowanych włóknach średnie liczby blaszek mielinowych w osłonkach są mniejsze u królików pt niż w kontroli we wszystkich grupach wielkości aksonów i we wszystkich grupach wieku zwierząt, jednak wzrost średniej liczby blaszek mielinowych wraz ze wzrostem wielkości włókien i wiekiem zwierząt jest zachowany u królika pt (tab. 4).

Średnie liczby blaszek w osłonkach mielinowych u 12-tygodniowych królików pt są prawie dwukrotnie niższe niż w kontroli. Włókna, w których całkowita liczba blaszek mielinowych w osłonce wynosi mniej niż 5 stanowią u królika pt około 50% wszystkich zmielinizowanych aksonów (tab. 5). Wysokie odsetki włókien z tak cienkimi osłonkami mielinowymi występują również w grupach aksonów większego kalibru o średnicy powyżej 1 μm .

OMÓWIENIE

Mielinizacja nerwu wzrokowego u normalnych królików była badana przez różnych autorów zarówno w aspekcie strukturalnym, jak i biochemicznym (Mottet i wsp. 1979; Skoff i wsp. 1980; Adamczewska-Goncerzewicz 1982; Śniatała-Kamasa

Tabela 3. Odsetki zmielinizowanych włókien w nerwie wzrokowym królika pt i w kontroli

Table 3. Percentage of myelinated axons in optic nerve of pt and control rabbit

Królik Rabbit	Wiek Age	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)				Odsetek włókien Percent of fibres	
		< 0,5	0,5–1	1–1,5	> 1,5	zmielinizo- wanych myelinated	niezmielini- zowanych unmyelinated
pt	14 dni	0,0	40,6	95,9	100,0	25,4	74,6
	days	2,7	46,5	84,4	100,0	28,3	71,7
	28 dni	7,0	71,4	95,3	100,0	54,6	45,4
	days	23,0	84,0	96,8	100,0	73,8	26,2
	56 dni	53,7	91,1	97,4	98,8	90,8	9,2
	days	29,3	80,7	99,1	100,0	83,0	17,0
	90 dni	11,1	66,7	99,0	96,2	74,8	25,2
	days	42,6	90,2	100,0	100,0	88,3	11,7
	14 dni	6,3	72,1	98,8	100,0	45,8	54,2
	days	24,2	70,9	92,9	100,0	48,0	52,0
kontrola control	28 dni	77,0	97,5	100,0	100,0	92,8	7,2
	days	84,2	99,1	100,0	100,0	96,7	3,3
	56 dni	98,7	98,9	100,0	100,0	99,3	0,7
	days	96,6	97,8	100,0	100,0	98,1	1,9
	90 dni	100,0	99,0	100,0	100,0	99,5	0,5
	days	100,0	99,2	100,0	100,0	99,6	0,4

1982; Zgorzalewicz i wsp. 1983). Z badań tych wynika, że nerw wzrokowy królika zaczyna mielinizować się w pierwszym tygodniu życia po urodzeniu, a między 12 a 30 dniem życia większość aksonów ulega zmielinizowaniu. W 30 dniu życia osłonki mielinowe wykazują zbitą strukturę z liczbą blaszek od 4 do 7, a u 70-dniowych królików grubość osłonek jest zwiększona do 10–20 blaszek (Śniatała-Kamasa 1982).

Nasze badania na materiale zdrowych królików kontrolnych wykazują podobny przebieg mielinizacji nerwu wzrokowego: u 14-dniowych królików mielinizacja włókien jest już w pełnym toku z wyjątkiem drobnych aksonów o średnicy do 0,5 μm , natomiast w 4-tygodniu (28 dzień) tylko niewielki odsetek włókien (mniej niż 10%) pozostaje niezmielinizowany. Między 4 a 12 tygodniem obserwowano wzrost średniej liczby blaszek mielinowych w osłonkach i tym samym zwiększanie się ich grubości.

Stwierdzone w naszym materiale: wczesna mielinizacja większych aksonów, wzrost wielkości aksonów wraz z wiekiem i mielinizacja drobnych aksonów w ostatniej kolejności, jak również zależność między liczbą blaszek mielinowych a wielkością aksonów są zgodne z powszechnie uznawaną rolą kalibru włókien w procesie

Tabela 4. Średnia liczba blaszek mielinowych w osłonkach włókien zmielinizowanych w nerwie wzrokowym królika pt i w kontroli

Table 4. Average number of myelin lamellae per sheath in the myelinated axons in optic nerve of pt and control rabbit

Królik Rabbit	Wiek Age	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)				Liczba badanych włókien No of fibres examined
		$\leq 0,5$	0,5–1	1–1,5	$> 1,5$	
pt	14 dni days	—	4,4	6,8	7,5	136
	28 dni days	2,6	5,2	6,2	10,0	207
	56 dni days	3,4	5,6	6,9	9,8	231
	90 dni days	2,8	4,9	7,6	13,0	232
kontrola control	14 dni days	4,7	6,0	7,3	8,6	234
	28 dni days	5,8	7,5	10,6	14,1	314
	56 dni days	5,6	7,8	10,1	18,1	323
	90 dni days	6,4	8,3	12,9	25,0	268

mielinogenezy (Friede 1973; Reahl, Hildebrandt 1982). Dlatego też określenie wielkości włókien nerwu wzrokowego u królików pt z zaburzoną mielinizacją w porównaniu do normalnych królików miało istotne znaczenie w naszych badaniach. Uzyskane wyniki nie wykazały jednak wyraźnych różnic w odsetkowym rozkładzie włókien w zależności od ich kalibru w nerwie wzrokowym królików pt i kontrolnych.

Vaney i Hughes (1976) ustalili, że wielkość włókien nerwu wzrokowego królika waha się od 0,25 do 7 μm , a szczytowy punkt na krzywej rozkładu włókien odpowiada 0,75 μm . Wysokie odsetki włókien o średnicy do 1 μm stwierdzone w naszym materiale są zbieżne z powyższymi danymi. Większe różnice indywidualne w wysokości odsetków u królików kontrolnych wynikać mogą z topograficznego zróżnicowania rozkładu i gęstości włókien w nerwie wzrokowym, na co również zwracają uwagę Vaney i Hughes (1976). Różnice te w mniejszym stopniu mogły się ujawnić u królików pt ze względu na mniejszą gęstość i zaburzoną architekturę układu włókien.

Pomimo braku wyraźnych różnic odsetkowych wielkości włókien między królikiem pt a kontrolnym, mielinizacja u królika pt jest najbardziej upośledzona w grupie drobnych aksonów o średnicy do 0,5 μm , jak również znacznie zmniejszona w grupie aksonów o średnicy od 0,5 do 1,0 μm . Zmiany te są widoczne u wszystkich

Tabela 5. Odsetki zmielinizowanych włókien z bardzo cienkimi osłonkami (o liczbie blaszek mielinowych poniżej 5)

Table 5. Percentage of myelinated fibres with extremely thin myelin sheaths (< 5 lamellae)

Królik Rabbit	Wiek Age	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)				Odsetek włókien z liczbą blaszek		
		$\leq 0,5$	0,5–1	1–1,5	$> 1,5$	Percent of fibres with number of lamellae < 5	> 5	
pt	14 dni days	—	62,9	9,5	—	40,7	59,3	
		—	67,2	26,7	—	58,4	41,6	
	28 dni days	88,9	46,8	16,0	0,0	41,9	58,1	
		87,5	37,0	47,8	8,3	40,0	60,0	
	56 dni days	71,4	73,3	47,7	8,7	55,9	44,1	
		—	30,2	11,5	8,0	20,0	80,0	
	90 dni days	—	53,7	30,6	5,6	36,5	63,5	
		75,0	50,0	31,7	0,0	39,0	61,0	
	kontrola control	14 dni days	60,0	29,0	0,0	0,0	23,4	76,6
			44,0	10,4	0,0	0,0	15,0	85,0
28 dni days		36,1	15,1	2,9	0,0	16,2	83,8	
		13,5	5,2	2,9	0,0	6,3	93,7	
56 dni days		37,5	17,1	0,0	0,0	13,8	86,2	
		22,6	2,6	0,0	0,0	5,3	94,7	
90 dni days	0,0	3,6	0,0	0,0	2,0	98,0		
	0,0	1,8	0,0	0,0	0,9	99,1		

badanych królików pt niezależnie od wieku. Ponadto stwierdzono, że mielinizacja włókien o średnicy do $0,5 \mu\text{m}$ u 2-tygodniowego królika pt jest prawie niewidoczna, a u królików 4-tygodniowych wysokość odsetków włókien zmielinizowanych odpowiada w przybliżeniu odsetkom tych włókien u 2-tygodniowych normalnych królików. Może to wskazywać na opóźnienie mielinizacji nerwu wzrokowego u królika pt przynajmniej około 2 tygodni oraz jej przedłużenie w czasie.

Różnice w odsetkach włókien zmielinizowanych i niezmielinizowanych między królikami pt 8- a 12-tygodniowymi wykazują duże rozbieżności i mogą odzwierciedlać indywidualne różnice w nasileniu procesu chorobowego między poszczególnymi królikami. Zależność między nasileniem zmian w obrazie mieliny i ciężkością przebiegu klinicznego choroby u królików pt podkreślano w naszej poprzedniej pracy (Zelman, Taraszewska 1984).

Upośledzenie mielinogenezy u królika pt charakteryzuje się nie tylko mniejszą liczbą zmielinizowanych włókien, ale również mniejszą liczbą blaszek mielinowych w osłonkach. Wysokie odsetki zmielinizowanych włókien o bardzo cienkich osłonkach zawierających 2–4 blaszki świadczą, że wiele spośród zmielinizowanych włókien nie osiąga prawidłowego stopnia mielinizacji. Zmiany strukturalne, opisy-

wane w osłonkach mielinowych u królika pt (Taraszewska 1983) polegają na rozluźnionym układzie blaszek, odcinkowym braku linii pośrednich, rozwarstwieniu linii gęstych.

Przyczyna zaburzeń mielinizacji u królika pt, podobnie jak u innych mutantów z hipomielinizacją, nie jest wyjaśniona. Zmniejszona ilość tworzonej mieliny może być ogólnie tłumaczona niewydolnością komórek oligodendrogleju, na co wskazuje również obraz ich niedojrzałości strukturalnej (Taraszewska 1983), zwiększona i przedłużona glejoza mielinizacyjna (Zelman, Taraszewska 1984) oraz wyniki badań lipidów mieliny (Domańska i wsp. 1984). Przedstawione wyniki badań ilościowych wskazują ponadto na zaburzenia dynamiki mielinizacji u królika pt, zależne od wielkości aksonów, stąd też nie można wykluczyć u mutantu pt ewentualnego udziału aksonów w procesie nieprawidłowej mielinogenezy.

МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОЦЕССА МИЕЛИНИЗАЦИИ В МОЗГУ КРОЛИКА pt

I. Зрительный нерв

Резюме

Проведено морфометрическое исследование зрительного нерва у кроликов pt и контрольных в возрасте 2, 4, 8 и 12 недель. На электронограммах авторы исчисляли диаметр аксонов, число миелинизированных и немиелинизированных волокон, а также число пластинок в миелиновых оболочках. На микрофотографиях из полутонких эионовых срезов они определяли густоту волокон.

В зрительном нерве кроликов pt и контрольных во всех возрастных группах констатировано преобладание волокон с диаметром до 1 мм; по мере старения животных возрастало число аксонов с большим диаметром. Проценты волокон в отдельных группах величины аксонов не проявляли существенных расхождений. Проценты миелинизированных волокон у кроликов pt были ниже во всех возрастных группах. Самые большие различия между кроликами pt и контрольными констатировано в процентах миелинизированных аксонов с диаметром до 0,5 мм и 0,5–1,0 мм. У мутантов проценты этих волокон были значительно ниже. У 12-недельного кролика pt процент немиелинизированных аксонов с диаметром до 0,5 мм составлял 88,9 и 57,4%, в то время как в контрольной группе уже в возрасте 8 недель почти все аксоны этого калибра были миелинизированы (96,6 и 98,7%). У кроликов pt процент немиелинизированных аксонов снижался с возрастом, но в значительно меньшей степени, чем в контрольной группе, что указывает на удлинённый и менее активный процесс миелинизации. Средние числа пластинок в миелиновых оболочках у кроликов pt были ниже чем в контроле во всех группах величины аксонов и всех возрастных группах. Высокие проценты волокон с очень тонкими оболочками указывают на то, что часть миелинизированных аксонов не достигает нормальной степени миелинизации.

MORPHOMETRIC STUDIES ON MYELIN DEVELOPMENT IN PT RABBIT BRAIN

I. Optic nerve

Summary

Morphometric studies were performed on the optic nerves in symptomatic pt and control rabbits of the age 14, 28, 56 and 90 days. On electronograms number of myelinated and nonmyelinated fibres in relation with the axons caliber and number of myelin lamellae per sheath was counted.

The density of myelinated fibres was evaluated on microphotographs taken from semithin epon sections.

It was found that the optic nerve of both pt and control rabbits is composed mainly of axons of the diameter up to $1,0\ \mu\text{m}$. The number of larger-diameter axons increases with the animals' age. The diameter-spectrum of nerve fibres population seems to be comparable in pt and control rabbits. The number of myelinated fibres was markedly reduced in pt mutants of all age groups. The most pronounced differences between pt and control rabbits were found in the percent of myelinated axons of the diameter up to $0,5\ \mu\text{m}$ and from $0,5$ up to $1,0\ \mu\text{m}$. In 90-day old pt the percent of nonmyelinated axons of the diameter up to $0,5\ \mu\text{m}$ amounted 88,9 and 57,4%, whereas in the 8-week old control rabbits almost all axons of this caliber were myelinated (96,6 and 98,7%). The percent of nonmyelinated fibres was decreasing in pt rabbits with the animals' age but to a considerably lesser degree than in control, indicating the prolonged and less active process of myelination in the mutant.

Moreover, the average number of lamellae per sheath in myelinated axons pt optic nerve was reduced in all age groups and in all groups of axons caliber. The high percent of axons with very thin myelin sheaths (below 5 lamellae) indicates that a part of fibres does not reach in pt the normal stage of myelination.

PIŚMIENNICTWO

1. Adamczewska-Gonczewicz Z.: Rozwój nerwu wzrokowego królika w świetle badań lipidowych (Streszczenie pracy habilitacyjnej). *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 305–313.
2. Domańska-Janik K., Wikeł A., Zelman I., Strosznajder J.: Developmental changes in brain lipids of a myelin-deficient mutant pt rabbit. Annual Conference of Polish Neuropathologists and the joined meeting with the Association of Neuropathologists of the GDR, Kraków, 3–5 maj, 1984 (Abst.).
3. Friede R. L.: Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J. comp. Neurol.*, 1973, 144, 233–252.
4. Jędrzejowska H., Sawicka E., Drac H., Glinka Z.: Metody histologicznego badania nerwów obwodowych. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 87–98.
5. Mottet S., Matthieu J.-M., Cohen S. R.: Myelin deposition in the rabbit optic system. *Brain Res.*, 1979, 164, 338–341.
6. Rehahl S., Hildebrand C.: Changing relation between onset of myelination and axon diameter range in developing feline white matter. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 54, 33–45.
7. Skoff R. P., Toland D., Nast E.: Pattern of myelination and distribution of neuroglial cells along the developing optic system of the rat and rabbit. *J. comp. Neurol.*, 1980, 191, 237–253.
8. Śniatała-Kamasa M.: Ultrastructural picture of the optic nerve in rabbit during ontogenic development. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 11–23.
9. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt na podstawie badań rdzenia kręgowego w mikroskopie elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 327–342.
10. Vaney D. J., Hughes A.: Fibre diameter spectrum, fibre count and comparison with a retinal ganglion cell count. *J. comp. Neurol.*, 1976, 170, 241–251.
11. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205–218.
12. Zgorzalewicz B., Neuhoff V., Zimmer H. G.: Changes in the protein and glycoprotein composition of rabbit nerve optic myelin during early postnatal development. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 161–168.

Adres auterek: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Warszawska 126, 05-300 Mińsk Maz.

Od 17 do 19 października 1985 r. odbędzie się w Innsbrucku w Austrii
XVIII DUNAJSKIE SYMPOZJUM NAUK NEUROLOGICZNYCH

Główne tematy Sympozjum:

1. Mózdzek
2. Naczyniowopochodne bóle głowy
3. Tematy wolne

Sekretariat Sympozjum: c/o Vienna Academy of Medicine, Alser Strasse 4, A-1090 Vienna, Austria. Telefon (0222) 42-71-65

lub Prof. Dr. F. Gerstenbrand. Univ.-Klinik für Neurologie, Anichstrasse 35, A-6020 Innsbruck, Austria.

*

Od 5 do 7 czerwca 1986 r. odbędzie się w Wiedniu Międzynarodowy Kongres
FOR CLINICAL NEUROIMAGING

Sekretariat Kongresu: c/o Vienna Academy of Medicine, Alser Strasse 4, A-1090 Vienna, Austria.

ANDRZEJ WAJGT, MIROSŁAW GÓRNY, JANUSZ SZYMAŚ

IZOLACJA I IMMUNOGENNOŚĆ GŁÓWNEJ GLIKOPROTEINY MIELINY (MAG) MÓZGU LUDZKIEGO

Klinika Neurologii i Zakład Patomorfologii Klinicznej Akademii Medycznej, Poznań

Uznaniem markerami oligodendrogleju są galaktocerebrozydy, białko zasadowe mieliny (MBP), glikoproteina związana z mielina (MAG), fosfohydrolaza 2'3' cyklicznego nukleotydu oraz antygeny umownie oznaczone jako antygeny O_1-O_4 (Schachner i wsp. 1982). Użycie monoklonalnych przeciwciał przeciwko antygenom O_1-O_4 pozwoliło na wyróżnienie podklas oligodendrocytów (Schachner i wsp. 1982).

Wykryta w 1973 roku we frakcji mielinowej przez Quarles'a i wsp. MAG-glikoproteina o c.c. 100000 daltonów, w porównaniu z innymi glikoproteinami mieliny, zawiera wyraźny komponent cukrowy (Quarles i wsp. 1973). Jest ona składnikiem swoistym dla kompleksu oligodendrocyt-mielina, a także dla komórki Schwanna, zdecydowanie różni się jednak od glikoproteiny PO mieliny obwodowego układu nerwowego (Sternberger i wsp. 1979). W kilku pracowniach na świecie prowadzone są badania immunohistochemiczne przy użyciu surowicy odpornościowej przeciwko MAG z mózgu szczura, którą otrzymano w jednej z nich (Sternberger i wsp. 1979; Itoyama i wsp. 1980; Ulrich, Heitz 1982). Przy zastosowaniu metod immunohistochemicznych MAG została zlokalizowana w cytoplazmie okołojądrowej, wypustkach i błonie komórkowej oligodendrocytów, oraz osłonkach mielinowych zwłaszcza w wewnętrznej blaszce mieliny i mezaksonie wewnętrznym (Sternberger i wsp. 1979). MAG występuje szczególnie obficie w okresie glejozy mielinizacyjnej i mielinizacji. Poza tymi fazami rozwojowymi ośrodkowego układu nerwowego można ją również wykazać w wewnętrznych, okołoaaksonalnych blaszkach osłonek rdzennych. Ze względu na charakter glikoproteinowy i opisaną lokalizację przedmiotem szczególnego zainteresowania jest rola MAG w rozwoju, w procesach różnicowania, mielinizacji, a także w stanach demielinizacyjnych.

W przedstawionej pracy zawarto wyniki badań zakończonych uzyskaniem surowicy odpornościowej przeciwko MAG z mózgu ludzkiego z przeznaczeniem do oznaczeń radioimmunologicznych i immunohistochemicznych.

MATERIAŁ I METODY

W pierwszym etapie badań potwierdzono, że jedno z białek wielkocząstkowych mieliny ze względu na znaczącą grupę cukrową ma charakter glikoproteidu. W badaniach tych podawano królikom 40 μCi (0,64 $\mu\text{mol.}$), ^{14}C -fukozy lub 100 μCi (0,008 $\mu\text{mol.}$) ^3H -fukozy. Po 24 godzinach zwierzęta dekapitowano, a z nerwów wzrokowych wyodrębniono frakcję mielinową metodą ultrawirowania i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny białek na żelu poliakrylamidowym (PAG) nakładając na żel 500 μg białka. Żele barwiono 1% roztworem czerni amidowej i sporządzano zapis densytometryczny. Następnie żele cięto na 2 mm odcinki i mierzono radioaktywność frakcji metodą ciekłej scyntylicacji. Zastosowano metodę A według Quarlesa i wsp. (1973). Pomiar radioaktywności frakcji nakładano na zapis densytometryczny. Względna radioaktywność pojedynczej frakcji wyrażono jako odsetek radioaktywności wszystkich frakcji. Metody izolacji frakcji mielinowej, rozdziałów elektroforetycznych, barwienia i odbarwienia żeli zastosowane w tej części badań były wzorowane na pracy Agrawala (1974).

MAG wyosobniano ze zliofilizowanej frakcji mielinowej mózgu ludzkiego według Quarlesa i Pasnaka (1977) w modyfikacji własnej. Metoda ta została przystosowana z badań nad izolacją sialoglikoproteiny błony erytrocytów (Marchesi 1972). Frakcję mielinową otrzymano metodą ultrawirowania w gradiencie stężeń roztworów sacharozy według Autilio i wsp. (1964) w modyfikacji własnej wprowadzonej zgodnie z zaleceniami Agrawala (1974).

Postępowanie zmierzające do izolacji MAG obejmowało następujące etapy:

1. Ekstrakcja mieliny (700 mg) mieszaniną chloroformu (2 części) — metanolu (1 część) z uzupełnieniem metanolu w trakcie ekstrakcji o 5% wyjściowej objętości, wirowanie, przemycie osadu eterem dwuetylowym.

2. Ekstrakcja osadu 0,25 M roztworem 3,5 dwujodosalicylanu litu (Eastman-Kodak Co.) w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 7,4.

3. Dodanie do w/w ekstraktu równej objętości 50% wodnego roztworu fenolu i wirowanie. Następnie rozdział na fazę wodną (80% objętości) i fenolową (20% objętości).

4. Dializa fazy wodnej wobec wody dejonizowanej, wirowanie celem usunięcia ewentualnego precypitatu, liofilizacja supernatantu, ekstrakcja liofilizatu mieszaniną chloroform—metanol 2:1 w celu usunięcia ewentualnego komponentu lipidowego i rozpuszczenie w wodzie destylowanej.

Czystość frakcji mielinowej, każdy etap izolowania MAG i czystość ostatecznego produktu tzn. wyosobnionej MAG kontrolowano metodą elektroforezy dyskowej w żelu akrylamidowym wg metody Agrawala (1974). Próby poddawane rozdziałowi zawierały od 20 do 100 μg białka w 1% roztworze SDS w 0,005 M buforze fosforanowym o pH 7,2. Żele barwiono 1% roztworem błękitu Coomassiego i odbarwiano według metody Agrawala (1974). W celu wykrycia komponentu cukrowego żele barwiono odczynnikami Schiffa (Segrest, Jackson 1972).

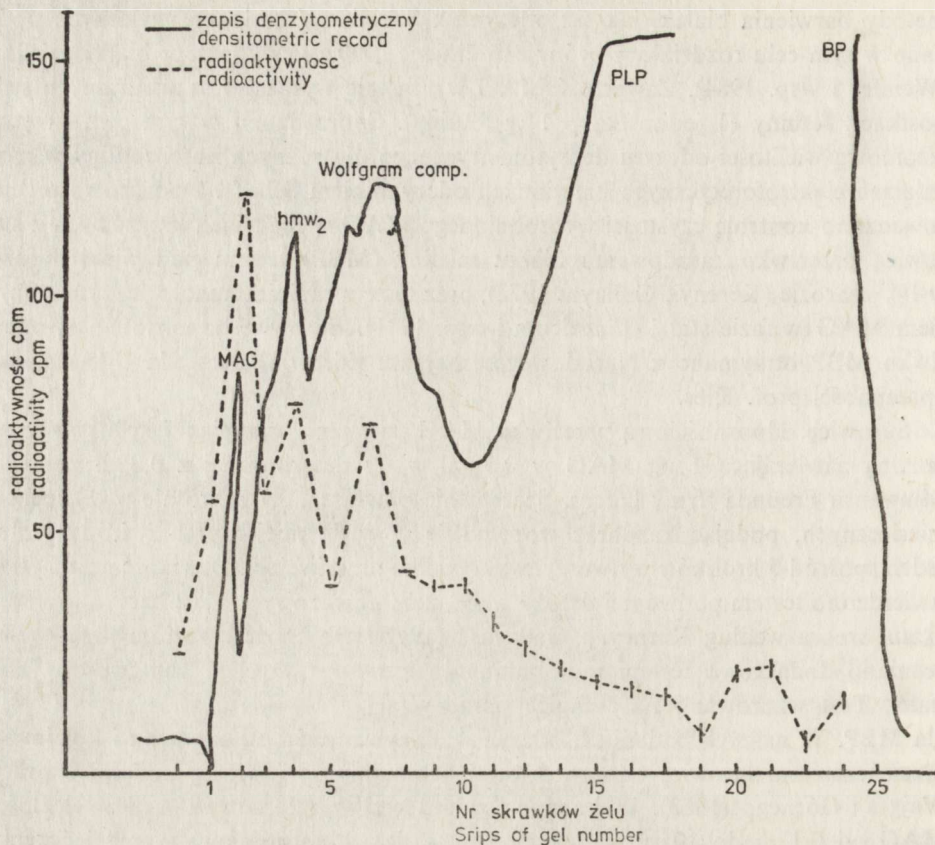
Wykrycie i ocena ilościowa MAG w pełnym spektrum białek mieliny wymagało jednak nałożenia na żel przynajmniej kilkuset μg białka mieliny stosując zarówno

metody barwienia białek, jak też odczynnik Schiffa. W badaniach własnych podano w tym celu rozdziałowi próby zawierające 1000 μg całkowitego białka mieliny (Wender i wsp. 1984). Zawartość MAG w mielinie wyrażono w arbitralnych jednostkach fetuiny (1 jednostka = 1 μg fetuiny). Sporządzono w tym celu krzywą wzorcową wielkości odczytu densytometrycznego dla różnych ilości fetuiny w rozdzielach elektroforetycznych barwionych odczynnikami Schiffa. Dodatkowo przeprowadzono kontrolę czystości wyosobnionego MAG w reakcjach krzyżowych z surowicą przeciwko zasadowemu białku mieliny (MBP) testem podwójnej dyfuzji w 1% agarozie (Kerenyi, Gallayas 1972), oraz testem radioimmunologicznym z użyciem MAG w fazie stałej (Linthicum i wsp. 1981). Surowicę odpornościową przeciwko MBP otrzymano z Narodowego Instytutu Zdrowia (Bethesda USA) dzięki uprzejmości prof. Kies.

Surowicę odpornościową przeciwko MAG uzyskano szczepiąc 5 królików mieszaniną zawierającą 1 mg MAG w 0,5 ml wody destylowanej z 0,8 ml pełnego adjuwantu Freund'a (firmy Difco). Szczepienie powtarzano trzykrotnie w odstępach miesięcznych, podając każdorazowo emulsję w wiele miejsc pod- i śródskórnie. Jeden spośród 5 królików wytworzył wykrywalne przeciwciała. Obecność przeciwciał stwierdzono testem podwójnej dyfuzji w 1% żelu agarozowym. Żele barwiono związkami srebra według Kerney i Gallayasa (1972). Obecność i poziom przeciwciał oceniano dodatkowo testem radioimmunologicznym z użyciem antygeny w fazie stałej. Test wzorowano na technice opracowanej przez Linthicum i wsp. (1981) dla MBP. W naszych badaniach odczyn wykonywano z 5 μg antygeny i kolejnymi rozcieńczeniami surowicy odpornościowej. Dokładny opis metody podano w pracy Wajgta i Górnego (1983). Wykonano również krzywą wzorcową dla różnych ilości MAG od 0,1 μg do 10 μg , w reakcji z surowicą odpornościową w rozcieńczeniu 1 : 1000. Oba testy przeprowadzono również z MBP celem sprawdzenia swoistości otrzymanej surowicy odpornościowej przeciwko MAG. MBP otrzymano drogą kwaśnej ekstrakcji frakcji mieliny mózgu ludzkiego. Czystość preparatu sprawdzono metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (Agrawal 1974). Otrzymaną surowicę odpornościową przeciwko MAG zastosowano w badaniach immunohistologicznych wykonanych przy użyciu kompleksu peroksydaza-antyperoksydaza (Sternberger i wsp. 1979; Szymaś, Wajgt 1985). Stężenie białka w roztworach określano metodą Lowry i wsp. (1951).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Badania przeprowadzone przy pomocy wbudowywania radioaktywnej fukozy do nerwu wzrokowego królika wykazały, że pojedyncza frakcja wielkocząsteczkowa białek mieliny o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej wbudowała 30% sumy radioaktywności wszystkich frakcji. Stanowiła ona, sądząc z powierzchni zapisu densytometrycznego rozdziału elektroforetycznego, zaledwie około 2% całkowitego białka mieliny królika (ryc. 1). Dane te są zgodne z uzyskanymi przez Quarlesa i Pasnaka (1977) dla głównej glikoproteiny mózgu szczura. Fukoza wbudowała się również do kompleksu Wolframa, zwłaszcza drugiego szczytu o większej ruch-

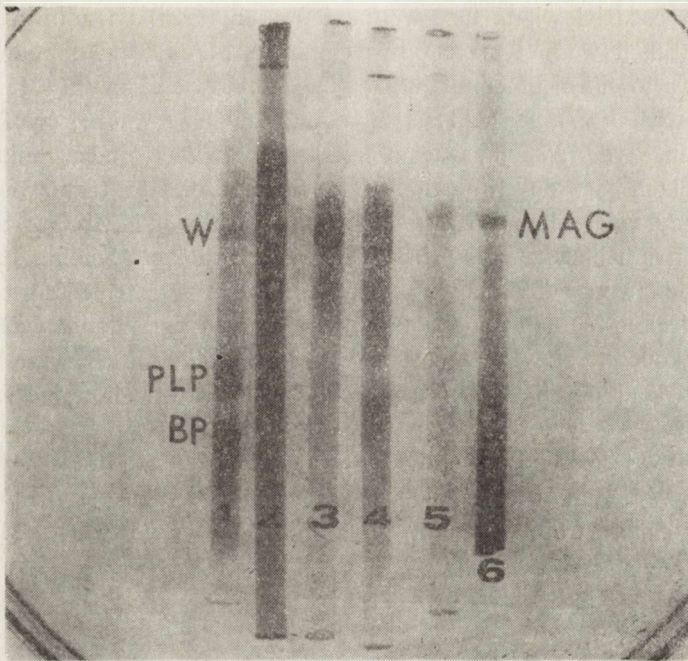


Ryc. 1. Wbudowywanie *in vivo* ^3H -tymidyny do białek mieliny nerwu wzrokowego królika. Rozdział elektroforetyczny 500 μg białek na żelu poliakrylamidowym. Żel poddano analizie denzytometrycznej przed pocięciem na skrawki długości 2 mm, tak że można było oznaczyć względne pozycje zabarwionych białek i szczyty krzywej radioaktywności. MAG — glikoproteina związana z mielina; hwm_2 — białka wielkocząsteczkowe; Wolfgram comp. — kompleks Wolfgrama; PLP — proteolipid; BP — zasadowe białko mieliny

Fig. 1. *In vivo* ^3H -fucose incorporation into rabbit optic nerve myelin proteins. 500 μg of protein was electrophoresed on PA Gel. Gel was subjected to densitometric analysis prior to cutting into 2 mm pieces so that relative positions of stained proteins and radioactive peaks could be determined. MAG — myelin associated glycoprotein; hwm_2 — high molecular weight proteins; Wolfgram comp — Wolfgram's complex; PLP — proteolipid protein; BP — Basic protein of myelin

liwości elektroforetycznej, oraz do frakcji białek wielkocząsteczkowych znajdujących się w rozdziale elektroforetycznym pomiędzy kompleksem Wolfgrama i MAG.

MAG w rozdziale elektroforetycznym całego spektrum białek mieliny ludzkiej wykazano barwiąc żele odczynnikiem Schiffa. Obok wielkocząsteczkowej frakcji białkowej MAG, barwieniu podlegały jeszcze składniki glikolipidowe o dużej ruchliwości elektroforetycznej uwidocznione u podstawy żelu (ryc. 2). Zawartość MAG w mielinie mózgu ludzkiego wyrażona w arbitralnie wybranych jednostkach (1 j odpowiada pod względem intensywności barwienia odczynnikiem Schiffa 1 μg fetuiny) wynosiła 5 jednostek na 1000 μg białka mieliny.

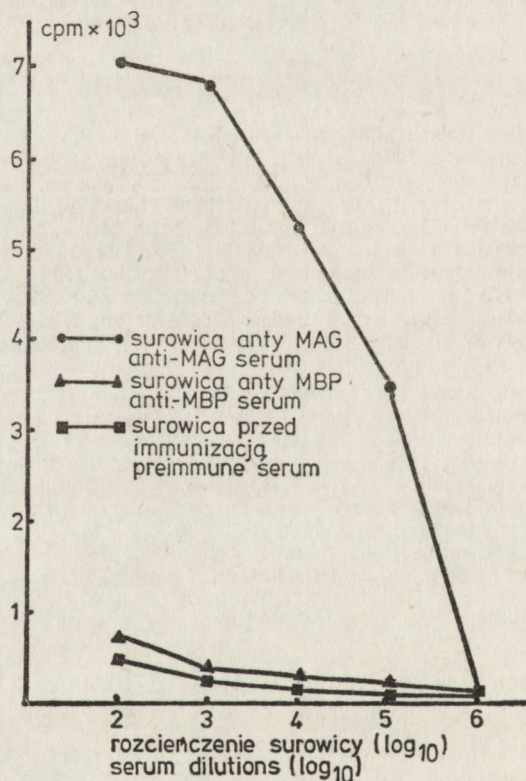


Ryc. 2. Kontrola procedury izolacji MAG z frakcji mielinowej mózgu ludzkiego metodą elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Numery żeli: 1) białka mielin (50 μg białka, barw. błękitem Coomassiego); 2) białka nierozpuszczalne w mieszaninie chloroformu, metanolu 2:1 (100 μg białka, barw. błękitem Coomassiego); 3) wysoko cząsteczkowe białka mielin wzbogacone w białko Wolfgrama, nierozpuszczalne w dwujodosalicylanie litu (30 μg białka, barw. błękitem Coomassiego); 4) białka rozpuszczalne w dwujodosalicylanie litu (50 μg białka, barw. błękitem Coomassiego); 5) faza wodna po rozdzieleniu dwujodosalicylanu litu z fenolem (10 μg białka, barw. błękitem Coomassiego), widoczny tylko pojedynczy prążek MAG; 6) elektroforeza na żelu poliakrylamidowym białek mielin (1000 μg białka, barw. metodą PAS). Widoczny tylko MAG i niektóre glikolipidy (dolna część ryciny). W — białko Wolfgrama, MAG — glikoproteina związana z mieliną, PLP — proteolipid, BP — białko zasadowe

Fig. 2. PAG electrophoretic monitoring of MAG isolation procedure from human myelin fraction. Gel number: 1) myelin protein spectrum (50 μg of protein, Coomassie brilliant blue staining); 2) proteins insoluble in chloroform-methanol mixture 2:1 (100 μg of protein, Coomassie brilliant blue staining); 3) myelin high molecular weight proteins enriched in Wolfgram protein, insoluble in lithium diiodosalicylate solution (30 μg of protein, Coomassie brilliant blue staining); 4) proteins solubilized in lithium diiodosalicylate solution (50 μg of protein, Coomassie brilliant blue staining); 5) aqueous phase after partitioning of lithium diiodosalicylate solution with phenol (10 μg of protein, Coomassie brilliant blue staining). Only single band of MAG mobility is visible; 6) PAG electrophoresis of whole myelin protein (1000 μg of protein, PAS staining). Only MAG and some glycolipids (bottom) are visualized. W — Wolfgram protein, MAG — myelin associated glycoprotein, PLP — proteolipid protein, BP — basic protein

Kontrolę kolejnych etapów izolowania MAG metodą rozdzielnic elektroforetycznych przedstawia rycina 2. Osad pozostający po ekstrakcji mieszaniną chloroformu-metanolu 2:1 i następnie eterem, zawiera praktycznie tylko białka wielko-cząsteczkowe wraz z białkiem Wolfgrama. Osad pozostający po ekstrakcji 0,25 M roztworem dwujodosalicylanu litu zawiera białka wielko-cząsteczkowe wyraźnie wzbogacone w białko Wolfgrama. Do roztworu dwujodosalicylanu litu przechodzą również białka wielko-cząsteczkowe zubożone w białko Wolfgrama. Są to glikoproteiny mielin (Quarles, Pasnak 1977). Roztwór dwujodosalicylanu litu po dodaniu

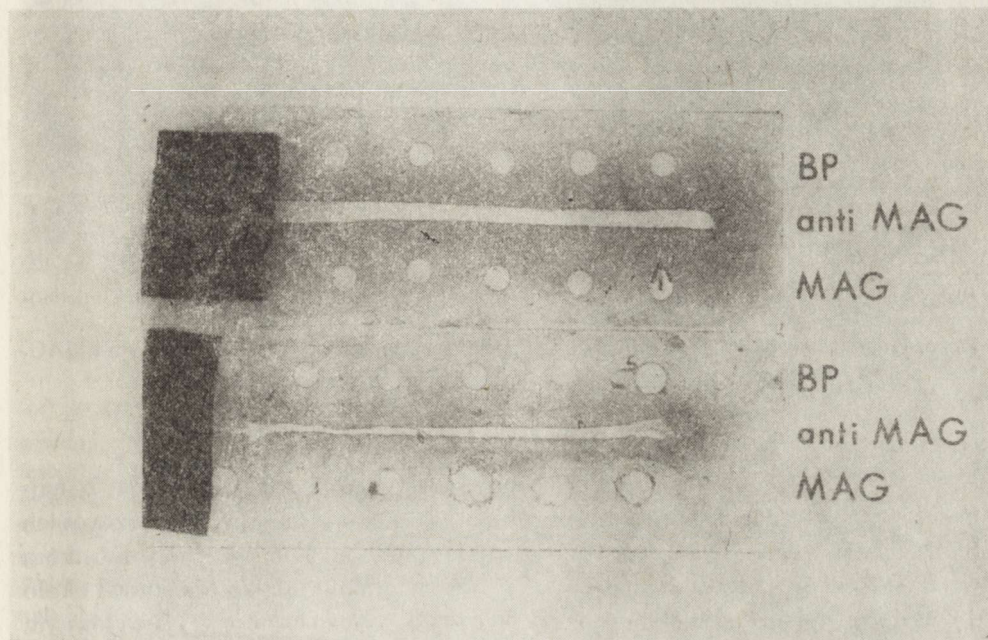
fenolu ulega rozdziałowi na fazę wodną (80% objętości) i fenolową (20% objętości). Do frakcji wodnej przechodzi wybiórczo MAG, prawdopodobnie dzięki znacznej zawartości i ujemnemu ładunkowi składników cukrowych (Marchesi 1972; Quarles, Pasnak 1977). Rozdział elektroforetyczny fazy wodnej (ryc. 2) ujawnia obecność jednej tylko frakcji zarówno na żelach barwionych odczynnikiem Schiffa, jak też na żelach barwionych błękitem Coomassie na białka. Ruchliwość elektroforetyczna otrzymanej glikoproteiny odpowiada ruchliwości MAG w rozdzielach pełnego spektrum białek mieliny barwionych odczynnikiem Schiffa. Po liofilizacji preparat poddawano dodatkowo ekstrakcji mieszaniną chloroformu-metanolu w celu usunięcia ewentualnych składników lipidowych i glikolipidowych. Pozostałe białka wysokocząsteczkowe, łącznie z białkiem Wolfgroma, zawarte pierwotnie w roztworze dwujodosalicylanu litu przechodzą do fazy fenolowej. Nie wykazano reakcji krzyżowych wyosobnionego preparatu MAG z surowicą odpornościową przeciw MBP w teście podwójnej dyfuzji w agarozie i w teście radioimmunologicznym (ryc. 3). Wykazano w ten sposób, że uzyskiwany MAG nie jest zanieczyszczony MBP. Nie wykazuje również wspólnych determinant antygenowych dla MAG i MBP.



Ryc. 3. Typowy test wiązania w fazie stałej wzorcowej surowicy przeciwko MAG (rozcieńczenie 10^{-2} – 10^{-6}) z MAG. Dla porównania przedstawiono wyniki otrzymane przy użyciu surowicy przed uodpornieniem i wyniki testu reakcji krzyżowej MAG z surowicą odpornościową przeciwko MBP
 Fig. 3. Typical solid-phase binding assay of reference anti-MAG serum (dilutions 10^{-2} – 10^{-6}) with MAG ($5 \mu\text{g}$ per well). For comparison the results obtained with preimmune serum, and the results of cross-reactivity test of MAG with anti-MBP immune serum are presented

Z 700 mg suchej masy mieliny, zawierającej około 140 mg całkowitego białka mieliny, uzyskiwano od 1 do 1,4 mg MAG co odpowiada około 1% całkowitego białka mieliny. Ponieważ MAG stanowi około 2–3% całkowitego białka mieliny, jej odzysk przedstawioną metodą nie przekracza połowy jej zawartości w osłonkach rdzennych. Dane te odpowiadają wynikom uzyskiwanym w badaniach frakcji mieliny mózgu szczura przez Quarlesa i Pasnaka (1977).

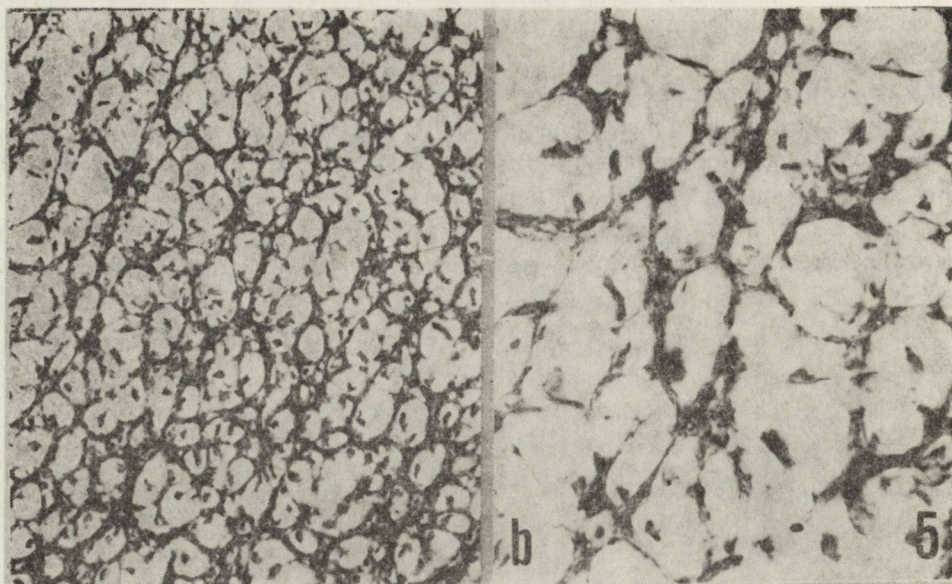
Jeden z 5 królików uodparnianych MAG wytworzył przeciwciała wykrywalne zarówno testem podwójnej dyfuzji w agarozie (ryc. 4), jak też metodą radioimmuno-



Ryc. 4. Podwójna dyfuzja w agarozie. Rowki wypełniono króliczą surowicą odpornościową przeciwko MAG. Górne wgłębienia wypełniono kolejnymi rozcieńczeniami BP, dolne — kolejnymi rozcieńczeniami MAG. Barwienie błękitem Coomassiego wykazało delikatny strął (górną płytkę). Strął odpornościowy z MAG dobrze uwidacznia zastosowana technika srebrowa (dolna płytkę). Nie stwierdzono krzyżowej reakcji z BP. BP — białko zasadowe, MAG — glikoproteina związana z mielina

Fig. 4. Double diffusion in agarose. Rows are filled with rabbit anti-MAG immune serum. Upper wells are filled with BP serial dilutions. Lower wells are filled with MAG serial dilutions. Coomassie brilliant blue staining revealed faint immune precipitate with MAG (upper plate). Immune precipitate with MAG is well visualized by silver staining technique (lower plate). No cross reactivity with BP was encountered. BP — basic protein, MAG — myelin associated glycoprotein

logiczną z użyciem MAG w fazie stałej (ryc. 3). W żadnym z wymienionych testów surowica odpornościowa przeciwko MAG nie reagowała krzyżowo z MBP. Kontrola immunohistochemiczna wykonana na skrawkach mózgu dorosłego szczura przy użyciu kompleksu peroksydaza-antyperoksydaza wykazała, że uzyskana surowica odpornościowa przeciwko MAG z mieliny mózgu ludzkiego reaguje wybiórczo z osłonkami rdzennymi (ryc. 5).



Ryc. 5. Istota biała mózgu dorosłego szczura. Dodatni odczyn immunologiczny osłonek mielinowych. Metoda anti-MAG PAP. Pow. 5a 120 ×, 5b 1000 ×

Fig. 5. White matter of the adult rat brain. Positive immunostaining of myelin sheaths. Anti MAG. PAP method. 5a × 120, 5b × 1000

PODSUMOWANIE

1. W mielinie mózgu człowieka jedna z frakcji wielkocząsteczkowych o najmniejszej ruchliwości elektroforetycznej w rozdzielach wykonanych w roztworach SDS zawiera znaczącą resztę cukrową, odpowiadającą 5 umownym jednostkom w 1000 μg całkowitego białka mieliny (1 j. = 1 μg fetuiny). Białko to stanowi około 2% całkowitego białka frakcji mielinowej mózgu dorosłego człowieka i jest głównym glikoproteidem mieliny (MAG).

2. Białko to podlega częściowej ekstrakcji roztworem dwujodosalicylanu litu wraz z pozostałymi wielkocząsteczkowymi białkami mieliny.

3. Ekstrakcja mieliny roztworem dwujodosalicylanu litu z wtórnym wprowadzeniem do ekstraktu roztworu fenolu powoduje wybiórczy rozdział białek wielkocząsteczkowych mieliny. Dzięki znaczącej reszcie cukrowej MAG pozostaje w fazie wodnej. Pozostałe białka przechodzą do fazy fenolowej. Odzysk MAG opisaną metodą nie przekracza 50% jej zawartości w mielinie mózgu dorosłego człowieka.

4. Otrzymany tą drogą MAG nie jest zanieczyszczony MBP. Odznacza się immunogennością i wzbudza produkcję swoistych przeciwciał po wielokrotnym uczuleniu królika emulsją z pełnym adjuwantem Freund'a. Otrzymana surowica odpornościowa przeciwko MAG może być użyta do badań immunohistochemicznych tkanki nerwowej, a także w testach radioimmunologicznych.

5. MAG izolowany z mózgu ludzkiego może być wykorzystana w testach radioimmunologicznych z użyciem antygeny w fazie stałej. Nie wykryto wspólnych determinant antygenowych dla MAG i MBP.

ИЗОЛЯЦИЯ И ИММУНОГЕННОСТЬ ГЛАВНОГО ГЛЮКОПРОТЕИНА (MAG) МИЕЛИНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО МОЗГА

Резюме

Представлен метод изоляции главного гликопротеина миелина (MAG) из человеческого мозга. Составные части миелина нерастворимые в смеси хлороформа/метанола главный гликопротеин миелина и остальные высокомолекулярные белка миелина вместе с белком Вольфрама подвергались частичной солубилизации в растворе 3,5 диодсалицилата лития. Дополнение экстракта фенолом привело к селективной изоляции MAG в водной фазе. Остальные белка проникали в фенольную фазу. Получилась иммунологическая кроличья сыворотка против MAG. Чистоту MAG и специфичность иммунологической сыворотки против MAG проверено при помощи тестов перекрестной реактивности соответственно иммунологической сыворотке против шелочного белка миелина (MBP) и с MBP. Авторы применили тест двойной диффузии в агаре и радиоиммунологический тест с применением антигенов в твердой фазе. Доказано пригодность полученной иммунологической сыворотки против MAG для иммуногистохимических исследований проведенных с применением комплекса пероксидаза-антипероксидаза (PAP).

ISOLATION AND IMMUNOGENIC PROPERTIES OF MYELIN-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (MAG) FROM HUMAN BRAIN

Summary

A procedure for selective isolation of the major glycoprotein from myelin (MAG — myelin associated glycoprotein) from human brain is described. Treatment of the chloroform/methanol-insoluble residue of human brain myelin with lithium 3.5 diiodosalicylate solubilized the major myelin-associated glycoprotein along with most other high molecular weight proteins, including Wolfram protein. Equilibration of the extract with phenol resulted in selective partitioning of the major glycoprotein into the aqueous phase, whereas the other proteins went into the phenol phase. Rabbit anti-MAG immune serum was obtained. The purity of MAG and immune specificity of anti-MAG antiserum were checked by cross-reactivity tests of two types: agar double diffusion and solid phase radioimmunoassay. Myelin basic protein (MBP) and anti-MBP immune serum were used as negative control in reactions with anti-MAG serum and with MAG, respectively. The immunohistochemical staining pattern of anti-MAG serum was determined by peroxidase-anti-peroxidase technique, and the usefulness of anti-human MAG serum for immunohistochemical studies was proven.

PIŚMIENNICTWO

1. Agrawal H. C.: Analysis of membrane proteins by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. W: Fundamentals of lipid chemistry. Red. R. M. Burton, F. Guerra. BI-Science Publications Division, Webster Groves, Missouri 1974, 511—543.
2. Autilio L. A., Norton W. T., Terry R. D.: The preparation and properties of purified myelin from the central nervous system. J. Neurochem., 1964, 11, 17—27.
3. Itoyama Y., Sternberger N. H., Webster H. deF., Quarles R. H., Cohen S. R., Richardson E. P.: Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions. Ann. Neurol., 1980, 7, 167—177.
4. Kerenyi L., Gallyas F.: A highly sensitive method for demonstrating proteins in electrophoretic, immunoelectrophoretic and immunodiffusion preparations. Clin. Chim. Acta, 1972, 38, 465—467.

5. Linthicum D. S., Jones S., Horvath L., Carnegie P. R.: Detection of antibodies to myelin basic protein by solid-phase radioimmunoassay with ^{125}J -protein A. *J. Neuroimmunol.*, 1981, 1, 17–26.
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
7. Marchesi V. T.: Isolation of membrane-bound glycoproteins with lithium diiodosalicylate. W: *Methods in enzymology. Complex carbohydrates*. Red. V. Ginsburg. Academic Press. New York, London 1972, 28/2, 252–254.
8. Quarles R. H., Everly J. L., Brady R. O.: Evidence for the close association of a glycoprotein with myelin in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 1177–1191.
9. Quarles R. H., Pasnak C. F.: A rapid procedure for selectively isolating the major glycoprotein from purified rat brain myelin. *Biochem. J.*, 1977, 163, 635–637.
10. Schachner M., Sommer I., Lagenaur C., Schnitzer J.: Developmental expression of antigenic markers in glial subclasses. W: *Neuronal-glia cell interrelationships*. Dahlem Konferenzen. Red. T. A. Sears. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1982, 321–336.
11. Segrest J. P., Jackson R. L.: Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. W: *Methods in enzymology. Complex carbohydrates*. Red. V. Ginsburg. Academic Press. New York, London 1972, 28/2, 54–63.
12. Sternberger N. H., Quarles R. H., Itoyama Y., Webster H. deF: Myelin associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 1979, 76, 1510–1514.
13. Szymaś J., Wajgt A.: Myelin associated glycoprotein (MAG) in oligodendrogliomas. An immunohistochemical study. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 239–246.
14. Ulrich J., Heitz Ph. U.: Immunocytochemistry of leukodystrophies. IX Internat. Congress of Neuropathology, Vienna, september 5–10, 1982. Abstracts 102.
15. Wajgt A., Górný M.: CSF antibodies to myelin basic protein and to myelin-associated glycoprotein in multiple sclerosis. Evidence of the intrathecal production of antibodies. *Acta Neurol. Scand.*, 1983, 68, 337–343.
16. Wender M., Wajgt A., Michałowska G., Tokarz E.: Myelin associated glycoprotein (MAG) in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Exp. Path.* 1984, 25, 125–127.

Adres autorów: Klinika Neurologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

JANUSZ SZYMAŚ, ANDRZEJ WAJGT

MYELIN-ASSOCIATED GLYCOPROTEIN (MAG) IN
OLIGODENDROGLIOMAS AN IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY*

Department of Pathology and Neurological Clinic, Academy of Medicine, Poznań

Myelin-associated glycoprotein (MAG) was first described by Quarles et al. (1972). Biochemical studies have shown, that this is a high molecular weight glycoprotein (100 000 dalton), closely associated with myelin or related structures in unaltered brain (Matthieu et al. 1973; Quarles 1975).

The first morphological study [Sternberger et al. 1978], using antiserum against purified MAG, showed that MAG was located specifically in the oligodendroglial cytoplasm and in the newly formed myelin sheaths of the developing rat central nervous system. Oligodendroglial cells contained MAG before myelination began. In adults, MAG staining was limited to periaxonal regions of myelinated axons. Oligodendroglia was not stained (Itoyama et al. 1980).

In this study immunohistochemical localization of MAG in human oligodendrogliomas was described, aiming to test this method for light microscopic identification of oligodendrogliomas.

MATERIAL AND METHOD

Forty five human oligodendrogliomas were investigated. Twenty tumors were classified as isomorphic and twenty five as anaplastic ones. The material was obtained during surgery, placed in 4% formaldehyde diluted in phosphate-buffered saline, then dehydrated and embedded in paraffin. After deparaffination and rehydration 5 µm thick sections were stained with hematoxylin and eosin. Alternate sections were processed for visualization of MAG by the peroxidase-antiperoxidase method (Sternberger 1979). After deparaffination the sections were briefly stored in 0,5 M Tris buffer. Then, they were covered with drops of the solutions composed of 0.3% hydrogen peroxide in anhydrous methanol, 3% normal swine serum in 0.5 M Tris buffer, rabbit anti-MAG serum diluted 1 : 100 in 0.5 M Tris buffer. The latter serum was prepared by immunizing rabbits with the antigen prepared from human brain

* Supported by Grant PR-06

(Wajgt et al. 1985). This was followed by application on the section of commercial swine anti-rabbit IgG diluted in 0.5 M Tris buffer and, then soluble peroxidase-antiperoxidase complex diluted in 0.5 M Tris buffer. Between each incubation sections were shortly rinsed with 0.5 M Tris buffer. At the end the peroxidase activity was visualized by immersing the sections in 0.10% hydrogen peroxide and 0.05% 3-3 diamino-benzidine tetrachloride in 0.1 M Tris buffer and, thereafter, in 2% OsO₄. Finally all sections were dehydrated and mounted for light microscopic examination. Nonspecific binding of immunoglobulin was prevented by absorbing anti-MAG serum with insolubilized normal human serum protein (Singh et al. 1979).

Specificity of immunostaining was controlled by omitting anti-MAG serum or by using absorbed antiserum. For the latter purpose, specific antibodies were removed by precipitation with purified MAG. A complete series of control neighbouring sections were prepared.

RESULTS

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

Oligodendroglioma (isomorphic)

Only cases with the characteristic appearance and free of the astrocytic cell component were selected. H-E staining revealed regular tumor cells, arranged in uniform sheets intersected by vascular stroma bundles. Tumor cells were characterized by round, dark nuclei, clear perinuclear cytoplasm and delicate cytoplasmic membranes. Sometimes, the tumor cross-section was composed of spindle-shaped cells with fusiform nuclei. Focal calcification was a common feature. Tumor cells diffusely infiltrated the adjacent cortex and the white matter.

MAG antiserum stained tumor cells, though only slight granular staining of the cytoplasm was present (Fig. 1). Scanty cell processes were also visualized by granular staining (Fig. 2). Only few cells were heavily stained (Fig. 3). The latter showed more distinct cytoplasm and processes. The nuclei of tumor cells remained unstained in this immunomethod. At the periphery of the tumor, cells with characteristic features of oligodendrocytes were stained by MAG antiserum (Fig. 4). Granules of positive immunostaining were also distributed along remnants of the myelin sheath. Neurons, blood vessels and cells with abundant cytoplasm and gemistocytic appearance remained unstained (Fig. 5).

Anaplastic oligodendroglioma

In H-E staining, the tumors consisted of small undifferentiated cells with scanty cytoplasm and dark nuclei. Giant cells with multiple or single nuclei were also present. Mitotic figures were frequent. Hyperplasia of endothelial cells was prominent. Foci of necrosis were infrequent. Five cases were highly anaplastic.

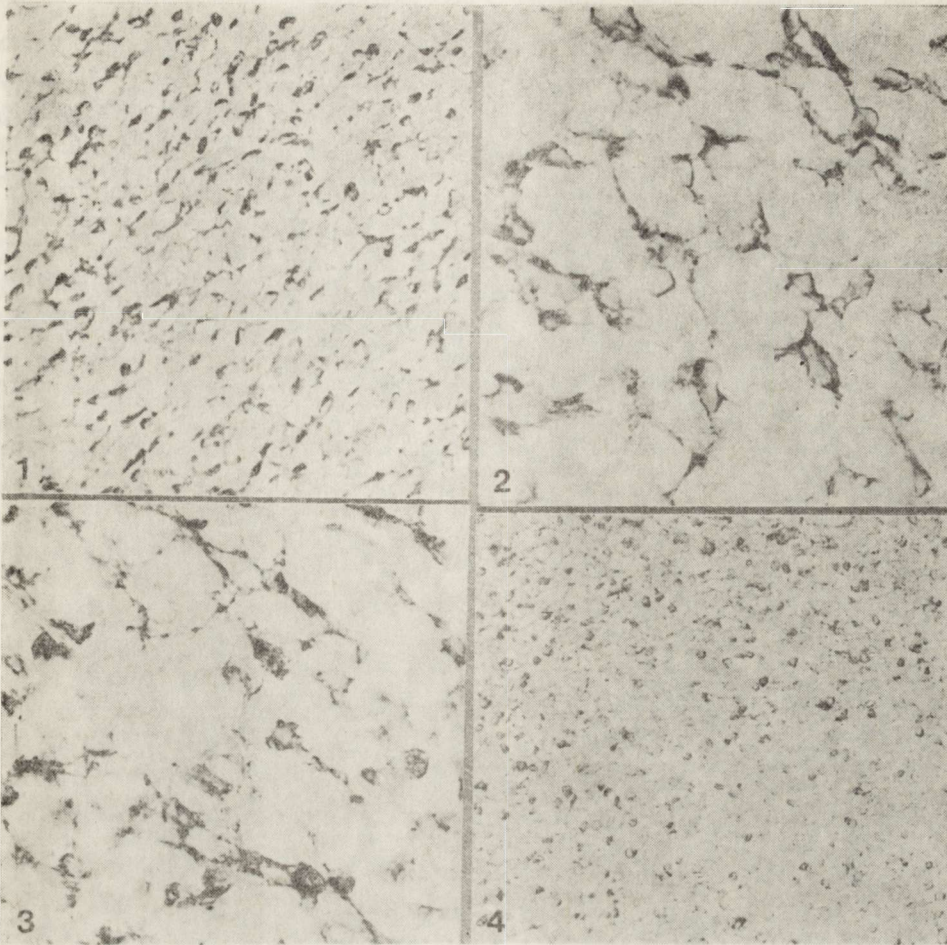


Fig. 1. Isomorphic oligodendroglioma. Slight-granular staining of the tumor cells. Anti-MAG-PAP method. $\times 120$

Ryc. 1. Izomorficzny skąpodrzewiak. Delikatne ziarniste zabarwienie komórek guza. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. 120 \times

Fig. 2. Isomorphic oligodendroglioma. Granular staining of the cytoplasm and cell processes. Anti-MAG-PAP method. $\times 1000$

Ryc. 2. Izomorficzny skąpodrzewiak. Ziarniste zabarwienie cytoplazmy i wypustek komórkowych. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. 1000 \times

Fig. 3. Isomorphic oligodendroglioma. Heavy staining of some tumor cells. Anti-MAG-PAP method. $\times 1000$

Ryc. 3. Izomorficzny skąpodrzewiak. Intensywnie zabarwione komórki guza. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. 1000 \times

Fig. 4. Peripheral area of isomorphic oligodendroglioma. Cells with features of oligodendrocytes stain positively. Anti-MAG-PAP method. $\times 100$

Ryc. 4. Obwodowa część izomorficznego skąpodrzewiaka. Wybarwione komórki z cechami gleju skąpowypustkowego. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. 100 \times

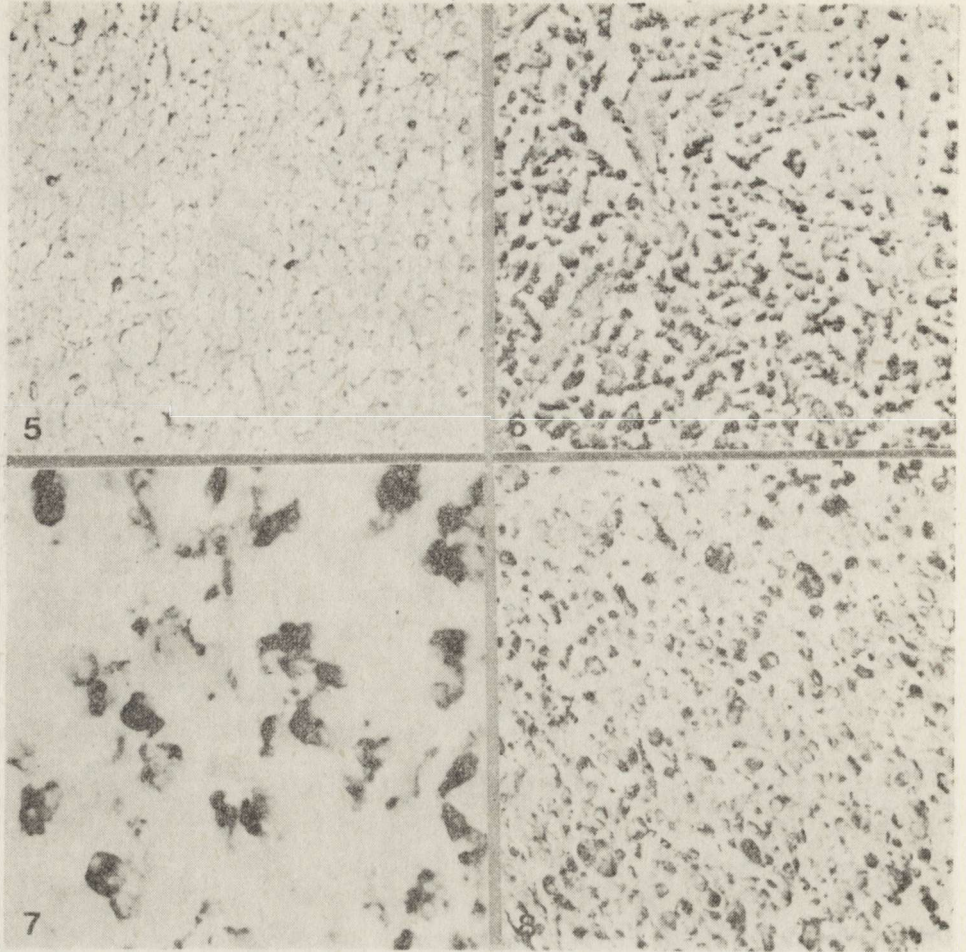


Fig. 5. White matter adjacent to isomorphic oligodendroglioma. Granules of positive immunostaining along remnants of myelin sheath and in cytoplasm of oligodendrocytes are seen. Reactive astrocytes with gemistocytic appearance remained unstained. Anti-MAG-PAP method. $\times 120$

Ryc. 5. Istota biała w otoczeniu izomorficznego skąpodrzewiaka. Ziarna odczynu immunomorfologicznego widoczne na pozostałościach osłonek mielinowych i w cytoplazmie oligodendrocytów. Odczynowe astrocyty z cechami gleju tłuszczowego nie wykazują odczynu. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. $120 \times$

Fig. 6. Anaplastic oligodendroglioma. Diffuse immunostaining of tumor cells. Anti-MAG-PAP method. $\times 120$

Ryc. 6. Anaplastyczny skąpodrzewiak. Dyfuzyjny odczyn immunomorfologiczny komórek guza. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. $120 \times$

Fig. 7. Anaplastic oligodendroglioma. Cytoplasm of all small, anaplastic cells is distinctly positive. Anti-MAG-PAP method. $\times 1000$

Ryc. 7. Anaplastyczny skąpodrzewiak. Wyraźny odczyn immunomorfologiczny w cytoplazmie drobnych, anaplastycznych komórek guza. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. $1000 \times$

Fig. 8. Anaplastic oligodendroglioma — polymorphous type. Small as well as giant cells staining positively. Anti-MAG-PAP method. $\times 160$

Ryc. 8. Anaplastyczny skąpodrzewiak, typu polimorficznego. Dodatni odczyn w drobnych i olbrzymich komórkach guza. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. $160 \times$

They showed features of microcellular tumor type with extreme endothelial cell proliferation and abundant necrotic zones. They were diagnosed as cases with signs of transition to glioblastoma. The typical vascular and cellular architecture of oligodendrogliomas was only occasionally observed at the periphery of the tumors.

MAG antiserum stained the cytoplasm of tumor cells of this group in a diffuse and more intense way as compared with the isomorphic tumors (Fig. 6). All tumor cells, both small anaplastic ones (Fig. 7) as well as two types of giant cells (Fig. 8) were evidently positive. Cell processes were not seen. Cellular nuclei and the vascular elements remained unstained. In the five cases, diagnosed as anaplastic oligodendroglioma with signs of transition to glioblastoma, only few foci of small anaplastic round cells were positive. Other cellular elements remained unstained with MAG antiserum (Fig. 9).

■ No reaction product was observed in the control neighbouring sections incubated with antiserum absorbed with purified MAG or when anti-MAG serum was omitted.

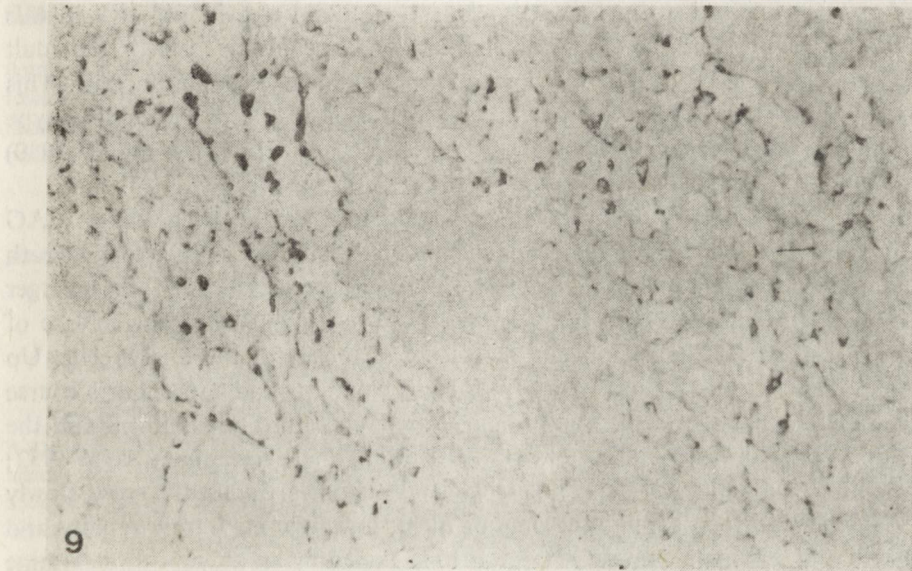


Fig. 9. Anaplastic oligodendroglioma with signs of transition to glioblastoma. Foci of small, round cells are positive. Anti-MAG-PAP method. $\times 120$

Ryc. 9. Anaplastyczny skąpodrzewiak z cechami przejścia w gąbczak wielopostaciowy. Dodatni odczyn immunomorfologiczny w gniazdach drobnych komórek nowotworu. Met. Anty-MAG-PAP. Pow. $120 \times$

DISCUSSION

Anti MAG serum used in this study was obtained in the same way as that described by Sternberger et al. (1979). Specificity of the serum was verified by immunodiffusion and immunoelectrophoresis tests. The antiserum was able to label the myelin

sheaths and embryonal oligodendroglial cells (Wajgt et al. 1985) in the peroxidase antiperoxidase method. In recent studies anti-MAG serum were applied to demonstrate the distribution of MAG in myelin sheaths in demyelinating diseases of the nervous system (Itoyama et al. 1980, 1982; Schober et al. 1981; Vandeveldel et al. 1983). Sternberger et al. (1979) used this immunomorphological method for cell identification and for demonstration and quantitation of MAG in developing oligodendroglial cells prior to myelin sheath formation. Bologna et al. (1983) and Zurbriggen and Vandeveldel (1983) successfully identified embryonal oligodendrocytes with anti-MAG serum in brain cell cultures.

In this presentation the method was used for the first time to identify tumor cells in oligodendrogliomas. The intensity of tumor cell immunostaining with anti-MAG serum in isomorphic and anaplastic oligodendrogliomas seems to be helpful for identification of oligodendrogliomas among other gliomas or tumors of the central nervous system which remain unclassified in routine staining procedures. Since the mature oligodendroglial cells as well as the reactive oligodendrocytes in multiple sclerosis foci (Itoyama et al. 1980), in metachromatic leukodystrophy (Itoyama et al. 1982) and in canine distemper (Vandeveldel et al. 1983) remain negative in this immunostaining, it seems greatly probable that the MAG-positive cells in the adult brain adjacent to the oligodendrogliomas represent in fact neoplastic cells. This study supports also the view that multinucleated cells in the polymorphous type of anaplastic oligodendroglioma (Zülch 1964; Zülch 1979; Szymaś et al. 1980) are of oligodendroglial origin because of their MAG-positivity.

The method seems to be helpful also in oligodendrogliomas grading. MAG appears during the maturation of oligodendroglial cells prior to myelin sheath formation and is absent in mature oligodendroglia (Itoyama et al. 1980; Sternberger et al. 1979). In the same, but inverted way, we have demonstrated an increase of anti-MAG serum immunostaining in increasing anaplasia of the tumor cells. Up till now, no correlation between the histological pattern and the clinical course of the tumor could be noted. The prognostic references are not uniform and the morphological criteria are uncertain (Earnest et al. 1950; Kernohan, Sayre 1952; Wisławski 1970; Smith et al. 1983). Oligodendrogliomas frequently grow slowly and may undergo long evolution, some of them, however, may grow rapidly and behave in a highly malignant way. Little help is gained by an attempt to determine the degree of tumor cell maturity in HE-stained or silver carbonate-impregnated sections (Rubinstein 1972). The cell density, mitotic figures and vascular proliferation are not necessarily paralleled by an increase in anaplastic features of the tumor cells.

Morphological criteria of tumor malignancy are evident in anaplastic oligodendrogliomas with signs of transition to glioblastoma. The tumors are characterized by rapid acceleration of growth accompanied by increased anaplasia and terminal pattern indistinguishable from that of glioblastoma multiforme (Barnard 1968). The pattern of the immunoreaction product with anti-MAG serum was in this group also more distinct than that usually noted in anaplastic oligodendrogliomas. Distinguishable oligodendroglial cells were present only focally. In many such tumors

obvious components of astrocytic elements were present (Szymaś, in preparation).

Summing up, we can conclude that:

- oligodendroglioma cells produce MAG;
- the content of MAG increases parallelly to the degree of tumor cell anaplasia;
- immunohistochemical staining seems useful for histological diagnosis of oligodendrogliomas and determination of their grading;
- since the mature oligodendroglial cells do not stain with anti-MAG serum and reactive oligodendroglial cells have not been demonstrated up till now, the method seems to offer a selective reaction for demonstration of neoplastic oligodendroglial cells in adult brain.

GŁÓWNA GLIKOPROTEINA ZWIĄZANA Z MIELINĄ (MAG) W SKĄPODRZEWIAKACH. BADANIE IMMUNOHISTOCHEMICZNE

Streszczenie

Zbadano 45 ludzkich skąpodrzewiaków na obecność głównej glikoproteiny związanej z mieliną (MAG), jako specyficznego markera tych guzów.

Przeprowadzone badanie immunohistochemiczne wykazało, że komórki guza tak w izomorficznych, jak i anaplastycznych skąpodrzewiakach produkują MAG. Zawartość MAG wzrasta równoległe do stopnia anaplazji komórek nowotworowych. Ponieważ dojrzałe i odczynowe oligodendrocyty nie barwią się surowicą przeciwko MAG wydaje się, że metoda ta stanowi wybiórczy odczyn dla wykazania nowotworowych komórek oligodendrogleju w mózgu dorosłego osobnika.

ГЛАВНЫЙ ГЛЮКОПРОТЕИН СВЯЗАННЫЙ С МИЕЛИНОМ (MAG) В ОЛИГОДЕНДРОГЛИОМАХ. ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Резюме

Исследовано 45 человеческих олигодендроглиом с целью обнаружения главного глюкопротеина связанного с миелином (MAG), как специфического маркера этих опухолей.

Проведенное иммуногистохимическое исследование показало, что клетки опухоли как в изоморфических так и в анапластических олигодендроглиомах производят MAG. Содержание MAG возрастает параллельно со степенью анаплазии опухолевых клеток. Так как зрелые и реактивные олигодендроциты не окрашиваются сывороткой против MAG, кажется, что этот метод является селективной реакцией для проявления опухолевых клеток олигодендроглии в мозгу взрослого индивида.

REFERENCES

1. Barnard R. O.: The development of malignancy in oligodendrogliomas. *J. Path. Bact.*, 1968, 96, 113—123.
2. Bologa L., Bisconte J.-C., Joubert R., Margules S., Herschkowitz N.: Proliferative activity and characteristics of immunocytochemically identified oligodendrocytes in embryonic mouse brain cell cultures. *Exp. Brain Res.*, 1983, 50, 84—90.
3. Earnest III F., Kernohan J. W., Craig W. McK.: Oligodendrogliomas. A review of 200 cases. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1950, 63, 964—976.
4. Itoyama Y., Sternberger N. H., Webster H. F., Quarles R. H., Cohen S. R., Richardson E. P.: Immunohistochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin protein in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.*, 1980, 7, 167—177.

5. Itoyama Y., Webster H. F., Sternberger N. H., Richardson E. P., Walker D. L., Quarles R. H., Padgett B. L.: Distribution of papovavirus, myelin-associated glycoprotein, and myelin basic protein in progressive multifocal leukoencephalopathy lesions. *Ann. Neurol.*, 1982, 11, 396–407.
6. Kernohan J. W., Sayre G. P.: *Tumors of the Central Nervous System. Atlas of Tumor Pathology.* Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, 1952.
7. Matthieu J. M., Quarles R. H., Poduslo J. F., Brandy R. O., Weber H. F.: Variation of proteins, enzyme markers and gangliosides in myelin subfractions. *Biochem. Biophys. Acta*, 1973, 329, 305–317.
8. Quarles R. H.: Glycoproteins in the nervous system. In: *The Nervous System.* Eds: D. B. Tower, R. O. Brady. Raven Press, New York, 1975, 1, 493–500.
9. Quarles R. H., Everly J. L., Brady R. O.: Demonstration of a glycoprotein which is associated with a purified fraction from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 47, 491–497.
10. Rubinstein L. J.: *Tumors of the Central Nervous System. Atlas of Tumor Pathology. Second Series.* Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C., 1972.
11. Schober R., Itoyama Y., Sternberger N. H., Trapp B. D., Richardson E. P., Asbury A. K., Quarles R. H., Webster H. F.: Immunocytochemical study of P₀ glycoprotein, P₁ and P₂ basic proteins, and myelin-associated glycoprotein (MAG) in lesions of idiopathic polyneuritis. *Neuropath. Appl. Neurobiol.*, 1981, 7, 421–434.
12. Singh G., Whiteside T. L., Dekker A.: Immunodiagnostic mesothelioma. Use of antimesothelial serum in an indirect immunofluorescent assay. *Cancer*, 1979, 43, 2288–2296.
13. Smith M. T., Ludwig C. L., Godfrey A. D., Armbrustmacher V. W.: Grading of oligodendrogliomas. *Cancer*, 1983, 52, 2107–2114.
14. Sternberger L. A.: *Immunocytochemistry*, 2nd ed. Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, 1979, 122–129.
15. Sternberger N. H., Itoyama Y., Kies M. W., Webster H. F.: Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, 75, 2521–2524.
16. Sternberger N. H., Quarles R. H., Itoyama Y., Webster H. F.: Myelin-associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, 76, 1510–1514.
17. Szymaś J., Gabryel P., Biczysko W.: Isomorphous and anaplastic (polymorphous) oligodendroglioma. *Neurosurg. Rev.*, 1980, 3, 227–231.
18. Wajgt A., Górny M. K., Szymaś J.: Izolacja i immunogenność głównej glikoproteiny (MAG) mieliny mózgu ludzkiego. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 229–238.
19. Wisławski J.: Cerebral oligodendrogliomas: Clinical manifestations, surgical treatment, and histological findings in 70 cases. *Pol. Med. J.*, 1970, 9, 163–172.
20. Vandeveld M., Bichsel P., Cerruti-Sola S., Steck A., Kristensen F., Higgins R. J.: Glial proteins in canine distemper virus-induced demyelination. *Acta Neuropathol.*, 1983, 59, 269–276.
21. Zülch K. J.: On the definition of the polymorphous oligodendroglioma. *Acta Neurochir. (Wien)*, 1964, Suppl. X, 166–172.
22. Zülch K. J.: *Histochemical Typing of Tumours of the Central Nervous System. International Histological Classification of Tumours.* WHO. Geneva, 1979.
23. Zurbriggen A., Vandeveld M.: Canine distemper virus-induced glial cell changes *in vitro*. *Acta Neuropathol.*, 1983, 62, 51–58.

Authors' address: Department of Pathology, Medical School, 49 Przybyszewskiego str., 60-355 Poznań

MIROSLAW RYBA, ANDRZEJ KUKWA¹, WIKTOR JANCZEWSKI

CARDIOVASCULAR RESPONSE TO GREATER PETROSAL NERVE SECTION AS METHOD OF PREVENTION OF EXPERIMENTAL CEREBRAL VASOSPASM IN SUBARACHNOID HEMORRHAGE

Department of Neurophysiology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw
Department of Otolaryngology, Medical School, Warsaw¹

The management of patients with ruptured intracranial aneurysms is complicated by an apparently irreducible and unmanageable morbidity and mortality that can be traced directly to cerebral vasoconstriction and infarction (Stornelli, French 1964). It has been demonstrated that topical application of fresh blood to the subarachnoid space induced vasospasm in the dogs (Echlin 1965; Allcock 1966; Brawley et al. 1968; Arutiunov et al. 1970; Wilkins, Levitt 1970; Kuwayama et al. 1972) and monkeys (Chow et al. 1968; Landau, Ransohoff 1968; Simeone et al. 1968; Fraser et al. 1970; Weir et al. 1970; Rosoff et al. 1971). The pathogenesis of intracranial arterial spasm is not well understood, and no satisfactory treatment has yet been devised to combat its adverse effects (Echlin 1968; Wilkins et al. 1968; Gurdjian, Thomas 1969). Several known vasodilators that appear to relieve experimentally produced vasospasm, have been ineffective when used clinically (Sundt et al. 1982; Varsos et al. 1983). Indications that the cholinergic innervation of the cerebral blood vessels arises from the 7th nerve (Choróbski, Penfield 1932) suggested, that its interruption might change the blood flow. The intention of the authors was, therefore, to check whether cutting of the greater superficial petrosal nerve would prevent the vascular spasm following subarachnoid hemorrhage.

MATERIALS AND METHODS

Surgical Procedure and Anesthesia

A male green monkey (weight 28 kg) and a male mongrel dog (weight 12 kg) were prepared as follows: the left greater petrosal nerve was extradurally exposed near the *hiatus nervi petrosi majoris* via middle cranial fossa approach. Left common carotid artery was exposed and internal carotid artery cerebral inflow (ICAF) was recorded after occlusion of the external carotid artery (Langfitt, Kasell 1968; Hernandez et al. 1971–1972; Raichle, Stone 1971–1972; Hernandez-Pérez et al.

1975) (by Sonpan Doppler ultrasonic flowmeter, UDP-10). Mechanical ventilation (Medipan respirator) was adjusted to give a fractional end-tidal CO_2 tension — F_{ETCO_2} between 4 and 5%, as monitored by an infrared analyzer (Godart). Arterial blood pressure — AP (by Statham P23Db transducer) and ECG were continuously monitored and recorded (Honeywall 4408 A). Rectal temperature was controlled between 37° and 38°C. Arterial PO_2 , PCO_2 and pH were analyzed (Corning 175). Experimental vasospasm was then induced either by application for 3 minutes of 4 ml of fresh autologous arterial blood obtained from femoral artery to the *cisterna magna* via transcutaneous needle puncture. Spasm produced by the application of blood (as model subarachnoid hemorrhage — SAH) persisted for about 20 minutes (Flamm et al. 1972). The animals were induced with ketamine 10 mg/kg i.m. During the experiment anesthesia was maintained by a ventilation mixture of 70% N_2O and 30% O_2 . The animals were immobilised by adequate i.v. d-tubocurarine injection.

Experimental Protocol

In the dog subarachnoid injections of blood were followed by cutting the left greater petrosal nerve. The time lapse between SAH and neurotomy did not exceed 12 min. In the monkey petrosal neurotomy was performed first and after 15 min subarachnoid injection of blood was done, followed by registration of physiologic parameters 12 min later.

RESULTS

The results are presented in figures 1 to 5.

DISCUSSION

In the present experiments injection of blood into the subarachnoid space (SAH) in dog caused a decrease in blood flow in the left internal carotid artery as the result of contraction of the brain arterial vessels (Simeone et al. 1968) (Fig. 1). This effect could be reversed to a great extent by ipsilateral section of the greater petrosal nerve (Fig. 2). Such a reaction may only occur via the reflex-nervous pathway since arterial blood gasometry showed no changes. The neural control of the arterial lumen in the brain is a fact long suggested by various authors. It is assumed that the cause of enhanced flow in the carotid artery is not the observed increase of arterial blood pressure (Forbes, Wolf 1928; Choróbski, Penfield 1932; Cobb, Finesinger 1932). It is also noteworthy that the increased flow rate occurred 18 sec after petroslectomy. A similar latency time of the enhanced flow, upon stimulation of the geniculate ganglion of the facial nerve, has been reported by Forbes et al. (1937), whereas latency of about 10 sec after stimulation of the ciliary ganglion is mentioned by Kameyama et al. (1982). Thus, since the existence of a receptor mechanism responsible for the vessel contraction in the course of SAH and an efferent pathway connected with the greater petrosal nerve fibres were suspected, this nerve was tran-

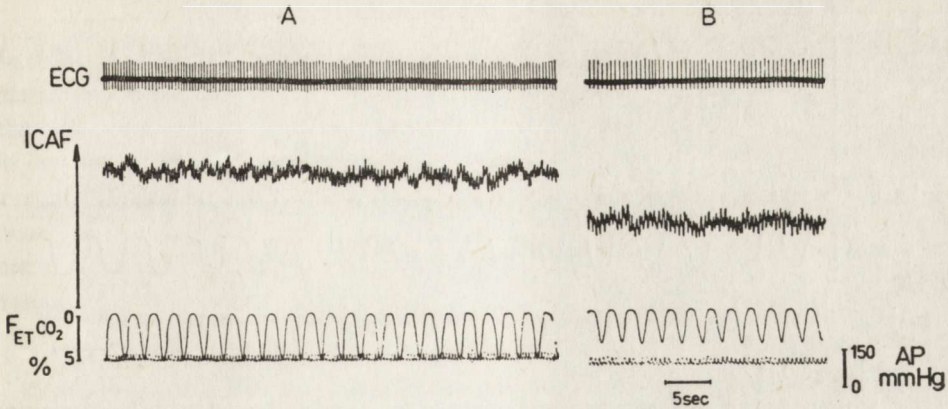


Fig. 1. Dog ♂. ECG — electrocardiogram; ICAF — internal carotid artery flow; $F_{ET}CO_2$ — fractional CO_2 tension in expiratory air; AP — arterial blood pressure. A: intact conditions; B: after blood injection into subarachnoid space (SAH). Arterial gas parameters: A — pH 7.30; PCO_2 40.0 mmHg; $[HCO_3^-]$ 19.0 mmol/l; PO_2 194 mmHg. B — pH 7.30; PCO_2 41.00 mmHg; $[HCO_3^-]$ 19.8 mmol/l; PO_2 172 mmHg

Ryc. 1. Pies ♂. ECG — elektrokardiogram; ICAF — przepływ krwi w tętnicy szyjnej wewnętrznej; $F_{ET}CO_2$ — końcowo-wydechowa zawartość dwutlenku węgla; AP — ciśnienie tętnicze krwi. A: warunki kontrolne; B: stan po wstrzyknięciu krwi do przestrzeni podpajęczynówkowej (SAH). Parametry równowagi kwasowo-zasadowej krwi tętniczej: A — pH 7.30; PCO_2 40.0 mmHg; $[HCO_3^-]$ 19.0 mmol/l; PO_2 194 mmHg. B — pH 7.30; PCO_2 41.0 mmHg; $[HCO_3^-]$ 19.0 mmol/l; PO_2 172 mmHg

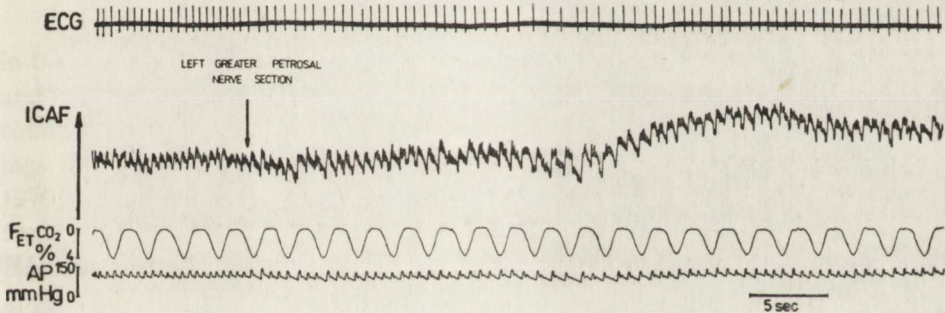


Fig. 2. Dog ♂. Before and after left greater petrosal nerve section. Arterial gas parameters: pH 7.40; PCO_2 36.0 mmHg; $[HCO_3^-]$ 22.0 mmol/l; PO_2 189.0 mmHg. See legend to Fig. 1

Ryc. 2. Pies ♂. Stan przed i po przecięciu lewego nerwu skalistego większego. Parametry równowagi kwasowo-zasadowej krwi tętniczej: pH 7.40; PCO_2 36.0 mmHg; $[HCO_3^-]$ 22.0 mmol/l; PO_2 189.0 mmHg. Patrz opis do Ryc. 1

sected in a monkey. This treatment caused a slight increase of the blood flow rate in the left internal carotid artery (Fig. 3). It was accompanied by a time-correlated rise of arterial blood pressure. The latency between nerve section and the observed increased flow rate was about 10 sec. The observation seems interesting in that later injection of blood into the subarachnoid space (SAH) did not produce any changes in the recorded parameters (Fig. 4).

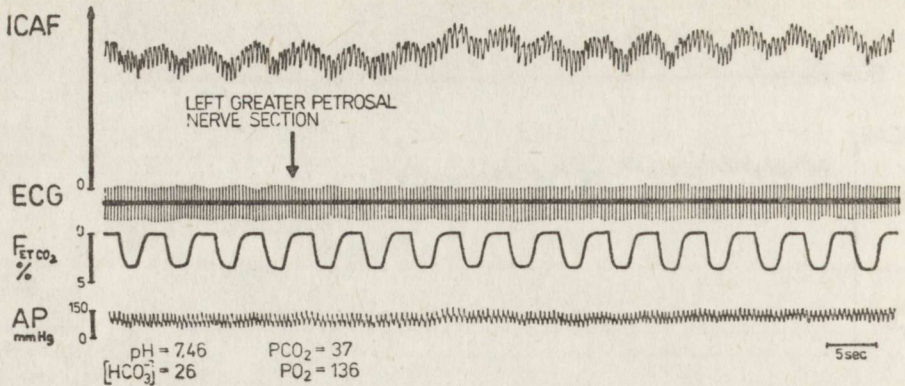


Fig. 3. Monkey ♂. Before and after left greater petrosal nerve section. Animal before blood injection into subarachnoid space (SAH). See legend to Fig. 1

Ryc. 3. Małpa ♂. Stan przed i po przecięciu lewego nerwu skalistego większego. Zwierzę przed wstrzyknięciem krwi do przestrzeni podpajęczynówkowej (SAH). Patrz opis do Ryc. 1

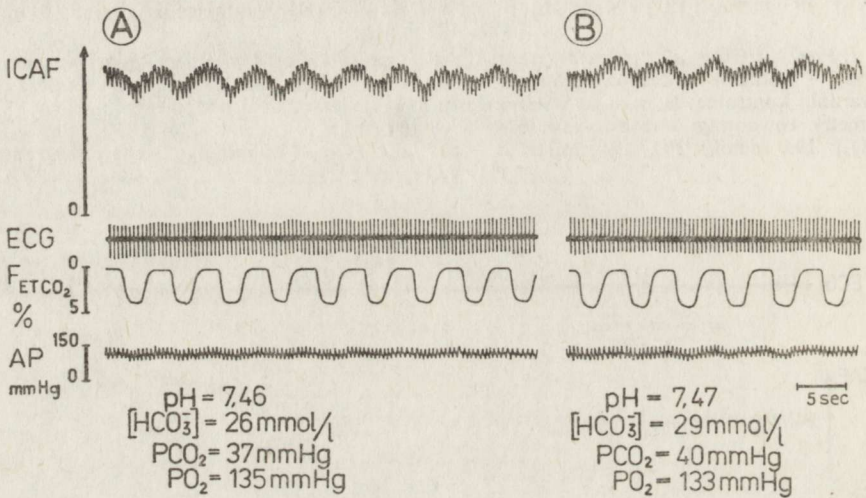


Fig. 4. Monkey ♂. A: animals after left petrosalotomy; B: after subarachnoid hemorrhage (SAH). See legend to Fig. 1

Ryc. 4. Małpa ♂. A: zwierzę po lewostronnej petrosalektomii; B: po krwawieniu podpajęczynówkowym (SAH). Patrz opis do Ryc. 1

Two different species of animals were used for the experiments, assuming that the relative participation of the adrenergic system in regulation of cerebral blood flow is different in them (Heistad et al. 1978). In the available literature no data could be found on differences in the influence of the cholinergic system on the regulation of the cerebral artery lumen in these animal species. Petrosalotomy is an element of parasympathetic denervation of the arteries of the brain base (Kameyama et al. 1982). The coincidence of the reaction observed in dog and monkey in response to petrosalotomy and the differences appearing, in dependence on blood injection into the subarachnoid space are rather connected with the cholinergic mechanism determining cerebral blood flow in SAH states.

Changes in heart rate connected with petroslectomy should also be mentioned. In both cases the heart rate decreased by about 15%, bradycardia occurring immediately after petroslectomy. A similar phenomenon in response to stimulation of the ciliary plexus has been observed, accompanied also by an increased flow rate in cerebral arteries (Kameyama et al. 1982). This has not been described, so far and we are not able on the basis of the available material to elucidate this mechanism. It seems probable that a reflex mechanism is propagated by way of vagus nerves (*n. depressor cordis*) since left side vagotomy raises the heart rate to control values (Fig. 5).

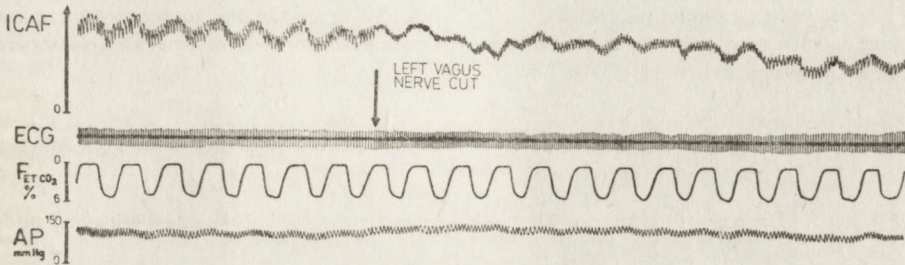


Fig. 5. Monkey ♂. Before and after left vagal nerve section: pH 7.34; PCO_2 41.0 mmHg; $[\text{HCO}_3^-]$ 22.0 mmol/l; PO_2 136.0 mmHg. See legend to Fig. 1

Ryc. 5. Małpa ♂. Zwierzę przed i po przecięciu lewego nerwu błędnego: pH 7.34; PCO_2 41.0 mmHg; $[\text{HCO}_3^-]$ 22.0 mmol/l; PO_2 136.0 mmHg. Patrz opis do Ryc. 1

To sum up, the authors believe that there exists a receptor activated by blood in the subarachnoid space (SAH), strictly bound with the nuclei of the facial nerve and that the impulses causing contraction of the large vessels of the brain base are conducted by cholinergic fibres along the greater petrosal nerve and have their endings in the muscles of the vessels (Edvinsson et al. 1972; Borodulya, Pletchkova 1973; Vasquez, Purves 1979). It is also suggested that an indirect influence of the facial nerve on heart activity is also probable, owing to cholinergic junctions with the vagus nerve. The afferent pathway of these reflexes would be the cholinergic fibres of the vagus running through the *nervus depressor cordis* to the heart.

ODPOWIEDŹ SERCOWO NACZYNIOWA NA PRZECIĘCIE NERWU SKALISTEGO WIĘKSZEGO JAKO METODY ZAPOBIEGANIA DOŚWIADCZALNEMU SKURCZOWI NACZYŃ KRWIONOŚNYCH W KRWAWIENIU PODPAJĘCZYNÓWKOWYM

Streszczenie

W prezentowanej pracy badano przepływ krwi w tętnicy szyjnej wewnętrznej (ICAF) po ipsilateralnym przecięciu nerwu skalistego większego u psa i małpy. Różnice w zakresie mierzonych parametrów były obserwowane po wstrzyknięciu krwi do przestrzeni podpajęczynówkowej (SAH) przed i po wykonanej petrosalektomii. Uzyskane wyniki wskazują, że przecięcie nerwu skalistego większego zapobiega skurczowi naczyń tętniczych mózgu mierzonemu jako zmiany w ICAF.

W pracy tej autorzy dyskutują też mechanizm bradykardii po wykonanej uprzednio petrosalektomii, niezależny od wykonania doświadczalnego krwawienia podpajęczynówkowego (SAH).

СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЙ ОТВЕТ НА ПЕРЕРЕЗКУ БОЛЬШОГО КАМЕНИСТОГО НЕРВА КАК МЕТОДА ПРЕДОХРАНЕНИЯ ОТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СПАЗМА КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В СУБАРАХНОИДАЛЬНОМ КРОВОТЕЧЕНИИ

Резюме

В статье исследовано кровотоки во внутренней сонной артерии (ICAF) после ипсилатеральной перерезки большого каменистого нерва у собаки и обезьяны. Разницы в области измеряемых параметров наблюдались после инъекции крови в субарахноидальное пространство (SAH) до и после произведенной петросалэктомии. Полученные результаты указывают, что перерезка большого каменистого нерва предохраняет от спазма артериальных сосудов мозга измеряемого как изменения в ICAF.

В этой статье авторы обсуждают также механизм брадикардии после произведенной раньше петросалэктомии, независимый от экспериментального произведения субарахноидального кровотечения (SAH).

REFERENCES

1. Allcock J. M.: Arterial spasm in subarachnoid hemorrhage: A clinical and experimental study. *Acta Radiol.*, 1966, 5, 73—83.
2. Arutiunov A. I., Baron M. A., Majorova N. A.: Experimental and clinical study of the development of spasm of the cerebral arteries related to subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 1970, 32, 617—625.
3. Borodulya A. V., Pletchkova E. K.: Distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the internal carotid artery. A histochemical study. *Acta Anat.*, 1973, 86, 410—425.
4. Brawley B. W., Strandness D. E., Jr., Kelly W. A.: The biphasic response of cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 1968, 28, 1—8.
5. Choróbski J., Penfield W.: Cerebral vasodilators nerves and their pathway from the medulla oblongate with observations on the pial and intracerebral vascular plexus. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1932, 28, 1257—1289.
6. Chow R. W. B., Newton T. H., Smith M. C., Adams J. E.: Cerebral vasospasm induced by subarachnoid blood and serotonin: An angiographic study. *Invest. Radiol.*, 1968, 3, 402—407.
7. Cobb S., Finesinger J. E.: Cerebral circulation. XIX. The vagal pathway of the vasodilator impulses. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1932, 28, 1243—1256.
8. Echlin F. A.: Spasm of basilar and vertebral arteries caused by experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.*, 1965, 23, 1—11.
9. Echlin F. A.: Current concepts in the etiology and treatment of vasospasm. *Clin. Neurosurg.*, 1968, 15, 133—159.
10. Edvinsson L., Nielsen K. C., Owman Ch., Spurrong B.: Cholinergic mechanism in pial vessels. Histochemistry, electron microscopy and pharmacology. *Z. Zellforsch.*, 1972, 134, 311—325.
11. Flamm E. S., Yasargil M. G., Ransohoff J.: Alteration of experimental cerebral vasospasm by adrenergic blockade. *J. Neurosurg.*, 1972, 37, 294—301.
12. Forbes H. S., Wolff H. G.: Cerebral circulation. III. The vasomotor control of cerebral vessels. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1928, 19, 1057—1086.
13. Forbes H. S., Nason G. I., Cobb S., Wortman R. C.: Cerebral circulation. XLV. Vasodilatation in the pia following stimulation of the geniculate ganglion. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1937, 37, 776—781.
14. Fraser R. A. R., Stein B. M., Barrett R. E. et al.: Noradrenergic mediation of experimental cerebrovascular spasm. *Stroke*, 1970, 1, 356—362.
15. Gurdjian E. S., Thomas L. M.: Cerebral vasospasm. *Surgery Gynec. Obstet.*, 1969, 129, 931—948.

16. Heistad D. D., Marcus H. L., Gross P. M.: Effects of sympathetic nerves on cerebral vessels in dog, cat and monkey. *Am. J. Physiol.*, 1978, 235, H 544-H 552.
17. Hernander M. J., Raichle M. E., Stone H. L.: The role of the sympathetic nervous system in cerebral blood flow autoregulation. *Europ. Neurol.*, 1971–1972, 6, 175–179.
18. Hernandez-Pérez M. J., Erickson H. H., Fitzpatrick E. L.: Autonomic control blood flow and autoregulation. In: *Cerebral Circulation and Metabolism*. Eds. T. W. Langfitt, L. C. McMeury, M. Reivich, H. Wollman. Springer-Verlag New York; Heidelberg. Berlin, 1975, 462–465.
19. Kameyama S., Ishii R., Kobayashi K.: Cholinergic innervation of the cerebral blood vessels in the dog and the effect of electrical stimulation of ciliary ganglion. In: *Cerebral Blood Flow. Effects of Nerves and Neurotransmitters*. Eds. D. D. Heistad, M. L. Marcus, North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford, 1982, 14, 447–453.
20. Kuwayama A., Zervas N. Z., Belson R., et al.: A model for experimental cerebral arterial spasm. *Stroke*, 1972, 3, 49–56.
21. Landau B., Ransohoff J.: Prolonged cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurology*, 1968, 18, 1056–1065.
22. Langfitt T. W., Kasell N. F.: Cerebral vasodilatation produced by brain stem stimulation: neurogenic control vs. autoregulation. *Am. J. Physiol.*, 1968, 215, 90–97.
23. Raichle M. E., Stone H. L.: Cerebral blood flow autoregulation and graded hypercapnia. *Europ. Neurol.*, 1971–1972, 6, 1–5.
24. Rosoff C. B., Salzman E. W., Gürewich U.: Reduction of platelet serotonin and the response to pulmonary emboli. *Surgery*, 1971, 70, 12–19.
25. Simeone F. A., Ryan K. G., Cotter J. R.: Prolonged experimental cerebral vasospasm. *J. Neurosurg.*, 1968, 29, 357–366.
26. Stornelli, S. A., French J. D.: Subarachnoid hemorrhage-factors in prognosis an management. *J. Neurosurg.*, 1964, 21, 769–780.
27. Sundt T. M. Jr., Kobayashi S., Fode N. C., Whisnant, J. P.: Results and complications of surgical management of 806 intracranial aneurysms in 722 cases. Related and unrelated to grade of patient type of aneurysm, and timing of surgery. *J. Neurosurg.*, 1982, 56, 753–765.
28. Weir B., Erasmo R., Miller J. et al.: Vasospasm in response to repeated subarachnoid hemorrhages in the monkey. *J. Neurosurg.*, 1970, 33, 395–406.
29. Wilkins R. H., Alexander J. A., Odom G. L.: Intracranial arterial spasm: a clinical analysis. *J. Neurosurg.*, 1968, 29, 121–134.
30. Wilkins R. H., Levitt P.: Intracranial arterial spasm in the dog: A chronic experimental model. *J. Neurosurg.*, 1970, 33, 260–269.
31. Varsos V. G., Liszczak T. M., Han D. H., Kistler J. P., Vielma J., Black P. M., Heros R. C., Zervas N. T.: Delayed cerebral vasospasm is not reversible by aminophylline, nifedipine or papaverine in a “two-hemorrhage” canine model. *J. Neurosurg.*, 1983, 58, 11–17.
32. Vasquez J., Purves M. J.: The cholinergic pathway to cerebral blood vessels. I. Morphological studies. *Pflügers Arch.*, 1979, 379, 157–163.

Author's address: Mirosław Ryba, M. D., Department of Neurophysiology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Dworkowa 3, 00-784 Warsaw, Poland

XIIth INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE FULTON SOCIETY
"BRAIN MECHANISMS OF FUNCTION"

Chairman

Victor Soriano — Montevideo — Uruguay

September 4, 1985

HAMBURG

Program

- 8³⁰ — Victor Soriano (Uruguay): "Modern approach to the study of brain mechanisms of emotion".
- 8⁵⁵ — Robert G. Heath (U.S.A.): "Neural substrate for emotion relating feelings, sensory perception and memory". Discussers: A. W. Epstein (U.S.A.) and F. R. Ervin (Canada).
- 9²⁰ — Arthur W. Epstein (U.S.A.): "Observations on complex behavioural chains in limbic seizures and dreamsseizures equivalents". Discussers: J. R. Stevens and R. G. Heath (U.S.A.).
- 9⁴⁵ — Robert Adamec, Annie Stark-Adamec (Canada): "Limbic traces and interictal behaviour-basic science and clinical approaches". Discussers: Janice R. Stevens (U.S.A.) and Frank R. Ervin (Canada).
- 10¹⁰ — Makram Girgis (Australia): "Emotional disturbances in limbic system dysfunction". Discusser: J. Stevens (U.S.A.).
- 10³⁵ — A. R. M. Upton (Canada), I. S. Cooper (U.S.A.): "Suppression of seizures and psychosis of limbic system origin by chronic stimulation of anterior nucleus of the thalamus". Discussers: Robert G. Heath and Janice R. Stevens (U.S.A.).
- 11⁰⁰ — Yasumasa Arai (Japan): "Sexually dimorphic synaptic patterns in the hypothalamic brain". Discussers: Donald W. Pfaff (U.S.A.) and K. D. Döhler (Germany).
- 11²⁵ — Donald W. Pfaff, Susan Schwartz-Giblin (U.S.A.): "Hypothalamic output controlling reticulospinal and vestibulospinal systems important for emotional behaviours". Discussers: Bengt Myerson (Sweden) and Yasumasa Arai (Japan).
- 11⁵⁰ — Jerome Engel (U.S.A.): "Modification of emotional expression induced by clinical and experimental epileptic disturbances". Discussers: Richard Bandler (Australia).
- 12¹⁵ — Michael R. Trimble (England): "The physiological link between epilepsy and psychosis". Discussers: Janice R. Stevens and Robert G. Heath (U.S.A.).
- 12⁴⁰ — Allan Siegel (U.S.A.): "Experimental induced seizure disturbances of the temporal lobe and aggressive behavior". Discussers: Jerome Engel and J. Pincus (U.S.A.).
- 14⁴⁰ — Frank Benson (U.S.A.): "Affective disorders in epilepsy". Discusser: Michael Trimble (England).
- 15⁰⁵ — John A. Wada (Canada): "Cerebral organization of affect suggested by temporal lobe seizures". Discusser: Janice Stevens (U.S.A.).
- 15³⁰ — Frank R. Ervin, Roberta Palmour (Canada): "Bio-social matrix of aggressive behavior: with primary attention to the brain mechanisms of this important emotional state". Discussers: J. R. Stevens and Robert G. Heath (U.S.A.).
- 15⁵⁵ — Barry L. Jacobs (U.S.A.): "The role of brain monoaminergic neurons in arousal and emotion". Discussers: Gary Aston-Jones and Stephen Foote (U.S.A.).
- 16²⁰ — Bengt Myerson, U. Hoglund (Sweden): "Neuropeptides, environmental and social approach behavior". Discussers: Donald W. Pfaff and Barry Jacobs (U.S.A.).
- 16⁴⁵ — Gary Aston-Jones (U.S.A.): "Spontaneous and sensory-evoked locus coeruleus discharges: Modulation by behavioral state". Discusser: Barry Jacobs.
- 17¹⁰ — Janice Stevens (U.S.A.), L. L. Levy (Africa): "Violence in brief reactive psychosis in Africa: Cultural and electrophysiological features".
- 17³⁵ — Roger M. Morrell (U.S.A.): "Brain mechanisms of emotion in the immune system".
- 18⁰⁰ — Stephen L. Foote (U.S.A.): "Anatomy and physiology of the locus coeruleus system in Primates: Implications of emotional states". Discussers: Gary Aston-Jones and Barry L. Jacobs (U.S.A.).

cont. on p. 264

MICHAŁ KRASZPULSKI, TERESA WRZOŁKOWA, PIOTR MIERZEWSKI

BLOOD—BRAIN EXCHANGE IN THE CAT AMYGDALOID BODY MORPHOMETRIC STUDIES*

Laboratory of Electron Microscopy, Medical School, Gdańsk

The exchange between blood and tissue is one of the fundamental factors influencing organ function. Many studies of this exchange within the central nervous system are undertaken with the use of different methods (Ingvar 1978; Amtorp 1980; Conradi 1980; Samuels, Schwartz 1981; Crone, Olesen 1982; Sokoloff 1982). One of these methods is the determination of the terminal vascularization density in a given tissue (Pfeifer 1940; Friede 1966; Wolff 1978; Bär 1980). The majority of stereological studies in the central nervous system were concerned with growing or ageing organisms or with analysis of the influence of various factors on the development and density of terminal vascularization (Eayrs 1954; Bär 1978; Hunziker et al. 1978; Ravens 1978).

Our previous work (Wrzołkova et al. 1984) established the existence of differences in the number of capillary vessel sections per square millimetre of tissue in the motor, limbic and visual cortex of the cat and rat. However, these results were not sufficient to conclude that the blood-tissue ratio is appropriately different. It is possible that the differing vascularization density of various areas of the brain might be compensated by an increased vessel circumference or by an increased vessel cross-sectional area per unit area of tissue section.

In order to determine the particular morphological patterns of the blood-brain exchange we determined the number of capillary vessel sections per square millimetre, the ratio of the circumferences of the vessels and their cross sectional area to the area of tissue and the mean surface area of a section of a single terminal vessel. These studies were performed on the amygdaloid body which is made up of multiple closely packed nuclei varying in structure, connections and functional properties (Koikegami 1963; Fonberg 1967; Narkiewicz et al. 1975, 1978).

MATERIAL AND METHODS

Studies were performed on material from 23 adult cats. The object of our studies were 96 sections taken from 5 nuclei of the amygdaloid body: medial, cortical,

* Supported by Polish Academy of Sciences, Grant 10.4.05.1.4.

central, basal and lateral. From each individual 1 to 10 specimens were studied, whereas from each nucleus we investigated 12 to 28 specimens (Fig. 1).

The cats were anaesthetised by Nembutal administered intraperitoneally (50 mg per 1 kg body weight). The brain was fixed by intracardial perfusion through the ascending aorta. Prior to fixation the vascular system was rinsed with 20 ml of physiological salt solution containing 0.5% Xylocaine at a temperature of 37°C. Next 4% formaldehyde in 0.05 M phosphate buffer of pH 7.4 with 8% sucrose (1500 ml volume, room temperature, pressure 40 mm Hg were administered). After perfusion the brains were removed and cut in the frontal plane into 1 mm slices. From these slices specimens were obtained from particular nuclei of the amygdaloid body using a bevelled needle of 0.6 mm inner diameter inserted at right angles to the plane of section. The specimens were postfixed in 2% OsO₄, dehydrated and embedded in Epon 812.

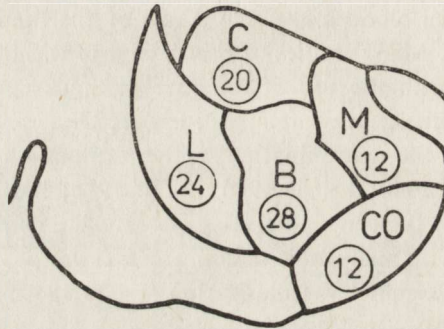


Fig. 1. Nuclei of amygdaloid body. Encircled is the number of specimens of a particular nucleus
M — medial, CO — cortical, C — central, B — basal, L — lateral.

Ryc. 1. Jądra ciała migdałowatego. W kółkach liczba wycinków z poszczególnych jąder. M — przyśrodkowe, CO — korowe, C — centralne, B — podstawne, L — boczne

The brain slices from which specimens had been obtained were embedded in paraffin and then stained with Nissl in order to check whether the specimens had been taken from the required areas, and to eliminate those taken incorrectly.

After selection, the specimens embedded in Epon were cut into semithin sections and stained with toluidine blue.

The sections were analysed with a projection microscope PICTOVAL (CARL ZEISS JENA) and a WANG 2200 VP minicomputer equipped with digitizer model 2262.

The computer calculated:

- the surface area of the entire section
- the total area of large vessels ($\varnothing > 12.5 \mu\text{m}$)
- the total area of small vessels ($\varnothing \leq 12.5 \mu\text{m}$)
- the sum of small vessel circumferences
- the area of the section excluding the area of large vessels (tissue area)
- the number of small vessels in the section
- the ratio of total small vessel area to tissue area

- the ratio of sum of small vessel circumferences to tissue area
- the number of small vessels per square millimetre of tissue
- the mean area of a single terminal vessel in the investigated section.

The results obtained were analysed by one-way ANOVA followed by multiple comparison procedures (Tukey, Newman-Keuls) with a significance level = 0.05; Tukey's procedure for all pairwise comparisons and Newman—Keuls for revealing grouping of means (Johnson, Leone 1977).

RESULTS

In the amygdaloid body samples the number of vessels per square millimetre varied between 109 and 314, with a mean value of 190 ± 45 . The mean values for the particular nuclei (Fig. 2a) ranged from 153 ± 27 (medial nucleus) to 214 ± 42 (lateral nucleus). The remaining nuclei had the following mean values: cortical nucleus — 164 ± 31 , central nucleus — 168 ± 34 , basal nucleus — 211 ± 41 .

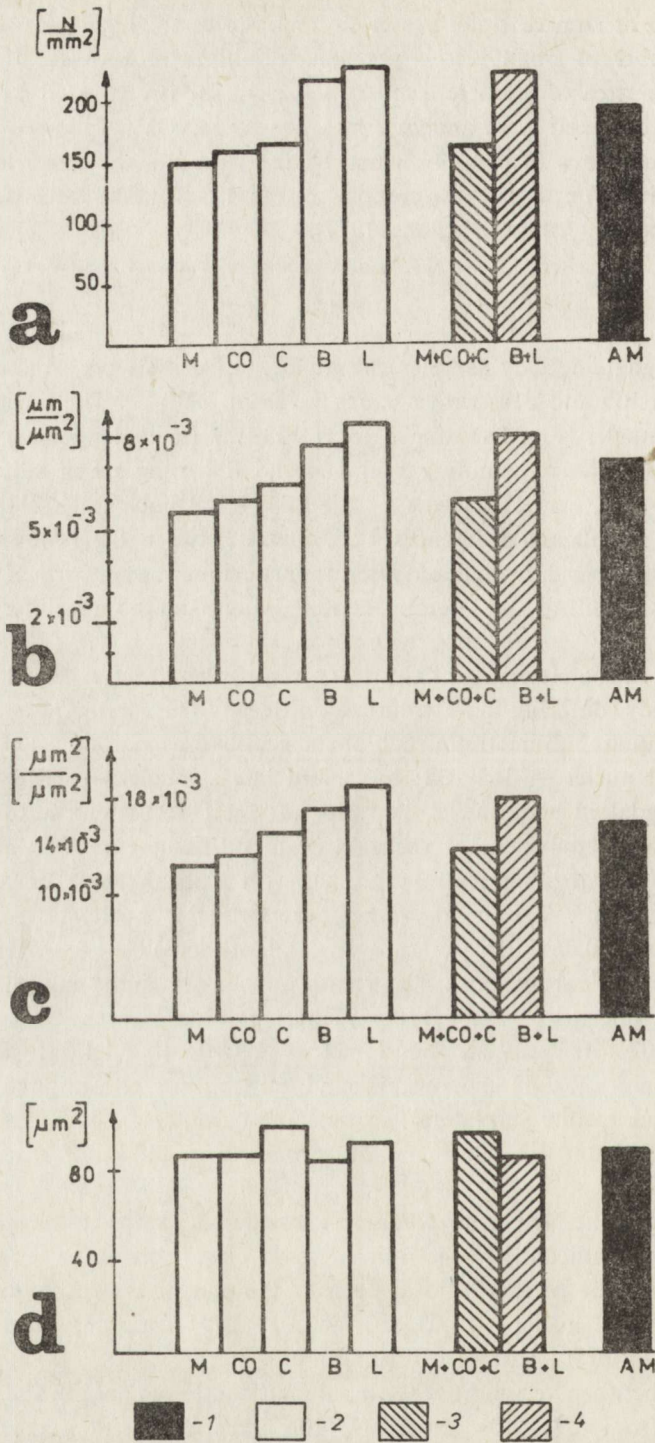
Statistically significant differences were found between the following pairs of nuclei: medial and basal, medial and lateral; cortical and basal, cortical and lateral; central and basal, central and lateral. The remaining pairs did not differ statistically (Fig. 4).

Application of the Newman—Keuls test revealed two groups of nuclei within the amygdaloid body, differing in vascularization density (Fig. 3a). The mean number of vessels per square millimetre in each of the groups was as follows: central, cortical and medial nuclei — 163 ± 32 ; basal and lateral nuclei — 212 ± 42 .

In the amygdaloid body nuclei the ratios of vessel circumference to tissue area, a two-dimensional equivalent of the area of blood-tissue exchange, ranged from $3.83 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ to $13.29 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$, with a mean value of $7.06 \times 10^{-3} \pm 1.65 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$. The mean values for particular nuclei (Fig. 2b) ranged from $5.71 \times 10^{-3} \pm 0.96 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ (medial nucleus) to $8.07 \times 10^{-3} \pm 1.77 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ (lateral nucleus). The values for the remaining nuclei were as follows: cortical nucleus — $6.06 \times 10^{-3} \pm 0.81 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$, central nucleus — $6.34 \times 10^{-3} \pm 1.07 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$, basal nucleus — $7.70 \times 10^{-3} \pm 1.52 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$. Statistically significant differences were found between the following pairs of nuclei: medial and basal, medial and lateral; cortical and basal, cortical and lateral; central and basal, central and lateral. In no other pairs were such differences found to exist (Fig. 4).

Application of the Newman—Keuls test revealed 2 groups of amygdaloid body nuclei, differing significantly in the ratio of vessel circumference to tissue area (Fig. 3b). The mean value of this ratio in each of the groups was as follows: medial, cortical and central nuclei — $6.09 \times 10^{-3} \pm 1.01 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$; basal and lateral nuclei — $7.87 \times 10^{-3} \pm 1.65 \times 10^{-3} \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$.

The ratios between vessel cross sectional area and tissue area in the amygdaloid body ranged from 6.91×10^{-3} to $31.09 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$, with a mean value of $15.77 \times 10^{-3} \pm 4.19 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. The mean values for the particular nuclei (Fig. 2c) varied between $12.45 \times 10^{-3} \pm 2.68 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ (medial nucleus) to



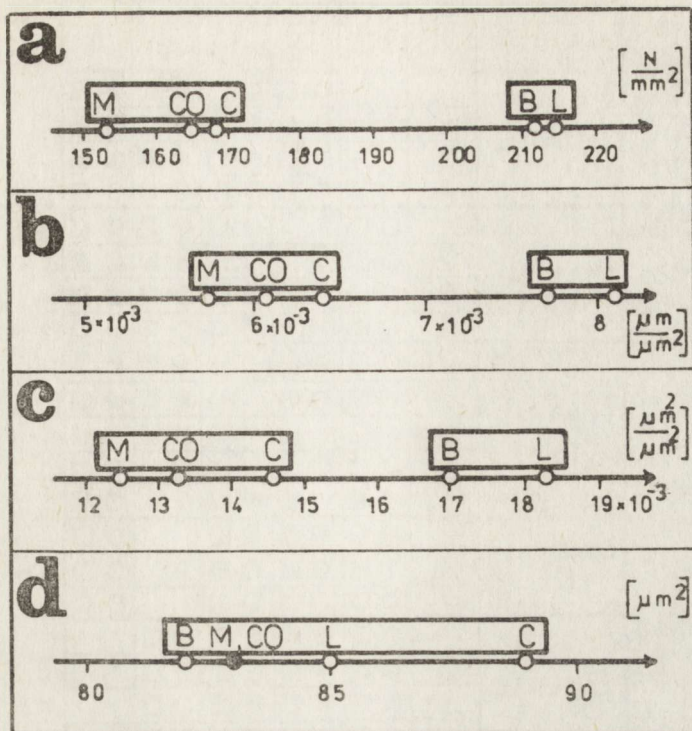


Fig. 3. Means for each of the nuclei arranged in increasing order. Each box groups together means which did not differ significantly according to the Newman-Keuls test. However, significant differences did exist between means taken from different boxes. a — vascularization density, b — ratio of circumference of vessels to tissue area, c — ratio of vessel area to tissue area, d — mean area of a single terminal vessel. M — medial, CO — cortical, C — central, B — basal, L — lateral.

Ryc. 3. Średnie badanych parametrów dla poszczególnych jąder ułożone według rosnących wartości. W każdym prostokącie zgrupowane są średnie nie wykazujące między sobą istotnych różnic testem Newmana-Keulsa. Istotne różnice zachodzą natomiast między średnimi zawartymi w różnych prostokątach. a — gęstość unaczynienia, b — stosunek obwodów naczyń do powierzchni tkanki, c — stosunek powierzchni naczyń do powierzchni tkanki, d — średnia powierzchnia jednego naczynia terminalnego. M — przyśrodkowe, CO — korowe, C — centralne, B — podstawne, L — boczne

$18.27 \times 10^{-3} \pm 4.44 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$ (lateral nucleus). The mean values for the remaining nuclei were as follows: cortical nucleus — $13.19 \times 10^{-3} \pm 2.75 \times 10^{-3}$, central nucleus — $14.56 \times 10^{-3} \pm 3.07 \times 10^{-3}$, basal nucleus — $17.01 \times 10^{-3} \pm 3.83 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$. Statistically significant differences were found to exist between

Fig. 2. Morphological measures of the blood-brain exchange in the cat amygdaloid body. a — vascularization density, b — ratio of circumference of vessels to tissue area, c — ratio of vessel area to tissue area, d — mean area of a single terminal vessel. 1 — whole amygdaloid body; 2 — nuclei of amygdaloid body: M — medial, CO — cortical, C — central, B — basal, L — lateral; 3 — M + CO + C — medial, cortical and central; 4 — B + L — basal and lateral

Ryc. 2. Morfologiczne wykładniki wymiany krew-mózg w ciele migdałowatym kota. a — gęstość unaczynienia, b — stosunek obwodów naczyń do powierzchni tkanki, c — stosunek powierzchni naczyń do powierzchni tkanki, d — średnia powierzchnia jednego naczynia terminalnego. 1 — ciało migdałowate; 2 — jądra ciała migdałowatego: M — przyśrodkowe, CO — korowe, C — centralne, B — podstawne, L — boczne; 3 — M + CO + C — przyśrodkowe, korowe i centralne; 4 — B + L — podstawne i boczne

NUCLEUS		M	CO	C	B	L
MEDIAL (M)	1		○ □	○ □	● ■	● ■
	2		○ □	○ □	● ■	● ■
	3		○ □	○ □	● ■	● ■
	4		○ □	○ □	○ □	○ □
CORTICAL (CO)	1	○ □		○ □	● ■	● ■
	2	○ □		○ □	● ■	● ■
	3	○ □		○ □	● ■	● ■
	4	○ □		○ □	○ □	○ □
CENTRAL (C)	1	○ □	○ □		● ■	● ■
	2	○ □	○ □		● ■	● ■
	3	○ □	○ □		○ □	● ■
	4	○ □	○ □		○ □	○ □
BASAL (B)	1	● ■	● ■	● ■		○ □
	2	● ■	● ■	● ■		○ □
	3	● ■	● ■	○ □		○ □
	4	○ □	○ □	○ □		○ □
LATERAL (L)	1	● ■	● ■	● ■	○ □	
	2	● ■	● ■	● ■	○ □	
	3	● ■	● ■	● ■	○ □	
	4	○ □	○ □	○ □	○ □	

○ - 1 ● - 2 □ - 3 ■ - 4

Fig. 4. Statistical significance of the differences between the mean values of the studied parameters. 1 - vascularization density, 2 - ratio of vessel circumference to tissue area, 3 - ratio of vessel area to tissue area, 4 - mean area of a single terminal vessel. 1 - statistically insignificant differences according to Tukey's test, 2 - statistically significant differences according to Tukey's test ($\alpha = 0.05$), 3 - statistically insignificant differences according to Newman-Keuls test, 4 - statistically significant differences according to Newman-Keuls test ($\alpha = 0.05$)

Ryc. 4. Statystyczna ocena różnic między średnimi wartościami badanych parametrów. 1 - gęstość unaczynienia, 2 - stosunek obwodów naczyń do powierzchni tkanki, 3 - stosunek powierzchni naczyń do powierzchni tkanki, 4 - średnia powierzchnia jednego naczynia terminalnego. 1 - statystycznie nieistotne różnice w teście Tukeya, 2 - statystycznie istotne różnice w teście Tukeya ($\alpha = 0,05$), 3 - statystycznie nieistotne różnice w teście Newmana-Keulsa, 4 - statystycznie istotne różnice w teście Newmana-Keulsa ($\alpha = 0,05$)

the following nuclei: medial and basal, medial and lateral; cortical and basal, cortical and lateral; central and lateral. Comparison of the remaining pairs of nuclei did not reveal any statistically significant differences (Fig. 4).

Application of the Newman-Keuls test revealed the existence of two groups of amygdaloid body nuclei, differing significantly in the ratio of vessel cross sectional area to tissue area (Fig. 3c). The mean value of this ratio in each of the groups was as follows: medial, cortical and central nuclei - $13.61 \times 10^{-3} \pm 3.02 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$; basal and lateral nuclei - $17.59 \times 10^{-3} \pm 4.17 \times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2$.

The values of the average vessel cross sectional area in the amygdaloid body were as follows (Fig. 2d): basal nucleus - $82 \pm 15 \mu\text{m}^2$, medial nucleus - $83 \pm 21 \mu\text{m}^2$, cortical nucleus - $83 \pm 23 \mu\text{m}^2$, lateral nucleus - $85 \pm 13 \mu\text{m}^2$, central nucleus -

$89 \pm 23 \mu\text{m}^2$; with a mean value of $84 \pm 18 \mu\text{m}^2$ for the entire amygdaloid body. The values for the particular nuclei did not show statistically significant differences between them (Figs 3d and 4).

DISCUSSION

The studies of Pfeifer (1940), Friede (1966) and other authors working on the subject of brain angioarchitecture revealed a varying density of vascularization in various sections of the central nervous system. However, these authors have not made use of morphometry (Pfeifer 1940) nor have they been concerned with the angioarchitecture of the amygdaloid body (Pfeifer 1940; Friede 1966). The suggestion that various nuclei of the amygdaloid body have a different vascularization density was made by Koikegami (1963) but he did not penetrate this problem further.

The results we obtained enabled us to distinguish two groups of amygdaloid body nuclei in the cat, differing significantly according to the three studied parameters:

1. basal and lateral nuclei — with higher density of terminal vascularization, larger area of blood-brain exchange and larger area of blood perfusion per unit area of brain tissue,
2. central, cortical and medial nuclei — in which the mentioned parameters were lower.

Within each group, the particular nuclei of the amygdaloid body did not differ according to any of the parameters. On the other hand the mean area of a single terminal vessel was equal in all the studied nuclei (Fig. 2d). Assuming the angle of section of particular vessels to be random it may be concluded that the vessels were of similar size in all the studied nuclei.

The results presented show that the differences in vascularization density of the nuclei of the cat amygdaloid body are not compensated by a change in perfusion area and area of blood-brain exchange. Hence, we may accept that the established differences in perfusion area and the blood-brain exchange per unit tissue area are mainly related to differences in vascularization density of the studied nuclei of the amygdaloid body.

The present studies were performed semiautomatically using a minicomputer. This restricted our possibilities of acquiring a wider range of data about the relation between terminal vessels and nervous tissue. However, the results presented show a difference in angioarchitecture between the particular nuclei of the cat amygdaloid body.

WYMIANA KREW—MÓZG W CIELE MIGDAŁOWATYM KOTA BADANIA MORFOMETRYCZNE

Streszczenie

W celu określenia wybranych morfologicznych wykładników wymiany krew-mózg w ciele migdałowatym kota zbadano liczbę naczyń włosowatych na milimetr kwadratowy tkanki, stosunek powierzchni ich przekrojów do powierzchni tkanki, stosunek sumy ich obwodów do powierzchni

tkanki oraz średnią powierzchnię jednego naczynia terminalnego w skrawku. Przedmiotem badań było 96 wycinków z 23 dorosłych kotów, z 5 jąder ciała migdałowatego: korowego, centralnego, przyśrodkowego, bocznego i podstawnego. Badania wykonano półautomatycznie przy pomocy minikomputera.

Na podstawie zbadanych parametrów wymiany krew—mózg stwierdzono istnienie w ciele migdałowatym kota dwóch grup jąder: jądra boczne i podstawne — o większej gęstości unaczynienia terminalnego, wyższym stosunku obwodów naczyń do powierzchni tkanki (wykładnik powierzchni wymiany krew-tkanka), wyższym stosunku pola przekrojów naczyń do powierzchni tkanki (wykładnik powierzchni przepływu); oraz jądra centralne, korowe i przyśrodkowe w których wszystkie wyżej podane parametry były niższe.

Wielkość naczyń terminalnych była podobna we wszystkich zbadanych jądrach ciała migdałowatego kota.

ЗАМЕЩЕНИЕ КРОВЬ — МОЗГ В МИНДАЛЕВИДНОМ ТЕЛЕ КОШКИ. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Резюме

С целью определения выбранных морфологических показателей замещения кровь — мозг в миндалевидном теле кошки исследовано следующие параметры: число капилляров на квадратный миллиметр ткани, отношение поверхности их сечений к поверхности ткани, отношение суммы их периметров к поверхности ткани и среднюю поверхность одного терминального сосуда в срезе. Предметом исследований авторов было 96 сегментов из 23 взрослых кошек, из 5 ядер миндалевидного тела: коркового, центрального, медиального, бокового и основного. Исследования были проведены полуавтоматическим способом при помощи миникомпьютера.

На основании исследованных параметров замещения кровь—мозг констатировано существование в миндалевидном теле кошки двух групп ядер: 1) боковые и основные ядра — с большей плотностью терминальной васкуляризации, с высшим отношением периметров сосудов к поверхности ткани (показатель поверхности замещения кровь—ткань), с высшим отношением поля сечений сосудов к поверхности ткани (показатель поверхности протока); 2) центральные, корковые и медиальные ядра, в которых все вышеуказанные параметры были ниже.

Величина терминальных сосудов была подобна во всех исследованных ядрах миндалевидного тела кошки.

REFERENCES

1. Amtorp O.: Estimation of capillary permeability of inulin, sucrose and mannitol in rat brain cortex. *Acta Physiol. Scand.*, 1980, 110, 337—342.
2. Bär T.: Morphometric evaluation of capillaries in different laminae of rat cerebral cortex by automatic image analysis: changes during development and aging. In: *Pathology of cerebrospinal microcirculation*. Ed. J. Cervós-Navarro et al. Raven Press, New York 1978, 1—9.
3. Bär T.: The vascular system of the cerebral cortex. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 1980, 59, 1—62.
4. Conradi N.: The internatal vascularization of the brain in normal and protein-deprived rats. *Akademisk Avhandling, Göteborg* 1980.
5. Crone C., Olesen S. P.: Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.*, 1982, 241, 49—55.
6. Eayrs J. T.: The vascularity of the cerebral cortex in normal and cretinous rats. *J. Anat.*, 1954, 88, 164—173.

7. Fonberg E.: The role of the amygdaloid nucleus in animal behaviour. In: *Brain reflexes*. Ed. E. A. Asratyan. Elsevier, Amsterdam, London, New York 1968, 273–281.
8. Friede R. L.: Capillarization. In: *Topographic brain chemistry*. Ed. R. L. Friede. Academic Press, New York, London, 1966, 1–15.
9. Hunziker O., Abdel'Al S., Schulz U., Schweizer A.: Architecture of cerebral capillaries in aged human subjects with hypertension. In: *Pathology of cerebrospinal microcirculation*. Ed. J. Cervós-Navarro et al. Raven Press, New York 1978, 471–477.
10. Ingvar D. H.: Localisation of cortical functions by multiregional measurement of the cerebral blood flow. In: *Architectonics of the cerebral cortex*. Ed. M. A. B. Brazier, H. Petsche. Raven Press, New York, 1978, 235–243.
11. Johnson N. L., Leone F. C.: *Statistics and experimental design in engineering and the physical sciences*. J. Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto 1977.
12. Koikegami H.: Amygdala and other related limbic structures; experimental studies on the anatomy and function. I. Anatomical researches with some neurophysiological observations. *Acta Med. Biol.*, 1963, 10, 161–277.
13. Narkiewicz O., Juraniec J., Wrzołkowska T.: The distribution of axon terminals with flattened vesicles in the nuclei of the amygdaloid body of the cat. *J. Hirnforsch.*, 1978, 19, 133–143.
14. Narkiewicz O., Juraniec J., Wrzołkowska T.: Ultrastruktura synaps a zróżnicowanie czynnościowe ciała migdałowatego. *Ann. Acad. Med. Gedan.*, 1975, 5, 43–60.
15. Pfeifer R. A.: *Die Angio-architektonische Areale Gliederung der Grosshirnrinde*. Thieme, Leipzig 1940.
16. Ravens J. R.: Vascular changes in the human senile brain. In: *Pathology of cerebrospinal microcirculation*. Eds.: J. Cervós-Navarro, E. Betz, R. Ferszt, R. Wüllenweber. Raven Press, New York 1978, 487–501.
17. Samuels S., Schwartz S.: Compartmentation in amino acid transport across the blood brain barrier. *Neurochem. Res.*, 1981, 6, 755–765.
18. Sokoloff L.: New techniques in the study of local brain activity in animal and man. In: *Chemical transmission in the brain. The role of amines, amino acids and peptides*. Ed. R. M. Buijs et al. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York 1982, 331–348.
19. Wolff J. R.: Ontogenetic aspects of cortical architecture: lamination. In: *Architectonics of the cerebral cortex*. Ed. M. A. B. Brazier, H. Petsche. Raven Press, New York 1978, 159–173.
20. Wrzołkowska T., Cofta T., Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain. I. Vascularization density of various parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 77–83.

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

18²⁵ — R. Bandler, A. McDougall, R. Damphey (Australia): "Behavioural and cardiovascular components of the defence reaction: Role of the midbrain periaqueductal grey". Discussers: Allan Siegel and Barry Jacobs (U.S.A.).

ALONG WITH the: XIIIth WORLD CONGRESS OF NEUROLOGY, Hamburg, September 1-6, 1985.

Site of Congress: Congress Centrum Hamburg in association with the Canadian Pacific Hamburg Plaza Hotel

Address: CCH CONGRESS CENTRUM HAMBURG
Am Dammtor
D-2000 Hamburg 36
Federal Republic of Germany

For Registration to: XIIIth World Congress of Neurology
Congress Manager's Office
Letzter Hasenpfad 61
D-6000 Frankfurt 70
Federal Republic of Germany

IRENA ŁUKASZYK

CAPILLARY BLOOD VESSELS OF THE BRAIN*

III. TERMINAL VESSEL ULTRASTRUCTURE IN THE NUCLEI OF THE CAT AMYGDALOID BODY. MORPHOMETRIC STUDIES

Laboratory of Electron Microscopy, Medical School, Gdańsk

The studies performed in our Laboratory concern the terminal vessels of chosen areas of the cat and rat brain. We investigated the density of vascularization, the area of perfusion and area of blood-brain exchange as well as the relation of nerve endings to the wall of the terminal vessels (Łukaszyk et al. 1984; Wrzołkowa et al. 1984; Kraszpulski et al. 1985).

Studies performed on the amygdaloid body with the use of a light microscope showed that the vascularization density, the area of perfusion and exchange vary. According to these criteria two groups of nuclei emerged: 1. basal and lateral and 2. medial, cortical and central nuclei (Kraszpulski et al. 1985). Electron microscope studies in different cortical areas of the cat and rat brain show not only differences in the number of perivascular nerve endings but also in their morphological features (Łukaszyk et al. 1984). This suggests the possibility of some relation between the perivascular "close" nerve endings and the terminal vessel wall.

The present paper is a continuation of our previous EM studies as well as investigations of the amygdaloid body using the light microscope. The aim was to evaluate morphometrically the lumen and the components of the terminal vessel wall in different nuclei of the amygdaloid body. At the same time we tried to answer the question, whether there are any features which distinguish the particular nuclei of the amygdaloid body.

MATERIAL AND METHODS

The subject of our studies were specimens taken from the amygdaloid body of 5 adult cats. 215 cross sections of terminal vessels from 5 nuclei of the amygdaloid body were investigated: the lateral (29), basal (64), central (49), medial (44) and

* This work was supported by the Polish Academy of Sciences grant No. 10.4.05.1.4.

cortical (29) nucleus. Samples from the nuclei of the amygdaloid body were obtained according to the procedure described previously (Kraszpulski et al. 1985). The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and viewed in the JEM 7A electron microscope. Electron micrographs of entire terminal vessels were made at a magnification of 6500–11 000 \times and analysed in the specially programmed WANG-2200 VP minicomputer. Data from the electron micrographs were fed into the computer memory using a coordinatometre which outlined the vessel lumen, the endothelium and the entire vessel as well as the length of alignment of pericyte to endothelium.

Similarly as other authors (Oldendorf et al. 1981; Bär, Budi 1984) we considered the pericytes to be cells built into the terminal vessel wall, investing endothelial cells and surrounded by a basal membrane together with the endothelium. It should, however, be taken into account that in some cases the double cell layer in the terminal vessel wall is made up of two overlapping endothelial cells. Distinction of a pericyte from an overlapping endothelial cell forming the external cell layer may sometimes be impossible in ultrathin sections. Hence, we realize that in our study a small number of the cell processes considered to be pericytes may be overlapping endothelial cells.

The image of the photograph was shown on the graphic monitor and a printed copy of it was obtained in the printer. Identification data (such as the micrograph number, the type of nucleus) that could not be acquired from the micrograph itself were fed into the computer by means of a special keyboard.

Using the collected data the computer calculated the circumferences, cross sectional areas, as well as the special relationships between the studied structures.

The parameters studied were: the cross-sectional areas of entire terminal vessels, of their lumina, of their walls (made up of endothelium and pericytes) and linear parameters, namely, the vessel circumference, the lumen circumference, the endothelium circumference, the length of pericyte-endothelium alignment, and the length of "close" pericyte alignment to the endothelial cell.

The above studies were performed both for the entire amygdaloid body and for the particular nuclei.

The results were analysed statistically by the Tukey and Newman-Keuls test.

RESULTS

Mean values of the studied parameters of the amygdaloid body nuclei are presented in table 1.

Analysis of the results shows that the mean value of the cross-sectional areas of the 215 studied terminal vessels was $23.14 \pm 7.05 \mu\text{m}^2$ and no statistically significant differences were found to exist between particular nuclei. The mean cross-sectional area of the vessel lumen was $17.14 \pm 6.07 \mu\text{m}^2$ for the entire amygdaloid body, which is 75% of the vessel cross-sectional area. The same percentage was obtained in all the particular nuclei of the amygdaloid body except the lateral nucleus where the lumen took up 70% of the vessel cross-sectional area. Statistical analysis

Table 1. Mean values of the studied parametres of terminal vessels of cat amygdaloid body (with standard deviations)

Tabela 1. Zestawienie średnich wartości badanych parametrów naczyń terminalnych ciała migdałowatego kota z odchyleniem standardowym

Parametres studied Badane parametry	Amygdaloid body Ciało migdałowate	Lateral nucleus Jądro boczne	Basal nucleus Jądro podstawowe	Central nucleus Jądro centralne	Medial nucleus Jądro przyśrod.	Cortical nucleus Jądro korowe
Number of vessels studied Liczba przebadanych naczyń	215	29	64	49	44	29
Cross-sectional area of entire vessel (μm^2) Pole powierzchni całego naczynia (μm^2)	23.14±7.05	23.37±7.11	21.51±6.71	25.43±8.56	21.85±5.78	24.58±5.57
Cross-sectional area of lumen (μm^2) Powierzchnia światła (μm^2)	17.14±6.07	16.85±6.43	16.16±5.78	19.67±7.14	15.13±4.39	18.37±5.15
Cross-sectional area of vessel wall (μm^2) Powierzchnia ściany (μm^2)	6.00±2.76	6.52±2.82	5.35±2.43	5.75±2.88	6.73±3.09	6.21±2.40
Cross-sectional area of endothelium (μm^2) Powierzchnia śródbłonna (μm^2)	3.49±2.15	3.82±2.43	3.15±2.14	3.27±1.99	3.97±2.16	3.57±2.08
Cross-sectional area of pericytes (μm^2) Powierzchnia pericytów (μm^2)	2.50±1.70	2.70±1.55	2.20±1.33	2.48±1.72	2.75±2.31	2.63±1.41
Endothelium circumference (EC) (μm) Obwód śródbłonna (OSBL) (μm)	17.10±2.79	16.85±2.67	16.29±2.82	17.79±3.32	16.91±2.22	18.23±2.03
Length of pericyte alignment (LPA) (μm) Długość linii przylegania pericytów (DLPP) (μm)	8.44±2.93	9.30±3.06	7.70±2.40	9.12±2.79	7.92±3.10	8.89±3.40
Length of "close" pericyte alignment (LPCA) (μm) Długość odcinków bezpośredniego przylegania pericytów (DLPPBB) (μm)	2.08±1.42	1.72±1.37	1.87±1.16	2.33±1.59	2.20±1.42	2.32±1.64
Ratio of LPA/EC Stosunek DLPP/OSBL	0.50±0.16	0.55±0.16	0.48±0.16	0.52±0.15	0.47±0.16	0.49±0.17
Ratio of LPCA/EC Stosunek DLPPBB/DLPP	0.26±0.17	0.19±0.15	0.26±0.17	0.26±0.15	0.29±0.19	0.27±0.18

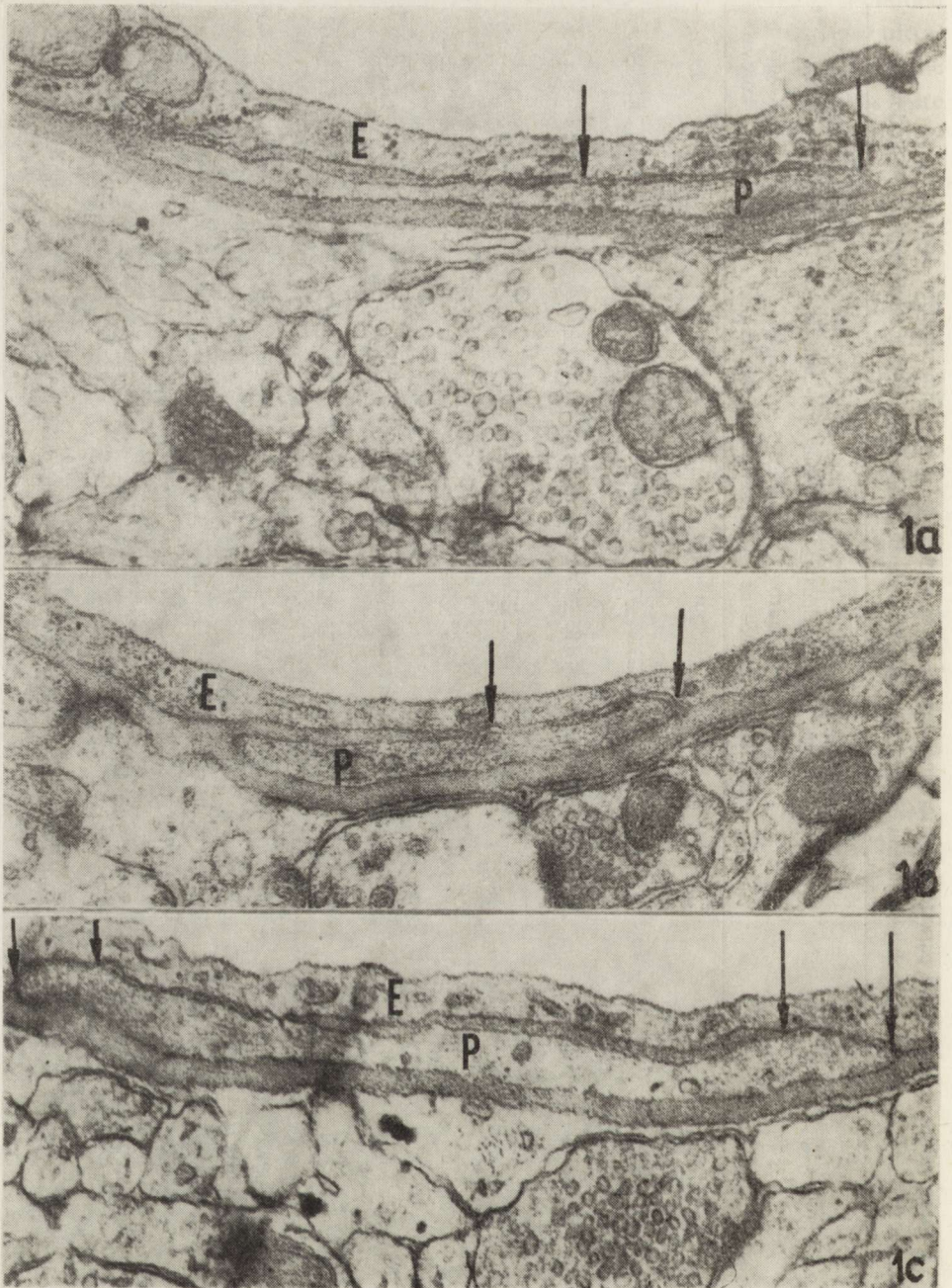


Fig. 1. Capillary vessel of cat amygdaloid body. "Close" alignment between pericyte and endothelium (arrows). P — pericyte, E — endothelium. *1a* — $\times 62\ 000$, *1b* — $\times 50\ 000$, *1c* — $\times 60\ 000$
Ryc. 1. Naczynie włosowate ciała migdałowego mózgu kota. „Bliskie” przyleganie między pericytem a śródbłonkiem (strzałki). P — pericyt, E — śródbłonek. Pow. *1a* — $62\ 000 \times$, *1b* — $50\ 000 \times$, *1c* — $60\ 000 \times$

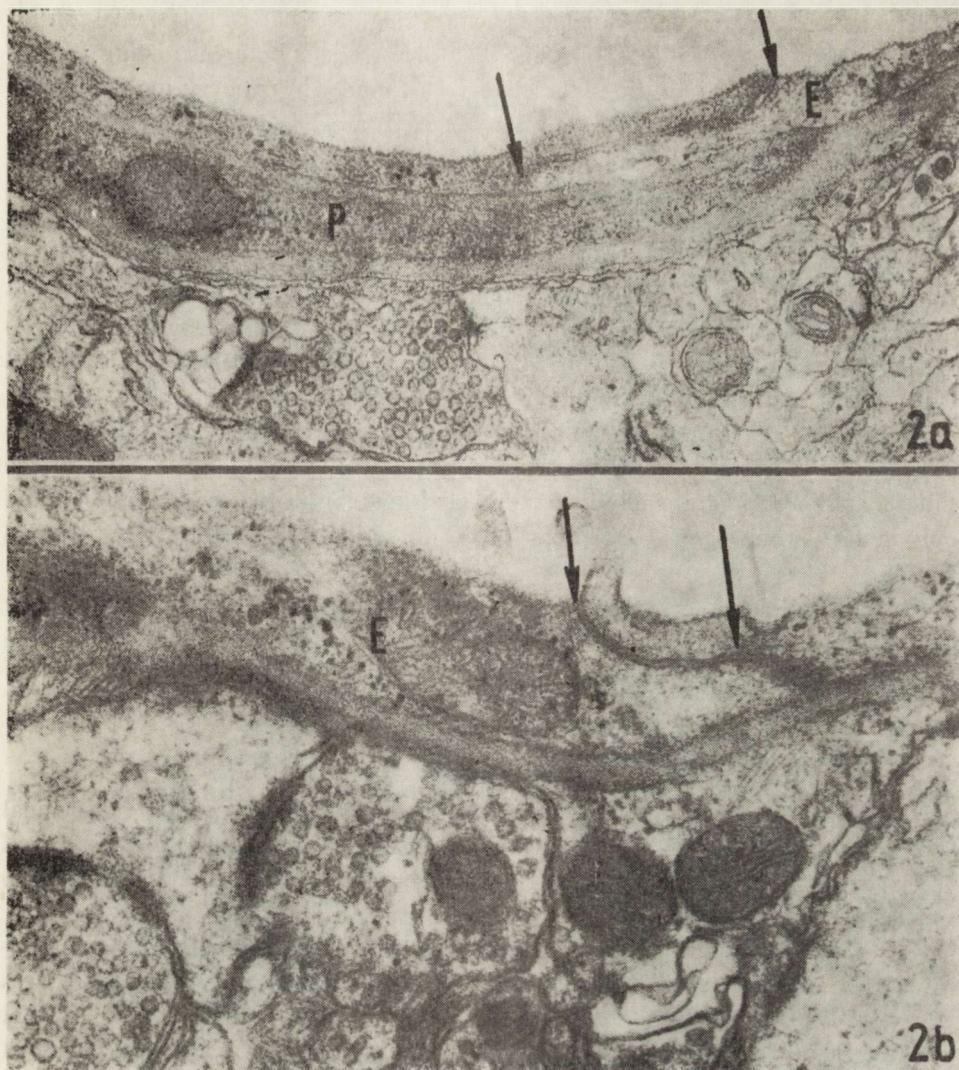


Fig. 2. Capillary vessel of cat amygdaloid body. "Close" alignment between endothelial cells (arrows). P — pericyte, E — endothelium. 2a — $\times 51\,000$, 2b — $\times 68\,000$

Ryc. 2. Naczynie włosowate ciała migdałowego mózgu kota. „Bliskie” przyleganie między komórkami śródbłonna (strzałki). P — perycyt, E — śródbłonek. Pow. 2a — $51\,000\times$, 2b — $68\,000\times$

by the Newman-Keuls test did not show any statistical difference between this particular nucleus and the remaining ones.

The mean cross-sectional area of the capillary vessel wall for the entire amygdaloid body was $6.00 \pm 2.76 \mu\text{m}^2$. In the entire amygdaloid body 60% of the wall cross-sectional area was taken up by endothelium and 40% by pericytes. Hence, for the entire amygdaloid body the mean value for the endothelium was $3.49 \pm 2.5 \mu\text{m}^2$ and for pericytes $2.50 \pm 1.70 \mu\text{m}^2$, without statistically significant differences between the particular nuclei.

The mean length of pericyte alignment in a single vessel was $8.44 \pm 2.93 \mu\text{m}$ for the entire amygdaloid body, the mean value of vessel circumference being $17.10 \pm 2.79 \mu\text{m}$. Hence, 50% of the endothelium is surrounded by pericytes in the amygdaloid body. For particular nuclei the value ranges from 47% to 55%. No statistically significant differences were found to exist between particular nuclei.

Pericytes were separated from the endothelium by a basal lamina which varied in thickness along the entire length. In some places no basal lamina was visible between the endothelium and the investing pericyte, allowing the pericyte to lie "close" to the endothelium (Fig. 1). The mean length of this "close" pericyte-endothelium alignment was $2.08 \pm 1.42 \mu\text{m}$ which is 25% of the entire length of pericyte-endothelium alignment. No statistically significant differences between these results for particular nuclei were found.

Approximately 60% of the studied endothelial cells of the amygdaloid body terminal vessels had no interendothelial junctions — they were seamless, 30% of the endothelium cells had a single interendothelial junction in the section studied and only in 10% were there two or occasionally three junctions visible in the studied section.

Half of the junctions between endothelium cells were found to be in the proximity of pericytes, and 45% of these were at the places of "close" alignment of pericytes to the endothelium.

DISCUSSION

In the amygdaloid body, no differences were found to exist between terminal vessels of particular nuclei as regards the dimensions of the lumen, the vessel wall and its components (i.e. the endothelium and the pericyte) and the relations between them.

At the beginning of our studies, we expected to find differences in the components of terminal vessels in various nuclei of the amygdaloid body. Our expectations were based on studies by other authors as well as our own. Earlier we found that the area of blood-brain exchange studied in the light microscope was different in various parts of the cerebral cortex (Wrzołkowska et al. 1984) and in different nuclei of the amygdaloid body (Kraszpulski et al. 1985). Moreover, the electron microscopic studies of Oldendorf et al. (1981), Edwards and Garlick (1981) as well as our own (Łukaszyk et al. 1984) all suggest the possibility of a variety of terminal vessel ultrastructures.

The terminal vessel parametres we chose to study do not exhaust all the possibilities of evaluation of terminal vessel ultrastructure. If we were to take into consideration the organelles of the cells of the vessel wall, the existence of differences between terminal vessels of the nuclei of the amygdaloid body may perhaps have been confirmed.

Analysis of the areas of alignment of the pericytes to the endothelium composing the cell wall revealed a new problem — that of the sections where the basal membrane was not visible, that is the sections of "close" alignment. Usually, these were

the places where endothelium cells formed interendothelial junctions (Fig. 2) or sections of various length where the basal membrane separating the endothelium cells and pericytes was not visible (Fig. 1).

Similar although uncommented pictures of terminal vessels with sections of "close" alignment of pericytes to the endothelium were seen in the study of Cuevas et al. (1984). We found that the length of "close" alignment of pericyte to endothelium comprises about 13% of the endothelial circumference in all the studied vessels of the nuclei of the amygdaloid body. This "close" alignment was found to exist both in seamless capillaries and in those with one or more interendothelial junctions.

The role and importance of these sections of "close" alignment is difficult to assess at the present stage of our investigations. Realising the role of the basal lamina in vessel wall permeability in the CNS (Bär, Strauch 1979) one has to accept that the sections of "close" alignment must be places of altered permeability of the terminal vessel. They also must be places of easier exchange between pericytes and endothelium.

NACZYNIA WŁOSOWATE MÓZGU

III. Ultrastruktura naczyń terminalnych jąder ciała migdałowatego kota.

Badania morfometryczne

Streszczenie

Celem badań była morfometryczna ocena ultrastruktury naczyń terminalnych jąder ciała migdałowatego kota. Analizie komputerowej poddano 215 przekrojów naczyń terminalnych pochodzących z jąder: bocznego (29), podstawnego (64), centralnego (49), przyśrodkowego (44) i korowego (29) ciała migdałowatego 5 dorosłych kotów. Zbadano wielkość światła i ścian, w tym śródbłonek i pericytów, oraz ich wzajemne relacje. Wyniki oceniono testem Tukeya i Newmana-Keulsa.

Nie stwierdzono różnic w badanych parametrach naczyń terminalnych pomiędzy poszczególnymi jądrami. Podczas analizy powierzchniowego przylegania komórek śródbłonek oraz powierzchni kontaktu śródbłonek z pericytem stwierdzono, że istnieją odcinki „bezpośredniego” przylegania to jest odcinki, w których nie uwidoczniła się błona podstawna. W dyskusji zwrócono uwagę na ewentualną rolę czynnościową miejsc „bezpośredniego” kontaktu komórek ściany.

КАПИЛЛЯРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

III. Ультраструктура терминальных ядер миндалевидного тела кошки.

Морфологические исследования

Резюме

Целью исследований была морфометрическая оценка ультраструктуры терминальных сосудов ядер миндалевидного тела кошки. Компьютерному анализу подвергнуто 215 сечений терминальных сосудов происходящих из ядер: бокового (29), основного (64), центрального (49), медиального (44) и коркового (29) миндалевидного тела 5 взрослых кошек. Исследовано величину просветов и стенок, в том числе эндотелиев и перицитов, и их взаимные соотношения. Результаты оценивались при помощи теста Тукея и Ньюмана-Кеульса.

Не констатировано разниц в исследованных параметрах терминального сосуда между отдельными ядрами. Во время анализа поверхности взаимного прилегания клеток эндо-

теля и поверхности контакта эндотелия с перицитом констатировано, что существуют отрезки „непосредственного” прилегания т.е. отрезки, в которых не обнаруживалась основная мембрана. В обсуждении обращено внимание на возможную функциональную роль мест „непосредственного” контакта клеток стенки.

REFERENCES

1. Bär Th., Strauch L.: Messungen der Kapillarwanddicke im Cerebralcortex alternder Ratten. *Verh. Anat. Ges.*, 1979, 73, 1069–1073.
2. Bär Th., Budi Santoso A. W.: Identification of pericytes in the central nervous system by silver staining of the basal lamina. *Cell Tissue Res.*, 1984, 236, 491–493.
3. Cuevas P., Gutierrez Diaz J. A., Reimers D., Dujovny M., Diaz F. G., Ausman J. I.: Aspects of interastrocytic gap junctions in blood-brain barrier in the experimental penumbra area, revealed by transmission electron microscopy and freeze-fracture. *Experientia*, 1984, 40, 471–473.
4. Edwards D. A., Garlick D.: An ultrastructural study of the blood-brain barrier in the rat. In: *Progress in microcirculation research*. Ed. D. Garlick. Committee in Postgraduate Med. U.N.S.W. Sydney 1981, 51–54.
5. Kraszpulski M., Wrzołkowa T., Mierzewski P.: Blood-brain exchange in the cat amygdaloid body (Morphometric studies). *Neuropat. Pol.*, 1985, 23,000.
6. Łukaszyk I., Wrzołkowa T., Cofta T.: Capillary blood vessels of the brain. II. Axon terminals of capillary vessels in different parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 85–96.
7. Oldendorf W. H., Cornford M. E., Brown W. J.: Some unique ultrastructural characteristics of rat brain capillaries. In: *Cerebral microcirculation and metabolism*. Eds.: J. Cervos-Navarro, E. Fritschka. Raven Press, New York 1981, 9–15.
8. Wrzołkowa T., Cofta T., Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain: I. Vascularisation density of various parts of the cerebral cortex in the cat and rat. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 77–83.

Author's address: Laboratory of Electron Microscopy, Medical School, 1 Dębinki, 80-210 Gdańsk

Anna Taraszewska, Irmina B. Zelman: Morphometric studies on myelin development in pt rabbit. I. Optic nerve	219
Andrzej Wajgt, Mirosław Górny, Janusz Szymaś: Isolation and immunogenic properties of myelin-associated glycoprotein (MAG) from human brain	229
Janusz Szymaś, Andrzej Wajgt: Myelin-associated glycoprotein (MAG) in oligodendrogliomas. An immunohistochemical study	239
Mirosław Ryba, Andrzej Kukwa, Wiktor Janczewski: Cardiovascular response to greater petrosal nerve section as method of prevention of experimental cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage	247
Michał Kraszpulski, Teresa Wrzołkowa, Piotr Mierzewski: Blood-brain exchange in the cat amygdaloid body. Morphometric studies	255
Irena Łukaszyk: Capillary blood vessels of the brain. III. Terminal vessel ultrastructure in the nuclei of the cat amygdaloid body. Morphometric studies	265

СОДЕРЖАНИЕ

Ежи Дымецки, Данута Маркевич, Мацей Пулторак, Ольгерд Пуциловски, Войцех Костовски, Анджей Бидзиньски: Результаты внутримозговых трансплантаций незрелого черного вещества у крыс с экспериментально вызванной болезнью Паркинсона. I. Сравнительные исследования двух моделей болезни Паркинсона вызванных односторонним стереотактическим повреждением черного вещества с применением электрокоагуляции и при помощи инъекции 6-гидроксидофамина	167
Ежи Дымецки, Мацей Пулторак, Ольгерд Пуциловски, Данута Маркевич, Войцех Костовски: Результаты внутримозговых трансплантаций незрелого черного вещества у крыс с экспериментально вызванной болезнью Паркинсона: II. Результаты гистопатологических и гистофлюоресценционных исследований	181
Барбара Косицка, Тереса Э. Бугера, Миэчислав Смялэк: Уровень гамма-аминомасляной кислоты (ГАВА) и активность глутаматной декарбоксилазы (GAD) в мозгу крыс с экстрапирамидальным синдромом вызванным острым отравлением хлористым марганцем	191
Барбара Косицка, Марек Киттель, Миэчислав Смялэк: Влияние отравления хлористым марганцем на уровень и синтез гамма-аминомасляной кислоты в мозгу у крыс в период беременности и лактации	201
Уршуля Рафаловска, Збигнев Домбровецки, Анна Пастушко, Мария Росновска: Влияние хронического применения лития на обмен нейротрансмиттеров в синапсомозгах мозга крысы	211
Анна Тарашевска, Ирмина Б. Зельман: Морфометрическая оценка процесса миелинизации в мозгу кролика рт. I. Зрительный нерв	219
Анджей Вайгт, Мирослав Гурны, Януш Шимась: Изоляция и иммуногенность главного гликопротеина (MAG) миелина человеческого мозга	229
Януш Шимась, Анджей Вайгт: Главный гликопротеин связанный с миелином (MAG) в олигодендроглиомах. Иммунологическое исследование	239
Мирослав Рыба, Анджей Куква, Виктор Янчевски: Сердечно-сосудистый ответ на перегрузку большого каменистого нерва как метода предохранения от экспериментального спазма кровеносных сосудов в субарахноидальном кровотоке	247
Михал Крашпульски, Тереса Вжолкова, Петр Межевски: Замещение кровь — мозг в миндалевидном теле кошки. Морфометрические исследования	255
Ирена Лукашик: Капилляры головного мозга. III. Ультраструктура терминальных ядер миндалевидного тела кошки. Морфометрические исследования	265

SPIS TREŚCI

Jerzy Dymecki, Danuta Markiewicz, Maciej Półtorak, Olgierd Puciłowski, Wojciech Kostowski, Andrzej Bidziński: Wyniki domózgowych transplantacji niedojrzałej istoty czarnej u szczurów z doświadczalnie wywołaną chorobą Parkinsona. I. Badania porównawcze nad dwoma modelami choroby Parkinsona wywołanymi przez jednostronne stereotaktyczne uszkodzenie istoty czarnej przy użyciu elektrokoagulacji lub przez wstrzyknięcie 6-hydroksydopaminy	167
Jerzy Dymecki, Maciej Półtorak, Olgierd Puciłowski, Danuta Markiewicz, Wojciech Kostowski: Wyniki domózgowych transplantacji niedojrzałej istoty czarnej u szczurów z doświadczalnie wywołaną chorobą Parkinsona. II. Wyniki badań histopatologicznych i histo fluorescencyjnych	181
Barbara Kosicka, Teresa E. Bugera, Marek Kittel, Mieczysław Śmiałek: Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) oraz aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w mózgu szczura z zespołem pozapiramidowym po ostrym zatruciu chlorkiem manganawym	191
Barbara Kosicka, Marek Kittel, Mieczysław Śmiałek: Wpływ zatrucia chlorkiem manganawym w okresie ciąży i laktacji u szczurów na poziom i syntezę kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w mózgu	201
Urszula Rafałowska, Zbigniew Dąbrowiecki, Anna Pastuszko, Maria Rosnowska: Wpływ przewlekłego podawania litu na przemianę neurotransmiterów w synaptozomach mózgu szczura	211
Anna Taraszewska, Irmina B. Zelman: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy	219
Andrzej Wajgt, Mirosław Górny, Janusz Szymaś: Izolacja i immunogenność głównej glikoproteiny (MAG) mieliny mózgu ludzkiego	229
Janusz Szymaś, Andrzej Wajgt: Główna glikoproteina związana z mieliną (MAG) w skąpodrzewiakach. Badanie immunohistochemiczne.	239
Mirosław Ryba, Andrzej Kukwa, Wiktor Janczewski: Odpowiedź sercowo-naczyniowa na przecięcie nerwu skalistego większego jako metody zapobiegania doświadczalnemu skurczowi naczyń krwionośnych w krwawieniu podpajęczynówkowym	247
Michał Kraszpulski, Teresa Wrzółkowa, Piotr Mierzewski: Wymiana krew-mózg w ciele migdałowatym kota. Badania morfometryczne	255
Irena Łukaszuk: Naczynia włosowate mózgu. III. Ultrastruktura naczyń terminalnych jąder ciała migdałowatego kota. Badania morfometryczne	265

CONTENTS

Jerzy Dymecki, Danuta Markiewicz, Maciej Półtorak, Olgierd Puciłowski, Wojciech Kostowski, Andrzej Bidziński: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. I. Comparative evaluation of two models of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic lesion of the substantia nigra with electrocoagulation and with 6-hydroxydopamine	167
Jerzy Dymecki, Maciej Półtorak, Olgierd Puciłowski, Danuta Markiewicz, Wojciech Kostowski: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. II. Results of histopathological and histo fluorescent studies	181
Barbara Kosicka, Teresa E. Bugera, Marek Kittel, Mieczysław Śmiałek: Effect of acute manganese intoxication with extrapyramidal syndrome on GABA level and GAD activity in the rat brain	191
Barbara Kosicka, Marek Kittel, Mieczysław Śmiałek: Effect of manganese chloride intoxication on gamma-aminobutyric acid level and synthesis in the rat brain during pregnancy and lactation	201
Urszula Rafałowska, Zbigniew Dąbrowiecki, Anna Pastuszko, Maria Rosnowska: Effect of chronic lithium administration on neurotransmitter metabolism in synaptosomes from rat brain	211