

R. 105

eqz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

*Subskrypcja
brak
wzrostu
we Wrocławiu*

204, DW

TOM 23

1985

ZESZYT 4

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

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 23

1985

ZESZYT 4

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina Zelman
Sekretarz Redakcji: Anna Zaręba-Kowalska

ADRES REDAKCJI

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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1985.
Nakład: 570 egz. Objętość: ark. wyd. 10,40, ark. druk. 9,13, ark. A₁-12.
Papier druk. sat. kl. IV, 70 g, 70×100. Oddano do składania 1985.7.25.
Podpisano do druku 1985.12.9. Druk ukończono w grudniu 1985.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3325/85. R-13. Cena zł 125.—



PAWEŁ M. GROCHOWICZ

ALLOGENICZNY PRZESZCZEP NERWU OBWODOWEGO

Zakład Chirurgii Transplantacyjnej Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Przerwanie ciągłości nerwu obwodowego prowadzi do utraty funkcji ruchowej i czuciowej. Do anatomicznego przerwania ciągłości nerwu dochodzi wskutek urazu mechanicznego, a także po chirurgicznym usunięciu nerwiaka lub nowotworu nerwu. Przerwanie ciągłości funkcjonalnej może nastąpić z powodu zwłóknienia w następstwie przewlekłego ucisku, lub niedokrwienia tkanki podporowej nerwu obwodowego. W takiej sytuacji niezbędne jest zszycie kikutów zdrowych części nerwu. Ponieważ jednak uszkodzeniom towarzyszy z reguły ubytek części nerwu, zszycie koniec do końca powoduje napięcie w linii zespolenia i konieczne jest wykonanie przeszczepu. Ocena histologiczna i elektrofizjologiczna regenerujących włókien osiowych u psa w doświadczeniach przeprowadzonych przez Miyamoto i Tsuge (1981) wykazała, że połączenie kikutów nerwu z zastosowaniem autologicznego przeszczepu daje lepsze wyniki niż zespolenie koniec do końca wykonane pod niewielkim napięciem rzędu 25 g, odpowiadające ubytkowi średnio 1,7 cm. Wykonanie zespolenia pod napięciem prowadzi do upośledzenia ukrwienia kikutów i miejsca zespolenia. Przy napięciu 25 g ulegają zamknięciu poprzeczne połączenia między zewnątrz- i wewnątrzpochodnym układem naczyniowym nerwu. Przy wzroście napięcia kikutów do 50 g (średni ubytek 2,7 cm) występuje zwężenie światła dużych naczyń układu zewnątrzpochodnego *epineurium*. Przy napięciu 75 g (średni ubytek 3,1 cm) nie można już uwidocznąć układu wewnątrzpochodnego naczyń, tj. naczyń *peri-* i *endo-*neurium.

Skutkiem upośledzenia unaczynienia jest obrzęk włókien osiowych, ich częściowe zwyrodnienie i przerwanie ciągłości niektórych włókien. Dochodzi również do nacieków komórkowych w osłonce mielinowej (Miyamoto i wsp. 1979). W badaniu elektrofizjologicznym (elektromiografia) stwierdzono adekwatne do stopnia napięcia upośledzenie funkcji nerwu (Miyamoto 1979). Milesi i wsp. (1967, 1972) wykazali w badaniach kli-

nicznych i doświadczalnych, że rozplem tkanki łącznej w miejscu zespolenia jest proporcjonalny do napięcia pod jakim zeszyto nerw. Utrudnia to regenerację włókien osiowych przez linię zespolenia i sprzyja powstawaniu nerwiaków. W przypadkach klinicznych, gdy zespolenie nerwu koniec do końca jest niemożliwe z powodu nadmiernego napięcia, metodą z wyboru jest zastosowanie autologicznych przeszczepów nerwów skórnych (Suderland 1968, Van Beek, Kleinert 1979, Milesi 1981). Nerwem najczęściej używanym do przeszczepu jest *n.suralis* (Suderland 1968; Van Beek, Kleinert 1979). Przy dużych ubytkach grubych nerwów, jak nerwu kulszowego, czy splotu barkowego wykonanie przeszczepu autogennego jest niemożliwe z braku dostatecznej ilości materiału do przeszczepu. Jedynym sposobem przywrócenia ciągłości nerwu jest w takim wypadku zastosowanie przeszczepu allogenicznego (Milesi 1981). Zastosowanie takiego przeszczepu powikłane jest jednak immunologiczną reakcją odrzucania przeszczepu. Reakcja ta prowadzi do zniszczenia przeszczepu przez naciekające cytotoksyczne komórki biorcy, co w konsekwencji uniemożliwia reinerwację. Przeszczepianie nerwów allogenicznych nie jest więc metodą kliniczną. Ponieważ jednak pozostaje ono perspektywicznie jedyną metodą terapeutyczną w dużych ubytkach nerwów, prowadzone są badania doświadczalne i kliniczne mające na celu wyjaśnienie ciągle niejasnego mechanizmu odrzucania przeszczepu nerwu i ograniczenie tej reakcji.

Antygenowość nerwów obwodowych

Nerw obwodowy posiada antygeny transplantacyjne. Wykonano szereg badań podstawowych mających na celu ich zlokalizowanie. W badaniach z użyciem mikroskopu elektronowego stwierdzono, że komórki jednojądrzaste biorcy naciekające przeszczep allogeniczny, „atakują” osłonki mielinowe włókien osiowych (Das Gupta 1967; Pollard, Fitzpatrick 1973; Pollard, McLeod 1980). W przeszczepach poddanych zwyrodnieniu wstępnemu, (predegeneration) przed przeszczepieniem, przez okres co najmniej 3 tygodni, tj. w czasie dostatecznie długim do uprzątnięcia przez makrofagi fragmentów osłonki mielinowej, po przeszczepieniu nacieczenie przeszczepu allogenicznego przez komórki jednojądrzaste biorcy zmniejsza się bardzo znacznie (Verhoog, Van Bekkum 1971). Fakty te przemawiają za tym, że jedną z lokalizacji antygenów transplantacyjnych w allogenicznym przeszczepie nerwu obwodowego są osłonki mielinowe włókien osiowych wytworzone przez komórki Schwanna. Błona podstawna komórek Schwanna tworząca „rurki neurolemmalne” najprawdopodobniej nie zawiera antygenów transplantacyjnych (Aquayo, Bray 1980). O lokalizacji antygenów transplantacyjnych w *epineurium* świadczą doświadczenia przeprowadzone przez Levinthala i Browna (1978) oraz przez Levinthala i wsp. (1978 a,b). Przeszczep allogeniczny

pozbawiony *epineurium* wykazywał znacznie mniejsze naciekanie przez limfocyty niż przeszczep pełnej grubości. Wtórne odrzucanie allogenicznego przeszczepu skóry (second set rejection) u szczurów, którym 17 dni przed przeszczepieniem skóry przeszczepiono allogeniczny nerw obwodowy wystąpiło o jeden dzień później w grupie, w której przeszczep nerwu pozbawiony był *epineurium*.

Proces odrzucania przeszczepu

Świeży przeszczep allogeniczny nerwu obwodowego wywołuje reakcję biocy — odrzucanie przeszczepu. Immunologiczny charakter tej reakcji potwierdzają prace doświadczalne. W doświadczeniach na szczurach (Verhoog, Van Bekkum 1971), oceniano naciekanie fragmentu allogenicznego przeszczepu nerwu obwodowego przez komórki jednojądrzaste. Zmiany oceniano w arbitralnie przyjętej skali 4-stopniowej. We wszystkich przeszczepach allogenicznych stwierdzono znaczny naciekanie komórkowe, natomiast przy zastosowaniu przeszczepu autologicznego nie stwierdzono naciekania przez komórki jednojądrzaste. Wstępne uczulenie (preimmunizacja) biorcy przeszczepu allogenicznego nerwu obwodowego przeszczepem skóry dawcy, lub homogenatem nerwu allogenicznego przyspiesza odrzucanie allogenicznego przeszczepu nerwu. Odrzucanie wtórne allogenicznego przeszczepu skóry po wstępnym uczuleniu homogenatem nerwu allogenicznego jest szybsze (8,5 dnia) niż w grupie kontrolnej — bez preimmunizacji (11 dni). Reakcja odrzucania polega na naciekanii przeszczepu przez komórki jednojądrzaste (Sterling 1959; Das Gupta 1967; Sunderland 1968; Pollard, Fitzpatrick 1973a, b; Comtet, Revillard 1979, 1981; Aquayo 1981a). Do komórek tych należą małe limfocyty, „aktywowane” duże limfocyty pyronino-dodatnie, dojrzałe i niedojrzałe komórki plazmatyczne, aktywowane makrofagi. W czasie reakcji dochodzi do zniszczenia struktury przestrzennej przeszczepionego nerwu allogenicznego. Po 4 dniach od operacji stwierdzano obecność małych limfocytów i makrofagów między aksonami ulegającymi fragmentacji. Komórki te atakują głównie osłonkę mielinową włókien osiowych. Stwierdzano obecność małych limfocytów wokół naczyń włosowatych nerwu. Reakcja ta osiąga szczyt około 12 dnia po przeszczepieniu nerwu (Das Gupta 1967; Pollard, Fitzpatrick 1973 a; Comtet, Revillard 1979, 1981). Po 20 dniach stwierdzano nadal dużą ilość limfocytów we wszystkich strukturach przeszczepionego nerwu allogenicznego. Część limfocytów naciekających przeszczep ulegała transformacji, zwiększały one swoją objętość, miały większą ilość cytoplazmy i siateczki śródplazmatycznej. Często stwierdzano ścisłe połączenia między limfocytami a dużymi makrofagami, przez mostki cytoplazmatyczne (Pollard, Fitzpatrick 1973a). Od około 25 dnia po dokonaniu przeszczepu wzrastała ilość dojrzałych komórek plazmatycznych, znajdowały się one zwykle na zewnątrz rurek

neurolemmalnych utworzonych z błony podstawnej komórek Schwanna. Począwszy od około 20 dnia po przeszczepieniu cechą uderzającą w obserwacjach przeprowadzonych w mikroskopie elektronowym był znaczny wzrost ilości kolagenu między rurkami neurolemmalnymi. Zjawisku temu nie towarzyszył odpowiedni wzrost ilości fibroblastów. Kolagen uciskał rurki neurolemmalne powodując ich załamanie. Po upływie 4—5 miesięcy od transplantacji znaczna część przeszczepu składała się z „załamanych” rurek neurolemmalnych „zatopionych” w masach kolagenu. W odrzuconym przeszczepie nie stwierdzano obecności przetrwałych komórek Schwanna (Pollard, Fitzpatrick 1973a,b). Ocenę reakcji immunologicznej w przeszczepie allogenicznym wykłwał fakt, iż w tym samym czasie zachodziło w nim zwyrodnienie Wallera.

Zwyrodnienie Wallera w przeszczepie autologicznym trwa około 14 dni i przebiega podobnie, jak w dalszym odcinku każdego przerwanego nerwu obwodowego. W allogenicznym przeszczepie nerwu obwodowego stwierdzano obecność nie uprzątniętych fragmentów osłonek mielinowych dłużej, do 25 dni po transplantacji (Sanders 1954). Odkładanie się kolagenu wokół grup włókien osiowych, które zdążyły przerosnąć przez przeszczep allogeniczny, powodowało zjawisko tworzenia się dużej ilości quasi-pęczków. Schroeder i Seifert (1970) określili to jako „neuromatous neurotisation”. Opisane zjawisko upośledzało, zdaniem autorów, unaczynienie przeszczepu. Podczas procesu ostrego odrzucania przeszczepu allogenicznego nerwu, około 12 dni po operacji dochodziło do załamania układu krwionośnego nerwu. Zmiany te stwierdzono w mikroskopie elektronowym, świetlnym (Gupta 1967), a także w ocenie mikroangiograficznej układu krążenia przeszczepu allogenicznego (Grochowicz i wsp. 1985).

Metody przedłużania przeżycia allogenicznego przeszczepu nerwu obwodowego

Ponieważ allogeniczny przeszczep nerwu ulega reakcji odrzucania, poszukuje się sposobów na zmniejszenie jego antygenowości. Oprócz prób obniżania antygenowości przeszczepu nerwu przez poddanie go zwyrodnieniu wstępnemu oraz zastosowanie przeszczepów pozbawionych *epineurium* (fascicular graft), stosowano również inne metody. Do metod polegających na denaturacji w roztworach chemicznych przeszczepu allogenicznego przed jego przeszczepieniem należały: przechowywanie w Cialit (Verhoog, Van Bekkum 1971), alkoholu, formalinie (Comtet, Revillard 1981), glicerofosforanie magnezu (Schabadash 1944). Allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego szczura przechowywany w roztworze Cialit 1:5 000 (w destylowanej H₂O), po przeszczepieniu nie wykazywał nacieku limfocytarnego w ogóle (Verhoog, Van Bekkum 1971). Podobnie zachowywały się przeszczepy przechowywane w formalinie (Comtet; Revillard 1981).

Do procesów fizycznych mających na celu obniżenie antygenowości przeszczepów nerwów obwodowych należą: mrożenie, liofilizacja i naświetlanie promieniami jonizującymi. Allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego szczura poddany liofilizacji (przez 6 godz., w liofilizatorze Thermovac, a następnie przechowywany w temp. 0° przez 30 dni) nie wykazywał cech reinerwacji w badaniach elektrofizjologicznych (Buck, Steinmuller 1974). Pozytywne wyniki kliniczne w przeszczepianiu liofilizowanych allogenicznych przeszczepów nerwów obwodowych (Jacoby, Fahlbush 1970), zostały zweryfikowane i poddane bardzo krytycznej ocenie (Sunderland 1968; Milesi 1981). W allogenicznych przeszczepach nerwów obwodowych poddanych naświetlaniu promieniami jonizującymi (25 000 Gy), stwierdzono zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej wyrażonej naciekiem limfocytarnym, w porównaniu ze świeżym przeszczepem allogenicznym. Jednocześnie zaobserwowano opóźnienie w usuwaniu zrębów mieliny, a także zwiększone odkładanie kolagenu z następowym uszkodzeniem struktury przestrzennej nerwu. Limfocyty i makrofaagi były obecne dłużej w naświetlanych przeszczepach allogenicznych, niż w świeżych przeszczepach allogenicznych. Stwierdzono, że przez naświetlany przeszczep długości 4 cm przerosło z kikuta bliższego jedynie kilka regenerujących włókien osiowych o małej średnicy. W przeszczepie tym stwierdzono anomalię polegającą na pojawieniu się w nim włókien mięśniowych. Nie zauważono w nich obecności przetrwałych komórek Schwanna (Pollard, Fitzpatrick 1973b). W innych doświadczeniach z zastosowaniem dawki od 15 do 150 Gy w przeszczepie nerwu obwodowego u szczura stwierdzono niewielki naciek limfocytarny (Verhoog, Van Bekkum 1971), a po zastosowaniu dawki powyżej 1500 Gy zaobserwowano brak nacieku limfocytów (Verhoog, Van Bekkum 1971). W badaniach elektrofizjologicznych po przeszczepieniu 4 cm przeszczepu allogenicznego po uprzednim naświetlaniu (20 000 Gy) po upływie 3 do 11 miesięcy nie stwierdzono cech reinerwacji przez przeszczep. Po zastosowaniu dawki 20 Gy jedynie 1 z 17 obserwowanych przeszczepów wykazywał cechy reinerwacji (Bucko, Steinmuller 1974). Ducker i Hayes (1979) zauważyli reinerwację przez przeszczepy allogeniczne długości 2 cm w 100% oraz w 50% reinerwację przez przeszczepy długości 4 cm. Przeszczepy te naświetlano dawką 20 000 Gy. Singh (1977), w doświadczeniach na psach uzyskał wyniki wskazujące, że pomimo naświetlania dawką 16 600 Gy mocne antygeny transplantacyjne są nadal obecne w allogenicznym przeszczepie nerwu. Wyniki doświadczeń Singha zostały poddane krytycznej ocenie innych autorów (Zalewski, Gulati 1982). W badaniach doświadczalnych Verhoog i Van Bekkum (1971) stwierdzili, że allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego szczura przeszczepiony po mrożeniu w temperaturze -196°C nie wykazuje obecności nacieku limfocytarnego. Po mrożeniu w obecności 15% DMSO ($[\text{CH}_3]_2\text{SO}$ — dwumetylosulfotlenek, środek kriochronny) obserwowano znaczny naciek limfocytarny prze-

szczepu allogenicznego (obserwacje prowadzono po upływie 2 i 4 tygodni po operacji). Zalewski i Gulati (1982) udowodnili, że włókna osiowe nie regenerują przez 4 cm allogeniczny przeszczep nerwu. W doświadczeniach tych przeszczepy mrożono w temp. -70°C przez okres od 3 dni do 6 tygodni. Wymienione metody konserwowania przeszczepu allogenicznego najprawdopodobniej zabijają żywe elementy komórkowe w przeszczepie, szczególnie komórki Schwanna (Pollard, Fitzpatrick 1973b; Milesi 1981). Komórki Schwanna są niezbędne w procesie regeneracji włókien osiowych z kikuta bliższego nerwu przez przeszczep. Udowodniono doświadczalnie, że komórki Schwanna nie migrują z kikuta nerwu biorcy do przeszczepu (Pollard, McLeod 1980; Aquayo 1981a,b). Zaprzecza to wcześniejszym teoriom o możliwości takiej migracji (Sanders 1954).

Obniżenie odpowiedzi biorcy

W doświadczeniach na szczurach wykazano, że zarówno w układzie dużych (szczepy Brown Norway do Fischer), jak i małych (szczepy Fischer do Levis) niezgodności antygenowych między dawcą a biorcą, włókna osiowe regenerują przez świeży allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego najdalej do 2 cm (Zalewski, Silvers 1980). Wywołanie tolerancji immunologicznej u biorcy allogenicznego przeszczepu nerwu obwodowego, przez podanie noworodkom szczurzym Levis 10^8 komórek szpiku pobranych od hybryd. (Levis x Brown Norway) F_1 , pozwala na regenerację aksonów przez przeszczep długości 4 cm. Zniesienie tolerancji uzyskane przez wstrzyknięcie zawiesiny węzłów chłonnych dawcy nerwu, powoduje degenerację włókien osiowych w przeszczepie allogenicznym (Zalewski i wsp. 1981). Stwierdzono zależność między zgodnością w zakresie antygenów transplantacyjnych i wynikami przeszczepiania allogenicznych nerwów obwodowych u psów (Singh 1977). Inną metodą obniżenia odpowiedzi biorcy przeszczepu jest zastosowanie immunosupresji za pomocą surowic i środków farmakologicznych. Allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego u szczura poddanego immunosupresji za pomocą surowicy antylimfocytarnej (ALS — 1ml na dobę), azatiopryny (5 mg/kg), i hydrokortyzonu (1,5 mg/kg) wykazuje w badaniach w mikroskopie elektronowym znamienne mniejszy naciek limfocytów i komórek plazmatycznych w porównaniu z przeszczepem kontrolnym bez immunosupresji. Proces regeneracji włókien osiowych zachodzi w tym przypadku podobnie jak w przeszczepie autologicznym. Czas regeneracji był jednak dłuższy, a ilość zniekształconych lub pustych rurek neurolemmalnych w tych przeszczepach była większa. Po 14 tygodniach stwierdzono, że włókna osiowe przerosły przez cały przeszczep długości 4 cm. W przeszczepach tych stwierdzono obecność komórek Schwanna (Pollard, McLeod 1971). W innych doświadczeniach na szczurach z zastosowaniem

immunosupresji (ALG — 20 mg białka na tydzień i azatiopryna, — 4 mg/kg zaobserwowano, że jedynie leczenie wspomagane podawaniem ALG przynosi opóźnienie procesu odrzucania nerwu (Verhoog, Van Bekkum 1971). W doświadczeniach na myszach stwierdzono, że po przerwaniu podawania ALS pojawiają się nacieki komórek jednojądrzastych wokół komórek Schwanna przeszczepu allogenicznego, co prowadzi do ich zniszczenia. Immunosupresję przzerwano w momencie kiedy włókna osiowe przerosły przez cały przeszczep (Aquayo, Bray 1980). W pracy Zalewskiego i Gulati (1981a) na szczurach (przeszczep nerwu Brown Norway do Fisher) z zastosowaniem cyklosporyny A w dawce 25 mg/kg masy ciała podawanej dootrzewnowo, zaobserwowano pomyślną regenerację przez przeszczep allogeniczny długości 4 cm i przeżycie komórek Schwanna w przeszczepie (Zalewski, Gulati 1981a). Jednak w 2 miesiące po odstawieniu podawanej przez 28 dni cyklosporyny A stwierdzono cechy odrzucania przeszczepu allogenicznego. W badaniu histologicznym odrzucone przeszczepy allogeniczne w grupie leczonej cyklosporyną A, nie różniły się od przeszczepów w grupie nie leczonej (Zalewski, Gulati 1981a). Badania Grochowicza i wsp. (1985) na modelu allogenicznego przeszczepu nerwu kulszowego u szczura (przeszczep nerwu August AgB 5 do Wistar AgB 2) wykazały, że zastosowanie cyklosporyny A pozwala na rewaskularyzację przeszczepu allogenicznego i regenerację włókien osiowych przez przeszczep. Ilość aktywowanych limfocytów naciekających przeszczep była mniejsza w przeszczepach, których biocyty zostali poddani immunosupresji cyklosporyną A, w porównaniu z ilością tych komórek w przeszczepie allogenicznym u biocytów nie leczonych. Szczyt odpowiedzi komórkowej był przesunięty u zwierząt leczonych cyklosporyną A na 15 dzień (9 dzień w grupie nie leczonej). Cyklosporynę w dawce 17 mg/kg masy ciała podawano dożylnie od — 1 do 28 dnia po przeszczepieniu nerwu. Po przerwaniu leczenia cyklosporyną A dochodziło do stopniowego zmniejszania ilości naczyń w przeszczepie jednak 60 dni po przerwaniu podawania leku obserwowano nadal częściowo zachowane elementy zewnątrz- i wewnątrzpochodnego układu naczyniowego nerwu. Przeszczep ulegał stopniowo częściowemu zwłóknieniu, pęczki przedzielane były pasmami tkanki łącznej. Jednak w 60 dni po przerwaniu leczenia immunosupresyjnego stwierdzano cechy reinerwacji kikuta dalszego nerwu. W przeszczepach allogenicznych, których biocyty nie byli poddani leczeniu immunosupresyjnemu cyklosporyną A nie stwierdzano reinerwacji kikuta dalszego nerwu.

Kliniczne nadzieje pomyślnego przeszczepiania nerwów allogenicznych związane są z lekami immunosupresyjnymi o ograniczonym działaniu ubocznym wynikającym z obniżenia ogólnej odporności. Rozwój metod określania zgodności antygenów transplantacyjnych stwarza potencjalną możliwość zastosowania przeszczepu wywołującego najmniejszą reakcję

biorcy. Próby hodowli komórek Schwanna *in vitro* są ciągle dalekie od pomyslnych wyników, które pozwoliłyby na ich użycie w przeszczepach poddanych uprzednio konserwacji. Zagadnienie odrzucania allogenicznych przeszczepów nerwów wymaga dalszych badań podstawowych.

АЛЛОГЕННЫЙ ТРАНСПЛАНТАТ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО НЕРВА

Резюме

Нынешняя наглядная статья обсуждает настоящее состояние знаний и исследовательских проблем в области трансплантации аллогенных периферических нервов. Она заключает в себе обсуждение проблемы антигенности периферических нервов и иммунологической реакции отбрасывания трансплантата и разбирает метод продления пережития аллогенного трансплантата.

PERIPHERAL NERVE ALLOGRAFT

Summary

Up-to-date knowledge, research problems and new trends in peripheral nerve allografting are critically reviewed. Nerve antigenicity, rejection phenomena, and experimental methods of peripheral nerve allograft survival time prolongation are discussed.

PIŚMIENICTWO

1. Aquayo A. J.: Schwann cell survival in auto, allo and xenografts. W: Post-traumatic peripheral nerve regeneration. Red. A. Gorio, Raven Press, New York, 1981a, 319—324.
2. Aquayo A. J.: The xenographic graft model. W: Posttraumatic peripheral nerve regeneration. Red. A. Gorio, Raven Press, New York, 1981 b, 361—364.
3. Aquayo A. J., Bray G. W.: Nerve repair and regeneration. Red don L. Jewett, H. R. Mc Carrol, Mosby, St. Louis, 1980, 68.
4. Bucko C. D., Steinmuller D.: Reinnervation after orthotopic grafting of peripheral nerve segments in inbred rats. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1974, 53, 426—331.
5. Comtet J. J., Revillard J. P.: Peripheral nerve allografts. *Transplantation*, 1979, 28, 103—106.
6. Comtet J. J., Revillard J. P.: Nerve allografts. *Transpl. Clin. Immunol.* Vol. 13, Amsterdam, 1981, 161—168.
7. Das Gupta T. K.: Mechanism of rejection of peripheral nerve allografts. *Surg. Gyn. Obstet.*, 1967, 125, 1050—1068.
8. Ducker T. B., Hayes G. J.: Experimental studies in the dog and Chimpanzee to define homograft limitations. *J. Neurosurg.*, 1979, 32, 236—243.
9. Grochowicz P., Hettlage R., Schatzl M., Hammer C., Brendel W., Olszewski W. L.: Immunosuppression in nerve allografting — analysis of revascularization and cellular infiltrates. *Transplantation Proc.*, 1985, 17, 675—677.
10. Jacoby W., Fahlbush R.: Überbrückung peripherer Nervendefekte mit liophilisierten und desantigenisierten homologen Transplantaten. *Münch. Med. Wschr.*, 1970, 112, 586—589.

11. Levinthal R., Brown J.: Fascicular nerve allograft evaluation. Part I. Comparison with autografts by light microscopy. *J. Neurosurg.*, 1978, 48, 423—427.
12. Levinthal R., Brown J., Rand R. W.: Fascicular nerve allograft evaluation. Part II. Comparison with whole nerve allograft by light microscopy. *J. Neurosurg.*, 1978a, 48, 428—433.
13. Levinthal R., Brown J., Rand R. W.: Preliminary observation on the immunology of nerve allograft rejection. *Surg. Gyn. Obstet.*, 1978b, 146, 57—58.
14. Milesi H.: *Nerventransplantation. W: Transplantationschirurgie.* Red. H. Pichlmayr, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1981, 1009.
15. Milesi H., Ganglberger J., Berger A.: Erfahrungen mit der Mikrochirurgie peripherer Nerven. *Chir. Plast. Reconstr.*, 1967, 3, 47—59.
16. Milesi H., Berger A., Meissl G.: Experimentelle Untersuchungen zur Heilung durchtrennter peripherer Nerven. *Chir. Plast.*, 1972, 1, 174—179.
17. Miyamoto Y.: Experimental studies on repair of peripheral nerves. *Hiroshima J. Med. Sci.*, 1979, 28, 87—93.
18. Miyamoto Y., Tsuge K.: Grafting versus end to end coaptation of nerves. W: *Posttraumatic peripheral nerve regeneration.* Red. E. Gorio, Raven Press, New York 1981, 351—357.
19. Miyamoto Y., Watari S., Tsuge K.: Experimental studies on the effects of tension on intraneural microcirculation in sutured peripheral nerves. *Plast. Reconstr. Surg.*, 1979, 63, 398—403.
20. Pollard J. D., Fitzpatrick L.: An ultrastructural comparison of peripheral nerve allo- and autografts. *Acta neuropath.*, (Berl.) 1973a, 23, 152—166.
21. Pollard J. D., Fitzpatrick L.: A comparison of the effects of irradiation and immunosuppressive agents on regeneration through peripheral nerves allografts. An ultrastructural study. *Acta neuropath.* (Berl.), 1973b, 23, 166—180.
22. Pollard J. D., McLeod J. G.: An assesment of immunosuppressive agents in experimental peripheral nerve transplantation. *Surg. Gyn. Obstet.*, 1971, 132, 839—845.
23. Pollard J. D., McLeod J. G.: Nerve grafts in the trembler mouse. *J. Neurol. Sci.*, 1980, 46, 373—382.
24. Sanders F. K.: The preservation of nerve grafts. W: *Preservation and transplantation of normal tissues.* Ciba Found. Symposium, J. and A. Churchill Ltd., 1954, 175.
25. Schabadash A.: Principles of the method for compensating for nerve deficiency by grafting prepared nervous tissue. *C.R. Acad. Sci. U.R.S.S.* 1944, 43, 40.
26. Schroeder J. M., Seifert K. E.: Die Feinstruktur der neuromatosen Neurotisation von Nerventransplantate. *Virchovs Arch. Abt. 13 Zellpath.* 1970, 5, 219—235.
27. Singh R.: Nerve allografts and histocompatibility in dogs. *J. Neurosurg.*, 1977, 47, 737—743.
28. Sterling B.: Transplantation of nerves. W: *Transplantation of tissues.* Red. L. A. Peer, Williams and Willkins Co, New York 1959, 247—268.
29. Sunderland S.: *Nerves and nerve injuries.* E. and S. Livingstone Ltd, London 1968, 603—636.
30. Van Beek A., Kleinert H.: *Peripheral nerve injuries and repair.* W: *Micro-neurosurgery.* C. V. Mosby Co. St. Louis 1979.
31. Verhoog B. D., van Bekkum D. W.: Peripheral nerve allografts: Modification of allograft reaction using experimental model in rats. *Transplantation Proc.*, 1971, 3, 591—593.
32. Zalewski A., Silvers W. K.: An evaluation of nerve repair with nerve allografts in normal and immunologically tolerant rats. *J. Neurosurg.*, 1980, 52, 557—563.

33. Zalewski A., Gultati A. K.: Survival of nerve and Schwann cells in allografts after cyclosporin A treatment. *Exp. Neurol.*, 1981a, 70, 219—225.
34. Zalewski A., Gulati A. K.: Rejection of nerve allografts after cessation of immunosuppression with cyclosporin A. *Transplantation* 1981b, 31, 88—89.
35. Zalewski A., Gulati A. K.: Evaluation of histocompatibility as a factor in the repair of nerve with a frozen nerve allograft. *J. Neurosurg.*, 1982, 56, 550—554.
36. Zalewski A., Gulati A. K., Silvers W. K.: Loss of host axons in nerve allografts after abolishing immunological tolerance in rats. *Exp. Neurol.*, 1981, 72, 502—506.

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

JUDITA ORENDÁČOVÁ, MIKULÁŠ CHAVKO, ANNA FERČÁKOVÁ,
DARINA KLUCHOVÁ, MARTIN BONA, JOZEF MARŠALA

THE FINE STRUCTURE OF GRANULAR ENDOPLASMIC
RETICULUM IN NEURONS AND ^{14}C -LEUCINE INCORPORATION
INTO PROTEINS IN SPINAL GANGLIA OF DOG AFTER ISCHEMIA

Neurobiological Institute, Center of Physiological Sciences,
Slovak Academy of Sciences, Kosice, Czechoslovakia

The endoplasmic reticulum is a well developed organelle in the nerve cells. The arrangement and morphology of its components vary in different neuronal types. According to the arrangement of the granular endoplasmic reticulum (GER), it is generally considered that neurons of spinal ganglia are divided into large light cells — A type and dark ones — B type (Hossack, Wyburn 1954; Andres 1961). This differentiation is associated with an enormous increase of the neurofilaments content in light cells (Yamadori 1970), which becomes more distinct in the first few postnatal days.

Electron microscopic observation of spinal ganglia neurons reveals two basic varieties of GER arrangement. It may consist of flattened sacs stacked in parallel, straight or curved arrays. The interconnection between adjacent sacs is minimal. More often GER consists of short and commonly anastomosing sacs or cisterns. Both varieties can be arranged in focal concentration (A type) or may be diffusely distributed through the cytoplasm (B type). The organization of GER is also variable in single spinal ganglia neurons but the pattern in every cell tends to be similar (Lieberman 1976). GER, no matter how arranged, is always associated with a great number of free ribosomes which are considerably more numerous than membrane-attached ribosomes (by a factor of at least 4:1 and perhaps as much as 20:1). The free ribosomes are in polysomal arrays (Palay, Palade 1955).

In the present paper we devoted attention to some morphological modifications of GER and biochemical changes of proteosynthesis in spinal ganglia neurons after occlusion of the abdominal aorta in dogs.

MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out on adult dogs of both sexes. Partial ischemia of the spinal cord and spinal ganglia was induced under Thio-pental anesthesia (30 mg/kg b.w.) by occlusion of the abdominal aorta just below the renal arteries for 2 and 4 hours.

We controlled the arterial blood pressure in the abdominal aorta above and below the occlusion. A catheter was introduced via femoral artery with two recorders and with a balloon inbetween. The arterial blood pressure recorder LMP 102-Tesla was connected with a measurer LDP 102-Tesla and a TZ 4 100 registerer.

For electron microscopic observation the animals were perfused with a mixture of 1% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate buffer. The L₆₋₇ dorsal roots ganglia were postfixed with 1% OsO₄ and treated routinely for electron microscopy. The blocks were embedded in Durcupan ACM. Thin sections were cut with an LKB ultra-microtome, stained with lead citrate and examined with a Tesla BS 500 electron microscope.

For biochemical observation 10 µl of ¹⁴C-leucine (specific activity 7.7 GB g/mmol, ÚVVVR Praha) was injected into the L₆₋₇ ganglia immediately after tightening the ligature. The ganglia were removed after 2 or 4 hours, washed in physiological solution and homogenized in 10% TCA heated to 90°C, ethanol, ethanol:ether (2:1) and ether. It was so-sed accordingly. The homogenate was centrifuged at 10 000 g for 15 minutes and the pellet was washed twice with 5% TCA. Supernatants were pooled and their radioactivity was measured after adding to Insta-Gel (Packard). The insoluble remainder was washed again with 5% TCA heated to 90°C, ethanol, ethanol:ether (2:1) and ether. It was solubilized thereafter in Soluen-350 (Packard) and toluene scintillator was added. Radioactivity of the sediment was measured in Tri-Carb 2425 (Packard). The results were statistically evaluated by Student's t-test.

RESULTS

Ultrastructural study

The most common early reaction of GER was its transition to an agranular form, which is regularly seen in chromatolytic neurons. Such neurons had usually a displaced nucleus and reduction of GER, of course, but retained their polysomal configuration. We noticed these changes exclusively in the cytoplasm of light neurons (Fig. 1). In more severe neurons we observed also vacuolization of the peripheral part of the cytoplasm.

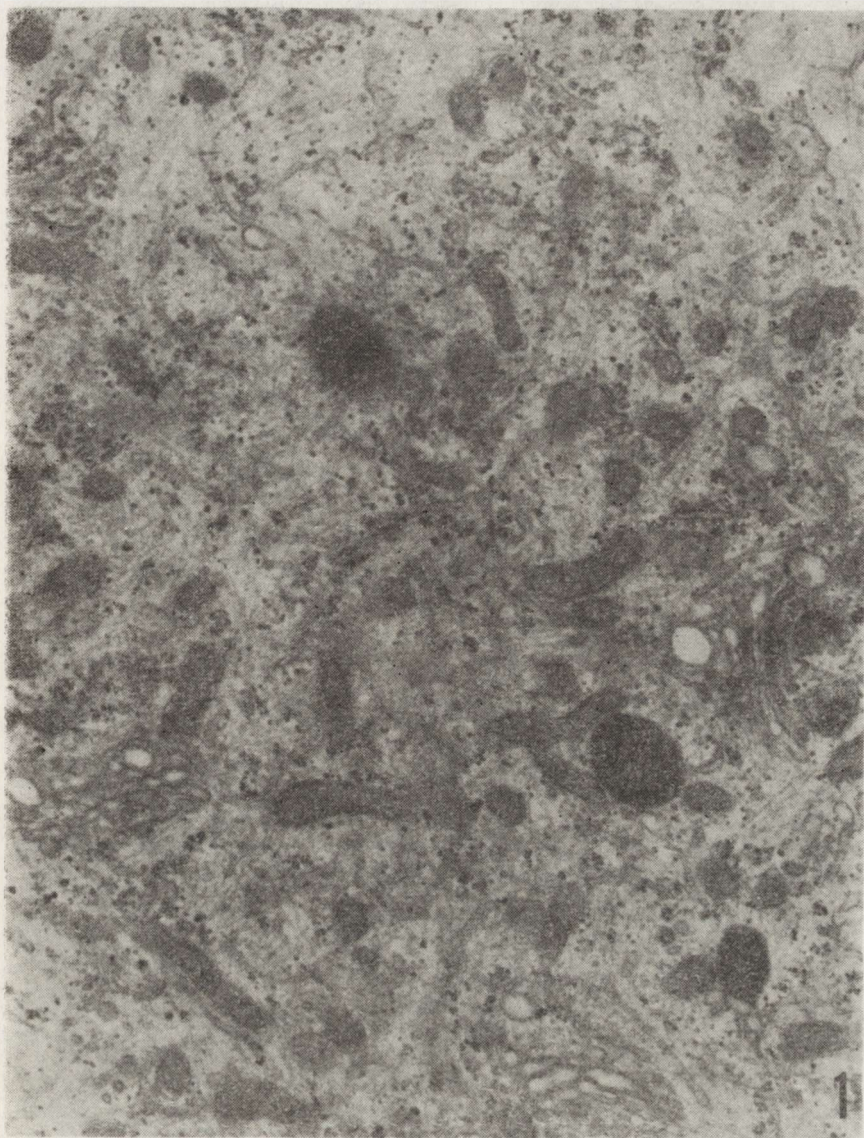


Fig. 1. Chromatolysis in light neuron of spinal ganglion. $\times 10\ 000$

Ryc. 1. Chromatoliza jasnego neuronu zwoju rdzeniowego. Pow. $10\ 000 \times$

Occasionally the cisterns of GER were smooth, free of ribosomes, and ran approximately parallel. The lumina of these cisterns were more reduced in comparison with those shown in Figure 1. The polysomes were arranged regularly between flattened cisterns (Fig. 2). The distribution of such modified granules of Nissl's substance was without any predilection in the cytoplasm of light neurons. In this case too the other organelles were well preserved. We noticed fusion of these flattened ribosome-free membranes in some neurons. The degree of fusion varied in dif-

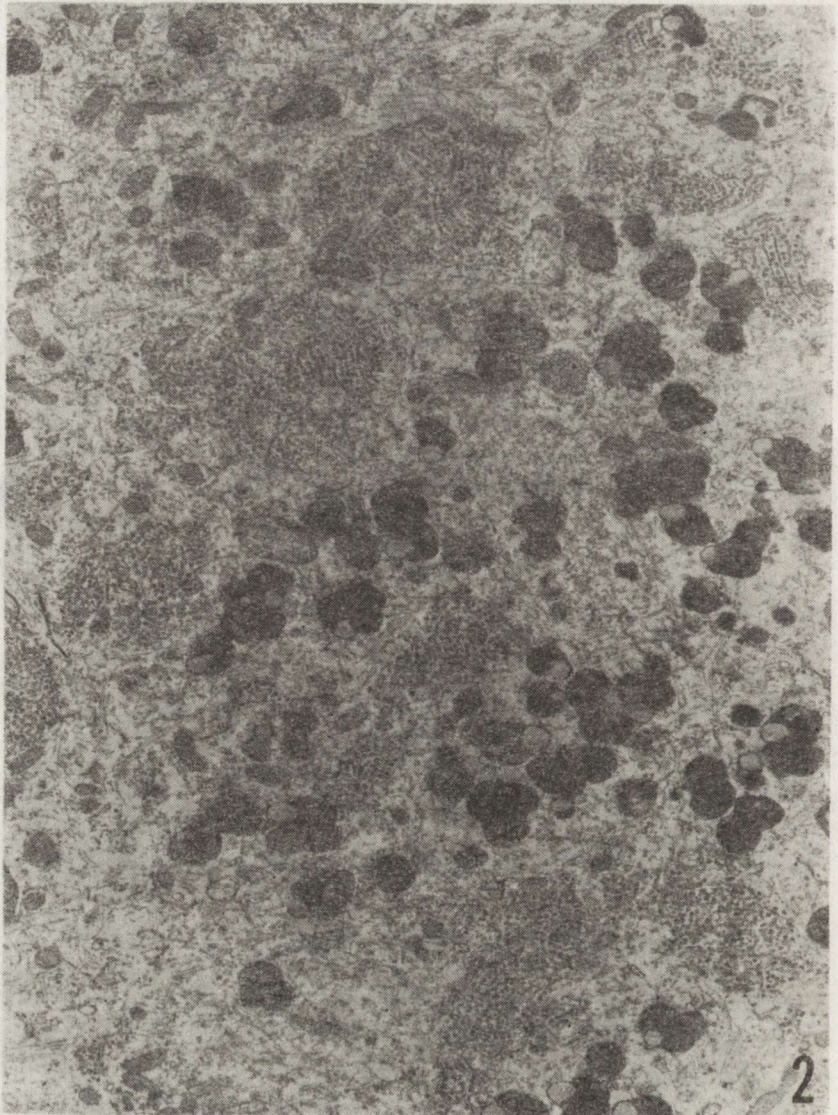


Fig. 2. Parallel arrays of ribosome-free endoplasmic reticulum cisterns. $\times 4000$
Ryc. 2. Równoległe ułożenie zbiorników siateczki śródplazmatycznej pozbawionych rybosomów. Pow. $4000 \times$

ferent neurons. It was in many cases as pronounced as seen in Figure 3. Except after 4 hours of ischemia they formed wide dark fascicles with visible single stripes.

Beside the described changes we observed also some other modifications of GER arrangement, concerning the dilation and inner content of its cisterns. The incidence of dilated GER cisterns was higher after 4 hours of ischemia than after 2 hours. The individual cisterns vacuolization within the cytoplasm of one nerve cell was heterogenous and appe-

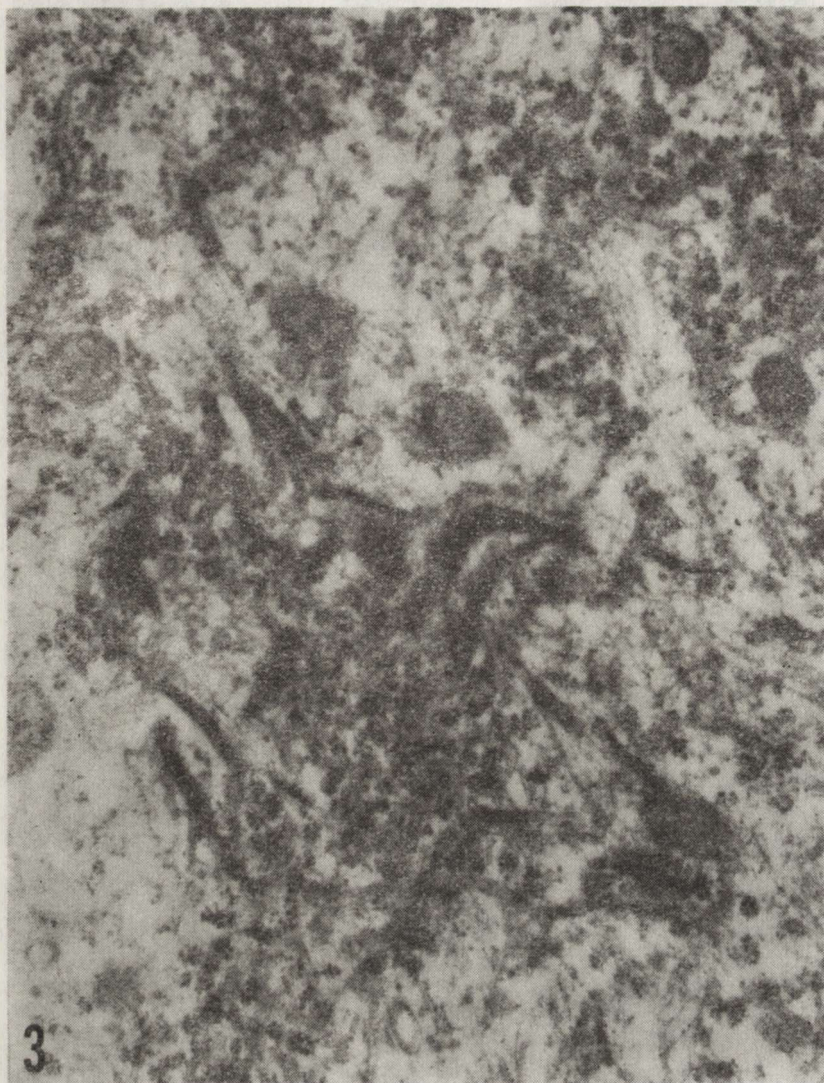


Fig. 3. Fusion of endoplasmic reticulum cisterns after 4 hours of ischemia. $\times 14\,000$
Ryc. 3. Zlewianie się zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej po 4 godz. niedokrwienia. Pow. $14\,000 \times$

ared focally. Inside the dilated cisterns filamentous material of moderate electron density was present. Cases of such marked filamentous content as seen in Figure 4 were rare. The ribosomes were still attached to such modified membranes of GER.

We seldom noticed microtubular formations inside the cisterns of GER (Fig. 5). Thus modified cisterns occurred focally also in the relatively well preserved neurons. The ribosomes were also attached to single

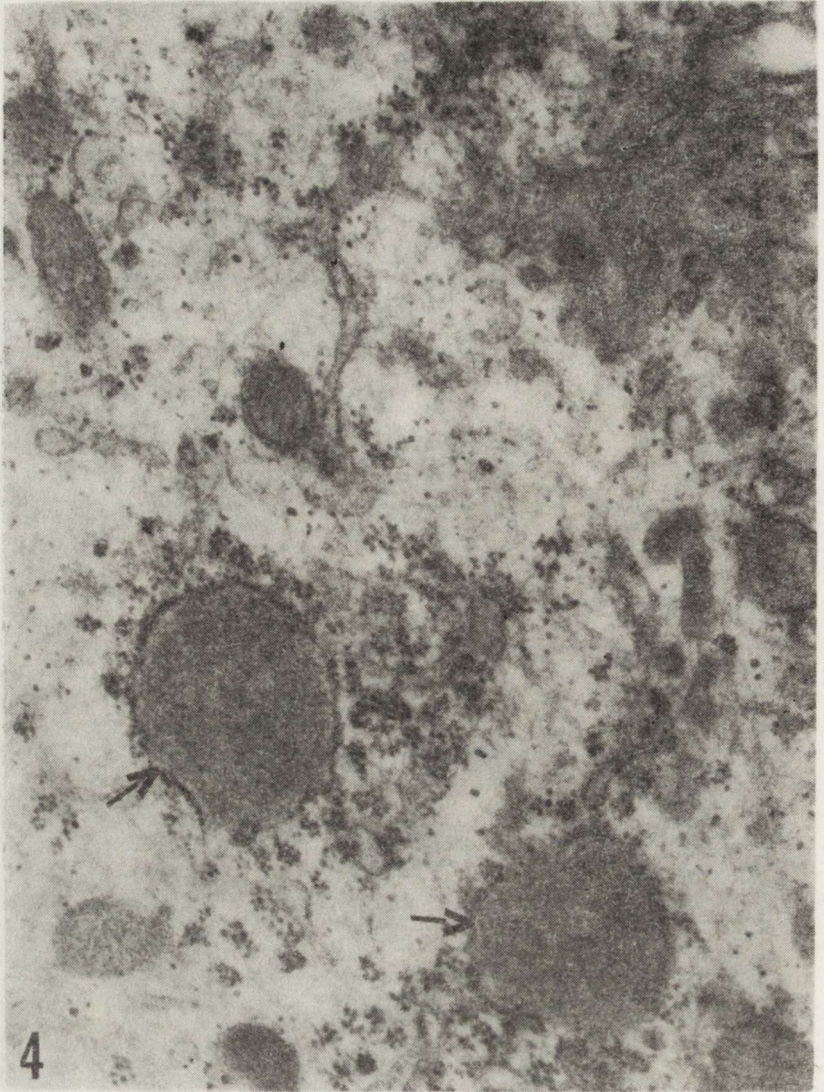


Fig. 4. Fluffy electron-dense material inside single cisterns of endoplasmic reticulum (arrow). $\times 14\,000$

Ryc. 4. Piankowy elektronowo-gęsty materiał wewnątrz pojedynczych zbiorników siateczki śródplazmatycznej (strzałka). Poow. $14\,000 \times$

GER membranes. Each of these cisterns was filled with either round or tubular formations, according to the cutting direction. In the longitudinal sections of tubules we could see their parallel arrangement. In perpendicular sections the fine structure of the tubular wall was prominent. It consisted of round small subunits the outer diameter of which was about 25 nm.

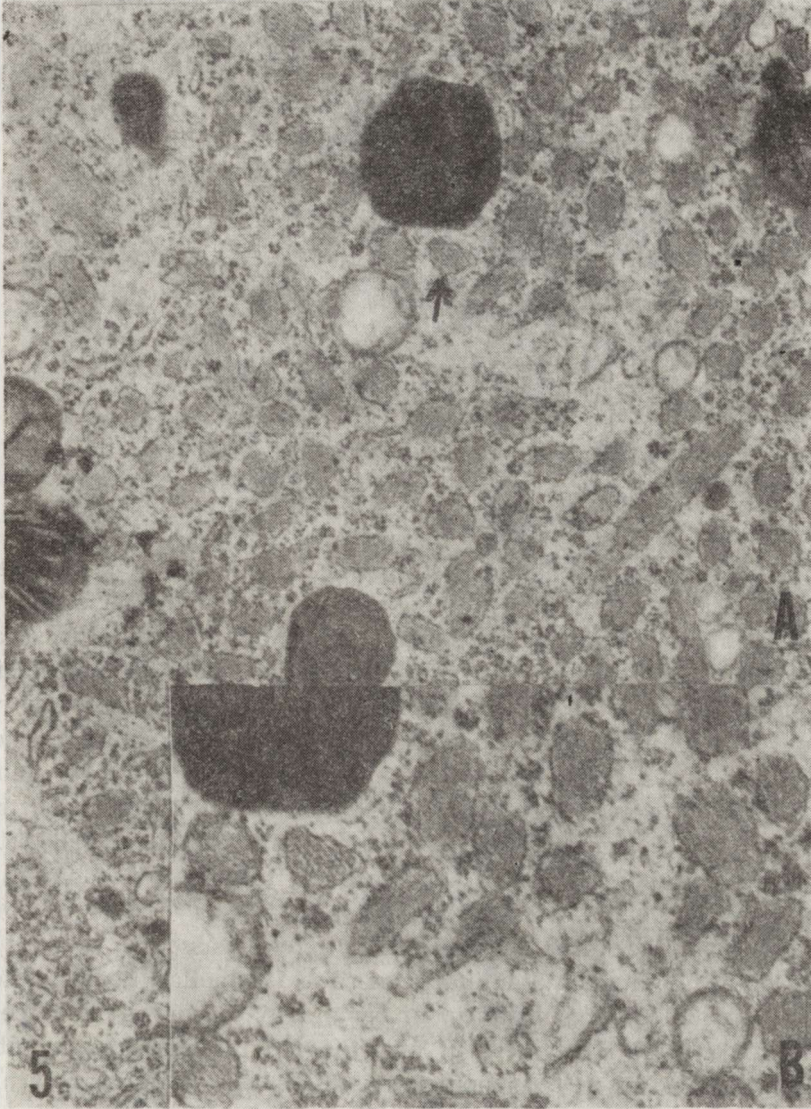


Fig. 5. Microtubular formations inside the cisterns of GER (arrow). A — $\times 8\,000$.
B — Detail of the same case. $\times 16\,000$

Ryc. 5. Struktury mikrotubularne wewnątrz zbiorników GER (strzałka). A — pow.
 $8\,000 \times$. B — Wycinek tego samego zdjęcia. Pow. $16\,000 \times$

Biochemical study

Proteosynthesis in spinal ganglia during ischemia was observed by incorporation of ^{14}C -leucine into the spinal ganglia *in vivo*. The amount of radioactivity bound in the protein sediment decreased after 2 hours of ischemia by 50% as compared with control animals. The decrease of the ratio between bound and free radioactivity continued after 4 hours of ischemia (Tab. 1).

Table 1. Ratio between bound and free radioactivity in spinal ganglia of dogs after ^{14}C -leucine injection

Tabela 1. Stosunek radioaktywności związanej i niezwiązanej w zwojach rdzeniowych psów po wstrzyknięciu ^{14}C -leucyny

Experimental group Grupa doświadczalna		n	Ratio of radioactivity Stosunek radioaktywności
control kontrola	2 h godz.	4	3.69 ± 0.42
ischemia niedokrwienie	2 h godz.	4	$1.92 \pm 0.28^+$
control kontrola	4 h godz.	4	6.28 ± 0.53
ischemia niedokrwienie	4 h godz.	4	$4.45 \pm 0.40^+$

$+P < 0.05$

DISCUSSION

GER represents a dynamic system the morphology of which reflects to a considerable extent the metabolic activity of neurons. Under different experimental conditions the arrangement of GER undergoes various changes and modifications. During the first two hours after occlusion of the abdominal aorta the number of neurons showed chromatolysis which was more pronounced in the peripheral parts of light neurons. The higher sensitivity of light neurons to ischemia is noticeable also in morphometric analysis (Ferčáková et al. 1979; Žigová et al. 1982) and in microdensitometric observation of RNA content (Mitro et al. 1981). After ischemia there was a significant decrease of RNA content only in light neurons of spinal ganglia in dogs.

The flattened cisterns of GER seen in close association with polyosomes resemble the pentalaminar cisterns of lamellar bodies described by Le Beux (1972) in substantia nigra and in sensory ganglia cells by Rosenbluth (1962), Krajčí (1972) etc. Single ribosome-free membranes of GER tend to fuse, a phenomenon which was more distinct after 4 hours ischemia in comparison to the earlier stages. We considered the wide dark fascicles as fused afunctional cisterns of GER.

Up till now the intracisternal microtubules have been described in hepatocytes, glia and nerve cells (Richter et al. 1966; Halata, Lange 1973). Suzuki et al. (1978) presumed a dependence of microtubule formation on the metabolic and enzymatic defects in aged dogs. In normal conditions the microtubules are formed from the tubulin and dynein outside the GER cisterns. Different metabolic disturbances, however, can lead to an abnormal formation of microtubules inside the cisterns (Suzuki et al. 1978).

The significant deviation of incorporation into the protein fractions of molecular weight about 45 000 and 70 000 (Kluchová et al. 1983)

should provide evidence either for decreased synthesis or increased degradation of neurofilament proteins (Tashiro, Ishizaki 1982). These biochemical changes could be manifested morphologically as an abnormal presence of filamentous or tubular formations inside the cisterns of GER.

In comparison with our previous biochemical results the 50% decrease of ^{14}C -leucine incorporation in spinal ganglia is the consequence of a similar decrease of ATP concentration after ligation of the abdominal aorta (Chavko, Danielisová 1980).

Recording of the arterial blood pressure showed the persistence of minimal blood flow in the aorta below the occlusion. Total ischemia of the spinal lumbar cord can be achieved only by simultaneous ligation of the extraspinal and intraspinal arteries (Fried, Aparicio 1972). In conditions of partial ischemia due to elimination of extraspinal arteries, GER of spinal ganglia neurons in dog display diverse subparticles arrangement in consequence of biochemical changes. The stage and intensity of these changes are dependent on the duration and severity of ischemia.

ULTRASTRUKTURA ZIARNISTEJ SIATECZKI ŚRÓDPLAZMATYCZNEJ I WBUDOWYWANIE ^{14}C -LEUCYNY W ZWOJACH RDZENIOWYCH PSA W NIEDOKRWIENIU

Streszczenie

Badano ultrastrukturę ziarnistej siateczki śródplazmatycznej w neuronach zwojów rdzeniowych psów, którym na 2 i 4 godziny podwiązano aortę brzuszna. Po 2- i 4-godzinym niedokrwieniu obserwowano zwiększenie ilości wolnych rybosomów i skupianie się zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej. Wewnątrz zbiorników siateczki śródplazmatycznej obserwowano niekiedy obecność filamentarnych i tubularnych struktur.

Po wstrzyknięciu ^{14}C -leucyny bezpośrednio do niedokrwionych zwojów rdzeniowych, radioaktywność frakcji, uzyskanych po rozdziale białka na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS, była niższa. Zmiany strukturalne i biochemiczne były bardziej nasilone po 4-godz. niedokrwieniu.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ГРАНУЛЕЗНОЙ ВНУТРИПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ СЕТОЧКИ И ВСТРОЕНИЕ ^{14}C -ЛЕЙЦИНА В СПИННОМОЗГОВЫЕ УЗЛЫ СОБАКИ В ИШЕМИИ

Резюме

Авторы исследовали ультраструктуру гранулезной внутриплазматической сеточки в нейронах спинномозговых узлов собак, которым лигировано на 2 и 4 часа брюшную аорту. После 2- и 4-часовой ишемии они наблюдали увеличение количества свободных рибосомов и концентрацию цистерн гладкой внутриплазматической сеточки. Внутри цистерн внутриплазматической сеточки иногда наблюдалось наличие филаментарных и тубулярных структур.

После введения ^{14}C -лейцина непосредственно в ишемические спинномозговые узлы радиоактивность фракций, полученных после разделения белка на полиакриламидном желе при наличии SDS, была низшей. Структурные и биохимические изменения были более интенсивны после 4-часовой ишемии.

REFERENCES

1. Andres K. H.: Untersuchungen über den Feinbau von spinal Ganglien. *Z. Zellforsch.*, 1961, 55, 1—48.
2. Chavko M., Danielisová V.: Energy metabolism in the spinal cord after prolonged partial ischemia and recirculation. *Physiol. bohemoslov.*, 1980, 29, 49—54.
3. Ferčáková A., Orendáčová J., Maršala J.: Ultrastructural changes in spinal ganglia following ligation of the abdominal aorta. Alteration of neurons. *Folia morphol.*, 1979, 27, 220—225.
4. Fried L. C., Aparicio O.: Experimental ischemia of the spinal cord: Histologic studies after anterior spinal arteria occlusion. *Neurology (Minneapolis)*, 1973, 23, 289—293.
5. Halata Z., Lange W.: Tubulöse Formationen in Zisternen des Ergastoplasmas in der Glia der Kleinhirnrinde beim Javaren-Affen (*Macaca cynomolgus*). *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1973, 24, 340—344.
6. Hossack J., Wyburn M.: Electron microscopic studies of spinal ganglion cells. *Proc. Roy. Soc. Edinb.* 1954, Sect. 65/II/, 239—250.
7. Kluchová D., Chavko M., Orendáčová J.: Vplyv parciálnej ischémie na štruktúru granulárneho endoplazmatického retikula a syntézu bielkovín v spinálnych gangliách psa. *Biológia (Bratislava)*, 1983, 38, 1087—1097.
8. Krajčí D.: Ultrastructure of the spinal ganglia in adult cat. I. Cytoplasm of perikarya. *Acta Univ. Palac. Olomouc. Fac. med.*, 1972, 61, 45—62.
9. Lieberman A. R.: Sensory ganglia. In: *The peripheral nerve*. Ed. A. Landon, Chapman and Hall Ltd., London 1976, 188—278.
10. Le Beux Y. J.: Subsurface cisterns and lamellar bodies: particular forms of the endoplasmic reticulum in the neurons. *Z. Zellforsch. mikroskop Anat.*, 1972, 133, 327—352.
11. Mitro A., Mozeš Š., Maršala J., Marossy A., Daxnerová Z., Nováková V.: Total content of RNA in individual nerve cells of spinal ganglion during ischemia in dog. *J. Hirnforsch.*, 1981, 22, 217—220.
12. Palay S. L., Palade G. E.: The fine structure of neurons. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1955, 1, 69—88.
13. Richter W. R., Bischoff M. B., Churchill R. A.: An observation of fine tubules within the endoplasmic reticulum in a dog liver. *Z. Zellforsch.*, 1966, 70, 180—184.
14. Rosenbluth J.: Subsurface cisterns and their relationship to the neuronal plasma membrane. *J. Cell. Biol.*, 1962, 13, 405—421.
15. Suzuki Y., Atoji Y., Suu S.: Microtubules observed within the cisterns of RER in neurons of the aged dog. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1978, 44, 155—158.
16. Tashiro T., Ishizaki Y.: A calcium dependent protease selectively degrading the 160 000 Mr component of neurofilaments is associated with the cytoskeletal reparation of the spinal cord and has an endogenous inhibitory factor. *FEBS Lett.*, 1982, 141, 41—44.
17. Yamadori T.: A light and electron microscopic study on the postnatal development of spinal ganglia in rats. *Acta anat. Nippon.*, 1970, 45, 191—205.
18. Žigová T., Ferčáková A., Maršala J.: Morphological investigation of spinal ganglia neurons after aortic ligation. *Proc. Col. S.I.A.*, Prague 1982.
Authors' address: Neurobiological Institute, Center of Physiological Sciences, Slovak Academy of Sciences, 040 01 Košice, Šrobárova ul. 57, Czechoslovakia.

RYSZARD PLUTA

WPLYW PROSTACYKLINY NA ZMIANY
PODSTAWOWYCH PARAMETRÓW FIZJOLOGICZNYCH
W CAŁKOWITYM NIEDOKRWIENIU MÓZGOWIA

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Całkowite niedokrwienie mózgowia powoduje zmiany czynnościowe i strukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym oraz stanowi podłoże zmian patologicznych w narządach wewnętrznych (Pluta 1982). Procesy patologiczne w mózgu są w tej sytuacji następstwem zahamowania dopływu i zalegania krwi w łożysku naczyniowym. Za udziałem tego ostatniego czynnika przemawiają liczne dane wskazujące, że pozostanie w naczyniach mózgowia resztek krwi z zawartą w niej glukozą w czasie niedokrwienia powoduje nasilenie glikolizy i uszkodzenie struktur mózgu przez kwaśne produkty metabolizmu tkankowego (Chiang i wsp. 1968; Hossmann, Olsson 1970). Oprócz tego zatrzymanie krążenia mózgowego prowadzi do wewnątrznaczyniowego zlepiania krwinek i płytek krwi, upośledzającego pełną restytucję krążenia w okresie po niedokrwieniu. Hossmann i wsp. (1980) wykazali, że w czasie niedokrwienia mózgu zjawisko to osiąga największe nasilenie w narządach wewnętrznych.

W doświadczalnych modelach całkowitego niedokrwienia mózgu opisano ponadto występowanie zaburzeń rytmu serca, obniżenia jego objętości wyrzutowej oraz spadki układowego ciśnienia krwi (Kramer, Tuynman 1967; Meinen i wsp. 1975; Kapuściński i wsp. 1980; Pluta, Kapuściński 1980; Pluta i wsp. 1980; Pluta 1982). Według Niegowskiego i wsp. (1978) po niedokrwieniu mózgu rozwija się „zespół zmniejszonego wyrzutu sercowego”. Utrzymanie prawidłowego przepływu krwi w mózgu w tym czasie zależy w znacznej mierze od pojemności wyrzutowej serca oraz wysokości układowego ciśnienia krwi. Nieprawidłowości w tym zakresie przyczyniają się do rozwoju, po niedokrwieniu mózgowia, zjawiska zwanego „no-reflow phenomenon” (Ames i wsp. 1968), prowadzącego do hipoperfuzji mózgu oraz do ograniczenia stopnia i dynamiki restytucji jego czynności.

W związku z tym zaczęto poszukiwać preparatów farmakologicznych, które mogłyby zapobiegać procesom patologicznym w epizodach niedokrwienych mózgu. W ostatnich latach zwrócono uwagę na prostacyklinę (PGI_2), która wydaje się, że może spełniać tę funkcję z dobrym skutkiem (Nowak i wsp. 1983). Prostacyklina jako naturalny produkt ściany tętnic znajduje się w krwi tętniczej. Wykazuje ona dwie podstawowe właściwości biologiczne: rozszerza naczynia krwionośne oraz rozprasza zlepy płytek krwi i przeciwdziała ich tworzeniu. Działanie to wykazano u ludzi i opracowano bezpieczny sposób podawania PGI_2 człowiekowi (Szczeklik i wsp. 1978; Szczeklik 1980). Zastosowano ją także w leczeniu choroby niedokrwiennej kończyn dolnych (Szczeklik i wsp. 1979) oraz w zakrzepicy naczyń siatkówki (Żygulska-Mach i wsp. 1980). Korzystne wyniki lecznicze uzyskane w tych schorzeniach pozwalają przypuszczać, że prostacyklina może znaleźć zastosowanie w leczeniu stanów patologicznych towarzyszących całkowitemu niedokrwieniu mózgowia lub stanowiących jego następstwo.

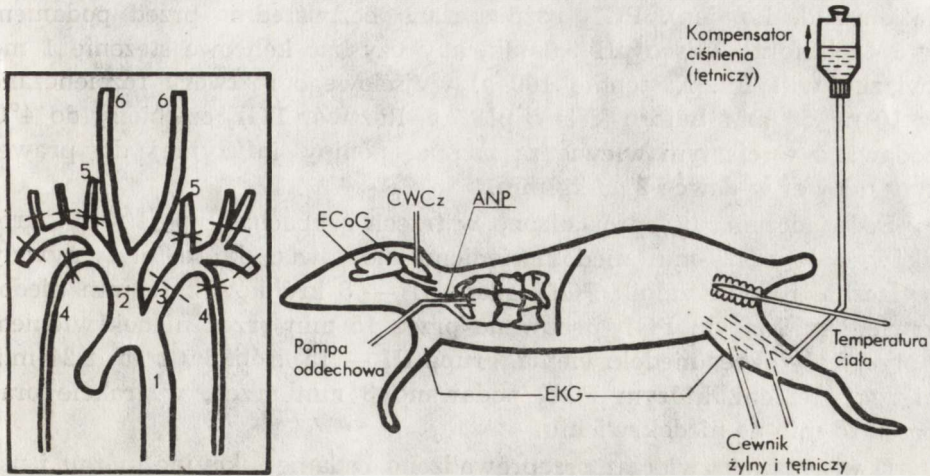
Celem pracy było ustalenie czy prostacyklina podana dożylnie modyfikuje obraz zaburzeń oddechowo-kreżeniowych wywołanych przez całkowite niedokrwienie mózgowia.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 37 królikach rasy mieszanej, samcach o masie ciała 2,4—3,1 kg. Całkowite 15- i 20-min niedokrwienie mózgowia wywoływano przez wewnątrzkratkowe zamknięcie pnia ramiennoślówkowego, lewej tętnicy podobojczykowej oraz obu tętnic piersiowych wewnętrznych, z dojscia nadmostkowego bez wykonywania torakotomii (ryc. 1). W celu uniknięcia obocznego napływu krwi do mózgowia obniżano obwodowe ciśnienie tętnicze do 70—50 mm Hg, metodą kontrolowanego skrwawiania przez tętnicę udową do kompensatora ciśnienia (ryc. 1).

Zwierzęta usypiano pentobarbitem (Nembutal, 35 mg/kg masy ciała) podawanym do żyły brzeżnej ucha, następnie wykonywano tracheostomię i po zwiotczeniu Tricuraniem (3,5 mg/kg masy ciała, dożylnie) wentylowano je sztucznie powietrzem. Podczas doświadczenia podawano w razie potrzeby dodatkowe dawki Nembutalu (0,25 mg), Pyralginy (2,5 ml) i Tricuranu (Pluta 1982).

Przed rozpoczęciem niedokrwienia mózgowia ustalono parametry sztucznej wentylacji płuc tak, aby wartości pO_2 i pCO_2 w krwi tętniczej utrzymywały się w takich samych granicach, jak u zwierząt oddychających spontanicznie w narkozie pentobarbitalowej. Po niedokrwieniu zwierzęta wentylowano mieszaniną powietrza z tlenem przy szybkości przepływu tlenu 0,25—0,5 l/min. Prężność tlenu i dwutlenku węgla oraz



Ryc. 1. Schemat ilustrujący sposób wywołania całkowitego niedokrwienia mózgowia przez zamknięcie tętnic doprowadzających krew. X — klips Heifetza, linia przerywana — podwiązka okresowa, linia ciągła — podwiązka stała. 1 — tętnica główna, 2 — pień ramienno-główny, 3 — tętnica podobojczykowa lewa, 4 — tętnica piersiowa wewnętrzna, 5 — tętnica kręgową, 6 — tętnica szyjna wspólna. ECoG — elektrokortykogram, CWCz — ciśnienie wewnątrzczaszkowe, ANP — aktywność nerwu przeponowego, EKG — elektrokardiogram

Fig. 1. Scheme of induction of complete cerebral ischemia in rabbit by closing of afferent arteries. X — Heifetz's clip, intermittent line — temporary ligature, continuous line — permanent ligature. 1 — aorta, 2 — brachiocephalic trunk, 3 — left subclavian artery, 4 — internal thoracic artery, 5 — vertebral artery, 6 — common carotid artery, ECoG — electrocorticogram, CWCz — intracranial pressure, ANP — activity of phrenic nerve, EKG — electrocardiogram

stężenie jonów wodorowych oznaczano w próbkach krwi pobieranych z tętnicy udowej w 15, 60, 120 i 180 min po niedokrwieniu (przy użyciu aparatu 175 automatic pH/blood gas system firmy Corning).

W czasie niedokrwienia i po niedokrwieniu mózgowia ciśnienie tętnicze krwi utrzymywano za pomocą retransfuzji własnej krwi zwierzęcia oraz dożylniej kroplówki noradrenaliny (2—4 mg noradrenaliny na 100 ml 0,9% NaCl). Zwierzęta poddawano obserwacji klinicznej przez okres co najmniej 3 godz. po niedokrwieniu. Powrót czynności ośrodków naczynioruchowych oceniano na podstawie czasu, od którego ciśnienie tętnicze krwi utrzymywało się bez wspomagania farmakologicznego. Jako wykładnik powrotu czynności oddechowej przyjmowano pojawienie się fazowej aktywności nerwu przeponowego u zwierząt zwiotczonych lub własnego oddechu u zwierząt niezwiotczonych.

Posługując się 8-kanalowym aparatem EEG (Accutrace-8, Beckmann) rejestrowano ECoG, EKG (odprowadzenie II), układowe ciśnienie tętnicze i ciśnienie wewnątrzczaszkowe oraz aktywność nerwu przeponowego (ryc. 1). Temperaturę ciała zwierząt kontrolowano w *rectum*. Czas przygotowania doświadczenia trwał 1—1,5 godz.

Do badań używano prostacyklinę (Epoprostenol-The Wellcome Foundation Ltd, London). PGI₂ rozpuszczano bezpośrednio przed podaniem w 1 M buforze Tris o pH 9,0 tak, aby uzyskać końcowe stężenie 1 mg związku w 1 ml. Następnie 100 µl wyjściowego roztworu rozcieńczano w 10 ml 50 mM buforu Tris o pH 7,5. Roztwór PGI₂ oziębiony do 4°C podawano w ciągłym wlewie za pomocą pompy infuzyjnej do prawej żyły udowej w dawce 2 µg/kg/min.

Doświadczenia przeprowadzono w trzech grupach: grupa I — 14 królików z 15- i 20-min niedokrwieniem mózgowia, które otrzymywały wyłącznie rozpuszczalnik PGI₂, grupa II — 8 królików z 15 min niedokrwieniem, którym PGI₂ podawano przez 15 min przed niedokrwieniem i przez cały okres niedokrwienia, grupa III — 15 królików z 15- i 20-min niedokrwieniem, którym PGI₂ podawano 3 min przed, w trakcie oraz przez 15 min po niedokrwieniu.

U wszystkich zwierząt przeprowadzono badanie sekcyjne mózgu i narządów wewnętrznych. Obliczenia całkowitego CO₂ (TCO₂) dokonywano na podstawie tablic Siggaarda-Andersena (1964). Znamienność statystyczną uzyskanych wyników oceniano z zastosowaniem testu t Studenta.

WYNIKI

Czynność bioelektryczna mózgowia

Zatrzymanie mózgowego przepływu krwi prowadziło we wszystkich grupach doświadczalnych do gwałtownych zmian w czynności bioelektrycznej kory mózgu. Po upływie 11—16s zapis ECoG osiągał linię izoelektryczną. Zanik spontanicznej czynności oddechowej następował po około 3 min. Po 3—6 min ciśnienie tętnicze krwi wykazywało wyraźną tendencję spadkową do poziomu poniżej 50 mm Hg.

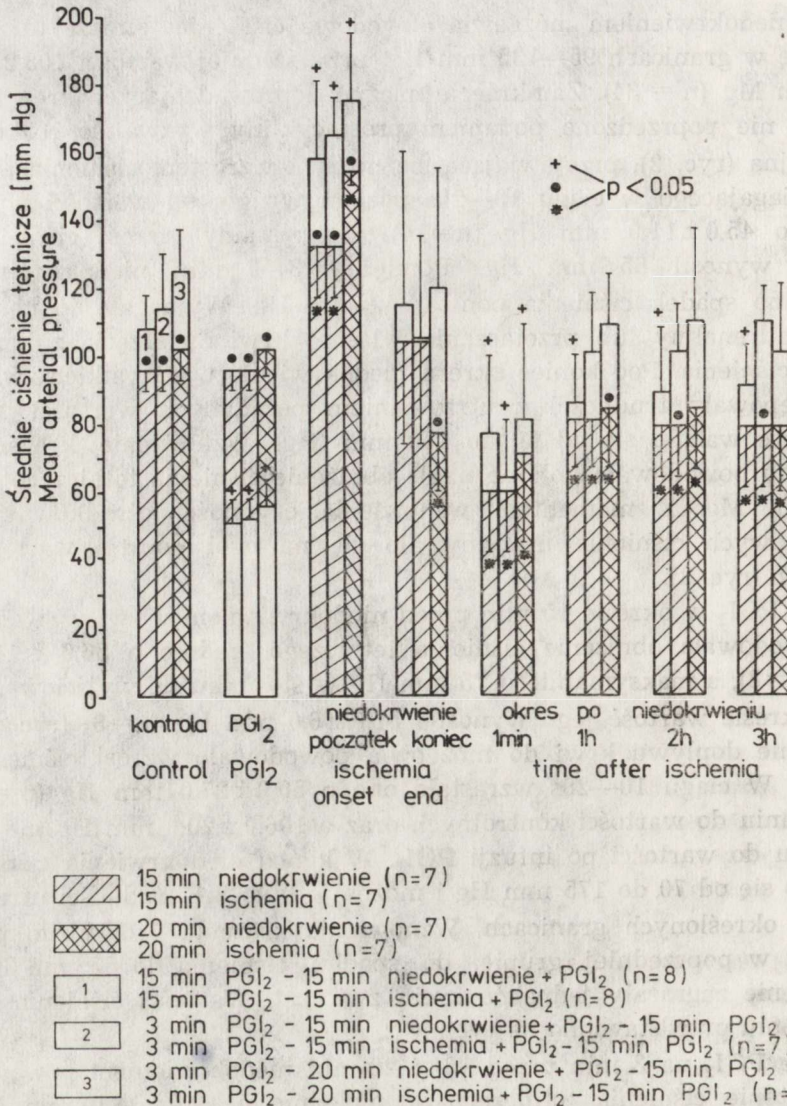
Powrót czynności mózgowia po niedokrwieniu oceniano na podstawie pojawiania się wykładników czynności ośrodków naczynioruchowych i oddechowych oraz aktywności bioelektrycznej kory mózgu. W grupie pierwszej u wszystkich 14 królików stwierdzono powrót czynności mózgowia po niedokrwieniu. Natomiast w grupie II — 8 królików, jedynie u 3 zarejestrowano powrót ECoG. Powrót czynności ośrodków naczynioruchowych i oddechowych stwierdzono u wszystkich zwierząt tej grupy między 5 a 37 min po niedokrwieniu. Podczas dłuższej obserwacji (3 godz.) w 5 przypadkach nastąpił wtórny zanik czynności wymienionych ośrodków. W grupie trzeciej u wszystkich królików stwierdzono powrót czynności bioelektrycznej mózgowia. Dynamika oraz stopień jej powrotu były szybsze i wyprzedzały w czasie powroty czynności mózgowia u zwierząt grupy I. Szczegółową analizę wpływu prostacykliny na czynność ośrodkowego układu nerwowego przedstawiono w poprzedniej pracy (Pluta 1985).

Ciśnienie tętnicze

Przed niedokrwieniem mózgowia obwodowe ciśnienie tętnicze utrzymywało się w granicach 95—135 mm Hg, przy średniej wartości $108,2 \pm 14,2$ mm Hg ($n = 34$). Zamknięcie naczyń doprowadzających krew do mózgowia, nie poprzedzone podaniem prostacykliny wyzwało reakcję hipertensyjną (ryc. 2), przejawiającą się nagłym wzrostem ciśnienia tętniczego osiągającego w ciągu 10—20s poziom wyższy od wartości wyjściowych o $45,0 \pm 11,0$ mm Hg ($n=14$). Maksymalny wzrost ciśnienia tętniczego wynosił 65 mm Hg. Pomiedzy 3—6 min niedokrwienia obserwowano spadek ciśnienia poniżej 50 mm Hg. Wymagało to podawania noradrenaliny lub przetaczania własnej krwi zwierzęcia z kompensatora ciśnienia. Pod koniec okresu niedokrwienia u wszystkich zwierząt występowały trudności z utrzymaniem pożądaných wartości ciśnienia, które wahało się od 50 do 150 mm Hg. Wznowienie krążenia w mózgowiu powodowało kolejne nagłe obniżenie ciśnienia tętniczego do 50—65 mm Hg. Z momentem wznowienia czynności ośrodków naczynioruchowych ciśnienie utrzymywało się na ogół poniżej wartości kontrolnych (ryc. 2).

Infuzja PGI₂ w okresie 15 min przed niedokrwieniem u zwierząt grupy II powodowała obniżenie ciśnienia tętniczego średnio o $56,0 \pm 11,0$ mm Hg ($n=8$), a maksymalnie o 75 mm Hg w stosunku do wyjściowego. Po tym okresie wartość jego wynosiła $51,0 \pm 6,0$ mm Hg ($n=8$) (ryc. 2). Wstrzymanie dopływu krwi do mózgowia powodowało wzrost ciśnienia tętniczego. W ciągu 10—20s wzrastało ono o $50,0 \pm 27,0$ mm Hg ($n=8$) w porównaniu do wartości kontrolnych oraz o $106,0 \pm 20,0$ mm Hg ($n=8$) w stosunku do wartości po infuzji PGI₂. W końcu niedokrwienia ciśnienie wahało się od 70 do 175 mm Hg i można je było bez trudności utrzymywać w określonych granicach. Wznowienie krążenia prowadziło podobnie jak w poprzedniej grupie, do spadku ciśnienia do 55 mm Hg. Spadki te nie zagrażały jednakże życiu zwierząt. Wartości ciśnienia po niedokrwieniu przedstawiono na rycinie 2.

Podanie PGI₂ na 3 min przed 15- i 20-min niedokrwieniem powodowało obniżenie ciśnienia tętniczego odpowiednio o $62,0 \pm 11,0$ mm Hg ($n=7$) i $72,0 \pm 6,0$ mm Hg ($n=8$), przy maksymalnym spadku nie przekraczającym 80 mm Hg. Wstrzymaniu dopływu krwi do mózgowia towarzyszył wzrost ciśnienia w stosunku do wartości po infuzji PGI₂ odpowiednio o $112,0 \pm 8,0$ mm Hg ($n=7$) i $119,0 \pm 16,0$ mm Hg ($n=8$), a w porównaniu do wartości kontrolnych o $50,0 \pm 15,0$ mm Hg ($n=7$) i $50,0 \pm 12,0$ mm Hg ($n=8$). W końcowym okresie niedokrwienia bez większych trudności ciśnienie można było utrzymywać w granicach 75—175 mm Hg. Wznowienie krążenia w mózgu powodowało obniżenie ciśnienia do 50—75 mm Hg. Powrót czynności ośrodków naczynioruchowych po niedokrwieniu prowadził do normalizacji wartości ciśnienia tętniczego (ryc. 2).



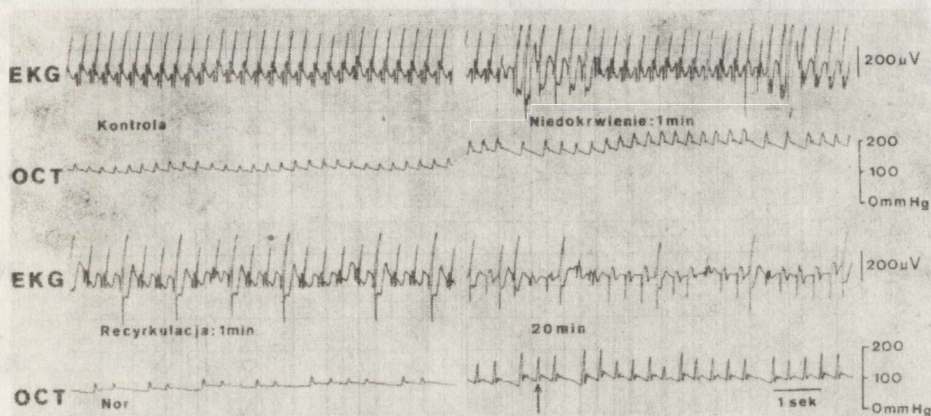
Ryc. 2. Zmiany średniego ciśnienia tętniczego w całkowitym niedokrwieniu mózgowia

Fig. 2. Changes of mean arterial blood pressure in complete cerebral ischemia

Elektrokardiogram

W zapisach EKG królików przed niedokrwieniem mózgowia występował miarowy rytm zatokowy, o częstości od 240 do 324 uderzeń/min, średnio $272,6 \pm 33,7$ uderzeń/min (n=34). Między 10 a 30s niedokrwienia mózgowia nie poprzedzonego podaniem PGI₂, rytm serca ulegał zwolnieniu lub rzadziej przyspieszeniu. Wśród 14 zwierząt tej grupy u 12 obserwowano bradykardię dochodzącą do 108 uderzeń/min, a naj-

wyższe wartości zwolnionej czynności serca nie przekraczały 118 uderzeń/min. W pozostałych 2 przypadkach stwierdzono przyśpieszenie akcji serca o 18—36 uderzeń na minutę. Zmiany te występowały na szczycie wzrostu ciśnienia tętniczego i towarzyszyły im zaburzenia rytmu oraz zmiany niedokrwienne mięśnia sercowego w zapisie EKG (ryc. 3). Do-

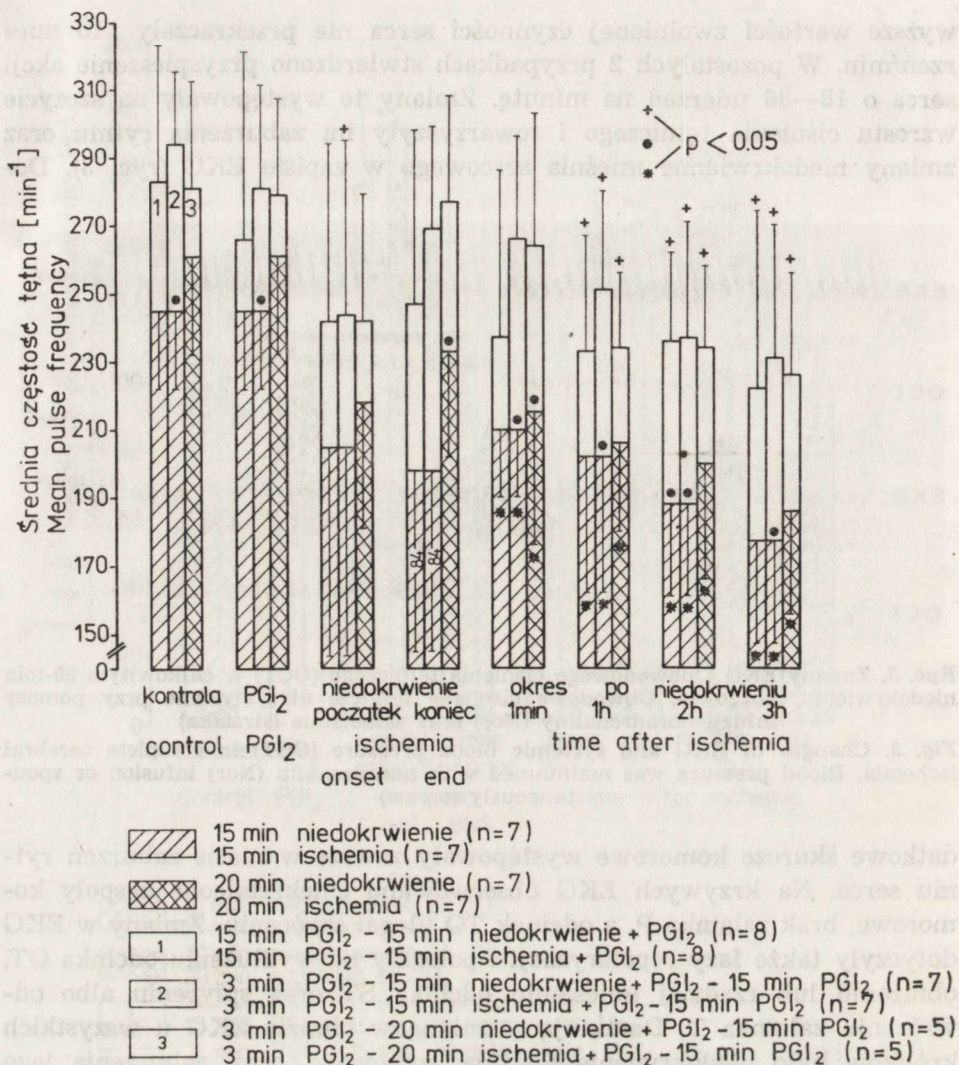


Ryc. 3. Zmiany EKG i obwodowego ciśnienia tętniczego (OCT) w całkowitym 20-min niedokrwieniu mózgowia. Obwodowe ciśnienie tętnicze utrzymywane przy pomocy infuzji noradrenaliny (Nor) oraz samoistnie (strzałka)

Fig. 3. Changes of EKG and systemic blood pressure (OCT) in complete cerebral ischemia. Blood pressure was maintained with noradrenalin (Nor) infusion or spontaneously (arrow)

datkowe skurcze komorowe występowały zawsze w czasie zaburzeń rytmu serca. Na krzywych EKG obserwowano zniekształcone zespoły komorowe, brak załamka P, a odcinek TQ ulegał skróceniu. Zmiany w EKG dotyczyły także fazy repolaryzacji i polegały na wydłużeniu odcinka QT, obniżeniu lub rzadziej uniesieniu odcinka ST oraz spłyceciu albo odwróceniu załamka T. Dominującą zmianą w obrazie EKG u wszystkich królików było niedokrwienie mięśnia sercowego oraz zaburzenia jego rytmu trwające od 6 do 169s wstępnej fazy niedokrwienia mózgowia (ryc. 3). W kilku przypadkach stwierdzono zwiększenie amplitudy załamka T, przewyższającej niekiedy amplitudę załamka P. W okresie poniedokrwicznym powyższe zmiany nasilały się. Na krzywych EKG obserwowano elektrokardiograficzne cechy zawału mięśnia sercowego.

Dożylne podanie noradrenaliny w 1 min recyrkulacji powodowało nagły wzrost ciśnienia krwi, któremu towarzyszyła arytmia serca z seriami pobudzeń dodatkowych, głównie pochodzenia komorowego (ryc. 3). Zaburzenia czynności serca po podaniu noradrenaliny rozwijały się jednakże tylko wówczas, gdy ciśnienie krwi wzrastało powyżej 120—150 mm Hg. Podobne zmiany występowały po niedokrwieniu mózgowia u tych zwierząt, u których ciśnienie krwi utrzymywało się samoistnie powyżej 150 mm Hg podczas powrotu czynności ośrodków naczynioruchowych

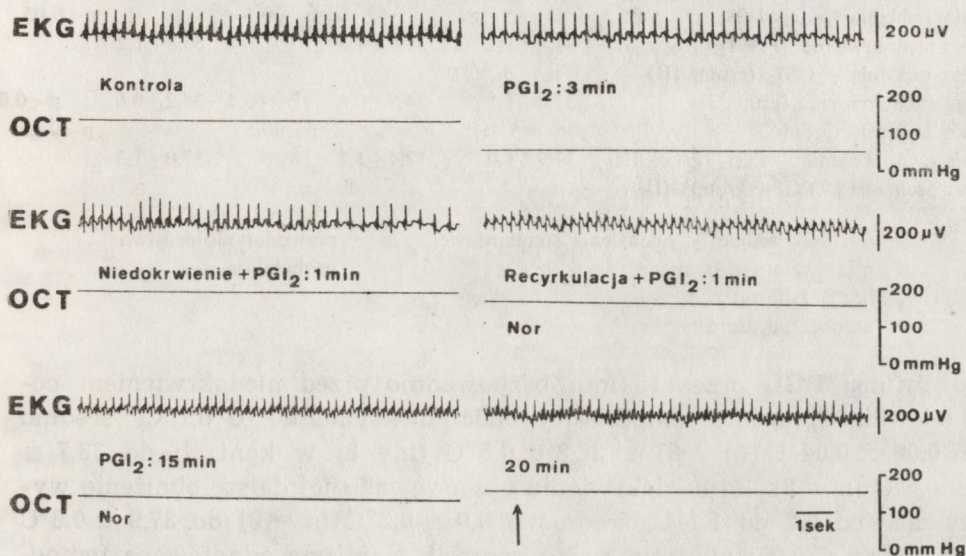


Ryc. 4. Zmiany średniej częstości tętna w całkowitym niedokrwieniu mózgowia
Fig. 4. Changes of mean pulse frequency in complete cerebral ischemia

(ryc. 3). Od początku niedokrwienia do 3 godz. recyrkulacji narastała bradykardia (ryc. 4).

Podanie PGI₂ przed niedokrwieniem spowodowało u 13 zwierząt zwolnienie akcji serca dochodzące niekiedy do około 150 uderzeń/min, u 7 zaś jej przyspieszenie, maksymalnie o 30 uderzeń/min. W 3 przypadkach czynność serca nie uległa zmianom. W pierwszych sekundach niedokrwienia w 4 przypadkach obserwowano przyspieszenie akcji serca o 36 uderzeń/min. U pozostałych królików rozwijała się bradykardia (ryc. 4). Maksymalne zwolnienie akcji serca w tym czasie wynosiło 144 ude-

zeń/min. Zmiany te obserwowano na szczycie wzrostu ciśnienia tętniczego. Obraz EKG w tym okresie nie różnił się od kontrolnego (ryc. 5). Po wznowieniu krążenia w mózgowiu przy ciśnieniu utrzymywanym za pomocą infuzji noradrenaliny w granicach 150—180 mm Hg na krzywych EKG obserwowano uniesienie odcinka ST (ryc. 5). Ustępowało ono po 15—30 min recyrkulacji mimo, iż u zwierząt obwodowe ciśnienie tętnicze utrzymywało się samoistnie powyżej 150 mm Hg (ryc. 5). Znamienne statystyczną bradykardię w tej grupie zwierząt obserwowano po 1 godzinie po wznowieniu krążenia mózgowego (ryc. 4).



Ryc. 5. Zmiany EKG i obwodowego ciśnienia tętniczego (OCT) w całkowitym 20-min niedokrwieniu mózgowia po podaniu prostacykliny (PGI₂). PGI₂ podawano 3 min przed, w czasie i 15 min po niedokrwieniu. Obwodowe ciśnienie tętnicze utrzymywane przy pomocy infuzji noradrenaliny (Nor) oraz samoistnie (strzałka)
 Fig. 5. Changes of EKG and systemic blood pressure (OCT) in complete 20-min cerebral ischemia in PGI₂-treated rabbits. PGI₂ was given 3 min before, during ischemia and 15 min after it. Blood pressure was maintained with noradrenalin infusion (Nor) or spontaneously (arrow)

Temperatura ciała

Przed okresem niedokrwienia mózgowia temperatura ciała królików mierzona w *rectum* wahała się w granicach od 36,5 do 39,2°C, średnio 37,7 ± 1,2°C (n = 34). Zamknięcie dopływu krwi do mózgowia powodowało po 15 min niedokrwienia obniżenie temperatury ciała średnio o 1,2 ± 0,3°C (n = 8) i po 20 min o 2,2 ± 0,6°C (n = 5). Po 15 min niedokrwieniu temperatura ciała obniżała się maksymalnie o 1,7°C, osiągając wartość 35,0°C. Natomiast u królików po 20 min niedokrwieniu temperatura obniżała się niekiedy o 2,7°C (do 33,8°C). Wznowieniu krążenia krwi w mózgowiu towarzyszył dalszy znamieny spadek temperatury ciała (tab. 1), co stwarzało konieczność ogrzewania zwierząt.

Tabela 1. Zmiany temperatury ciała po całkowitym niedokrwieniu mózgowia u królików, którym podawano i nie podawano PGI₂

Table 1. Changes of body temperature after complete cerebral ischemia in rabbits treated and not treated with PGI₂

Dane doświadczalne Experimental data	Kontrola Control	Bezpośrednio po niedokrwieniu Directly after ischemia p < 0,05	15 min po nie- dokrwieniu 15 min after ischemia p < 0,05
15-min niedokrwienie (grupa I) 15-min ischemia (group I)	36,7±0,6* n = 8	35,5±0,5 p < 0,05	35,2±0,4 p < 0,05
15-min niedokrwienie + PGI ₂ (grupa III) 15-min ischemia + PGI ₂ (group III)	37,8±1,2 n = 6	37,0±1,3 p < 0,05	36,8±1,2 p < 0,05
20-min niedokrwienie (grupa I) 20-min ischemia (group I)	37,0±1,1 n = 5	34,9±0,8 p < 0,05	35,2±0,6 p < 0,05
20-min niedokrwienie + PGI ₂ (grupa III) 20-min ischemia + PGI ₂ (group III)	37,9±1,0 n = 7	37,4±1,2 p < 0,05	37,0±1,3 p < 0,05

* — wartości średnie ± odchylenia standardowe
mean values ± standard deviations

n — liczba zwierząt

number of animals

p — prawdopodobieństwo
probability

Infuzja PGI₂ przez 15 min bezpośrednio przed niedokrwieniem powodowała obniżenie temperatury ciała maksymalnie o 0,1°C, średnio o 0,09 ± 0,04°C (n = 8) z 38,8 ± 0,5°C (n = 8) w kontroli do 38,7 ± 0,5°C (n = 8). Po niedokrwieniu obserwowano jej dalsze obniżenie wynoszące od 0,2 do 1,1°C, średnio o 0,9 ± 0,3°C (n = 8) do 37,9 ± 0,8°C (n = 8) (p < 0,05) w stosunku do kontroli. Najniższa odnotowana temperatura wynosiła 37,2°C. Natomiast po 1 godz. recyrkulacji następowała jej normalizacja do wartości 38,5 ± 0,6°C (n = 8).

Podawanie PGI₂ przez 3 min przed zatrzymaniem dopływu krwi do mózgowia na 15- i 20-min nie powodowało uchwytanych zmian temperatury ciała. Po 15 min niedokrwieniu obserwowano obniżenie temperatury średnio o 0,8 ± 0,5°C (n = 6), a po 20 min niedokrwieniu o 0,5 ± 0,3°C (n = 7). Infuzja PGI₂ przez 15 min w okresie przywróconego krążenia w mózgowiu powodowała dodatkowe obniżenie temperatury odpowiednio o 0,3 ± 0,1°C (n = 6) i 0,4 ± 0,2°C (n = 7). Prowadziło to do obniżenia temperatury w stosunku do kontroli odpowiednio o 1,0 ± 0,5°C (n = 6) i 0,9 ± 0,4°C (n = 7). Mimo to wartości temperatur po niedokrwieniu wahały się w granicach kontrolnych (tab. 1).

Zmiany pO₂, pCO₂ i pH

Przed okresem niedokrwienia mózgowia kontrolowano w krwi tętniczej poziom pO₂, pCO₂ i pH. Prężność tlenu przed niedokrwieniem nie poprzedzonym podawaniem prostacykliny, wahała się od 71,7 do 97,1 mm

Tabela 2. Zmiany prężności gazów i pH w krwi tętniczej 5 królików sztucznie wentylowanych powietrzem podczas i po całkowitym niedokrwieniu mózgowia po podaniu PGI₂ (grupa III)
Table 2. Changes of gases tension and pH in arterial blood of 5 rabbits artificially ventilated with air during and after complete cerebral ischemia after PGI₂ administration (group III)

Badane parametry Investigated parameters	Kontrola Control	15 min po niedokrwieniu 15 min after ischemia
pO ₂ mm Hg	75,9±2,3**	41,4±5,8*
pCO ₂ mm Hg	32,9±5,1	48,6±7,4*
HCO ₃ ⁻ mEq/l	22,4±4,9	15,2±2,9*
TCO ₂ mMol/l	23,4±5,0	16,5±3,0*
pH	7,437±0,061	7,145±0,043*

** — wartości średnie ± odchylenia standardowe
 mean values ± standard deviations
 * — p < 0,05

Tabela 3. Zmiany prężności gazów i pH w krwi tętniczej 8 królików po całkowitym 15-min niedokrwieniu mózgowia. Prostacyclinę podawano 15 min przed niedokrwieniem i w czasie niedokrwienia
Table 3. Changes of gases tension and pH in arterial blood of 8 rabbits after complete 15-min cerebral ischemia. PGI₂ was given 15 min before and during ischemia

Badane parametry Investigation parameters	Kontrola Control	Okres po niedokrwieniu Period after ischemia			
		15 min	60 min	120 min	180 min
pO ₂ mm Hg	79,6±9,3**	69,3±7,7*	87,6±8,9	87,3±10,3	90,0±13,3
pCO ₂ mm Hg	36,2±3,2	35,9±2,7	31,8±3,4*	35,9±10,6	31,4±1,8*
HCO ₃ ⁻ mEq/l	24,3±3,5	13,7±2,5*	13,1±2,6*	15,1±7,5*	14,0±3,6*
TCO ₂ mMol/l	25,4±3,5	14,8±2,5*	14,2±2,6*	16,2±7,7*	15,0±3,6*
pH	7,436±0,046	7,197±0,101*	7,232±0,086*	7,208±0,117*	7,251±0,124*

** — wartości średnie ± odchylenia standardowe
 mean values ± standard deviations
 * — p < 0,05

Hg, natomiast pCO₂ od 32,0 do 43,6 mm Hg. Wartości pH zawierały się w granicach od 7,360 do 7,490. Natomiast poziom HCO₃⁻ wynosił od 19,2 do 28,6 mEq/l, a TCO₂ od 20,2 do 29,6 mMol/l.

W tabeli 3 przedstawiono zmiany prężności gazów i pH w krwi tętniczej u królików grupy II. Zwierzęta te w okresie recyrkulacji krwi w mózgowiu były wentylowane mieszaniną powietrza z tlenem o szybkości przepływu tlenu 0,25—0,5 l/min. W 15 min po niedokrwieniu prężność tlenu ulegała znamiennej obniżeniu. Natomiast w 60, 120 i 180 min utrzymywała się w granicach kontrolnych. Prężność CO₂ w 60 i 180 min po niedokrwieniu była znamiennej obniżona, podczas gdy w innych przedziałach czasu utrzymywała się w granicach kontrolnych. Dwu-

węglany i TCO_2 obniżały się znacząco przez cały okres obserwacji, osiągając najniższą wartość w 60 min. W 15 min po niedokrwieniu pH miało wartość $7,197 \pm 0,101$. Od 60 min recyrkulacji krwi w mózgowiu stwierdzano powolny wzrost pH do wartości $7,251 \pm 0,124$ w 180 min. W trzech przypadkach tej grupy, w których stwierdzono powrót czynności bioelektrycznej mózgowia, wartość pH w 3 godz. po niedokrwieniu dochodziła do 7,341.

Tabele 4 i 5 przedstawiają zmiany prężności gazów i pH krwi tętniczej zwierząt grupy III po całkowitym 15- i 20-min niedokrwieniu mózgowia, u których przez cały okres recyrkulacji krwi prowadzono wenty-

Tabela 4. Zmiany prężności gazów i pH w krwi tętniczej 5 królików po całkowitym 15-min niedokrwieniu mózgowia. PGI_2 podawano 3 min przed niedokrwieniem, w trakcie oraz 15 min po niedokrwieniu
Table 4. Changes of gases tension and pH in arterial blood of 5 rabbits after complete 15-min cerebral ischemia. PGI_2 was given 3 min before, during and 15-min after ischemia

Badane parametry Investigated parameters	Kontrola Control	Okres po niedokrwieniu Period after ischemia			
		15 min	60 min	120 min	180 min
pO_2 mm Hg	$77,9 \pm 1,2^{**}$	$81,7 \pm 3,3$	$101,2 \pm 2,7^*$	$104,9 \pm 1,9^*$	$111,2 \pm 2,1^*$
pCO_2 mm Hg	$35,8 \pm 2,4$	$36,1 \pm 3,1$	$34,3 \pm 3,9$	$40,4 \pm 3,2$	$34,6 \pm 1,9$
HCO_3^- mEq/l	$24,9 \pm 5,2$	$18,3 \pm 2,5$	$12,2 \pm 1,8^*$	$18,7 \pm 4,3$	$17,1 \pm 3,1^*$
TCO_2 mMol/l	$26,0 \pm 5,2$	$19,4 \pm 2,5$	$13,3 \pm 1,8^*$	$19,9 \pm 4,2$	$18,1 \pm 3,1^*$
pH	$7,444 \pm 0,065$	$7,319 \pm 0,050^*$	$7,174 \pm 0,014^*$	$7,274 \pm 0,073^*$	$7,303 \pm 0,072^*$

** – wartości średnie \pm odchylenia standardowe
mean values \pm standard deviations

* – $p < 0,05$

Tabela 5. Zmiany prężności gazów i pH w krwi tętniczej 5 królików po całkowitym 20-min niedokrwieniu mózgowia. PGI_2 podawano 3 min przed niedokrwieniem, w trakcie oraz 15 min po niedokrwieniu
Table 5. Changes of gases tension and pH in arterial blood of 5 rabbits after complete 20-min cerebral ischemia. PGI_2 was given 3 min before, during and 15 min after ischemia

Badane parametry Investigated parameters	Kontrola Control	Okres po niedokrwieniu Period after ischemia			
		15 min	60 min	120 min	180 min
pO_2 mm Hg	$74,1 \pm 2,4^{**}$	$77,8 \pm 5,2$	$101,9 \pm 18,3^*$	$115,2 \pm 8,9^*$	$105,1 \pm 10,1^*$
pCO_2 mm Hg	$37,7 \pm 3,8$	$38,7 \pm 10,8$	$48,3 \pm 11,7$	$44,1 \pm 3,9^*$	$41,1 \pm 7,0$
HCO_3^- mEq/l	$24,1 \pm 1,6$	$17,0 \pm 6,1$	$10,2 \pm 3,7^*$	$15,1 \pm 1,3^*$	$18,9 \pm 3,9$
TCO_2 mMol/l	$25,3 \pm 1,7$	$18,2 \pm 6,1$	$11,7 \pm 3,8^*$	$16,3 \pm 1,3^*$	$20,1 \pm 4,1^*$
pH	$7,418 \pm 0,049$	$7,252 \pm 0,138$	$6,938 \pm 0,091^*$	$7,154 \pm 0,044^*$	$7,278 \pm 0,039^*$

** – wartości średnie \pm odchylenia standardowe
mean values \pm standard deviations

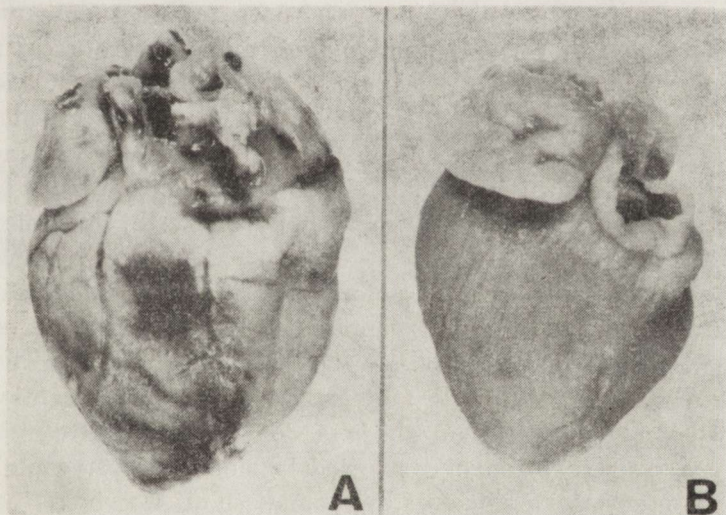
* – $p < 0,05$

lację mieszaną powietrza z tlenem. Prężność tlenu była znamienne podwyższona od 60 min recyrkulacji. Prężność CO₂ w tym czasie zamykała się w granicach kontrolnych. Dwuwęglany i TCO₂ obniżały się znamienne osiągając najniższe wartości w 60 min po niedokrwieniu. Od 15 minuty przywrócenia krążenia do końca doświadczenia u wszystkich zwierząt stwierdzono znamienny spadek pH — największy w 60 min recyrkulacji. Wzrost pH następował od 120 min po niedokrwieniu.

W tabeli 2 przedstawiono zmiany prężności gazów i pH w krwi tętniczej królików grupy III, które podczas całego doświadczenia wentylowane były powietrzem. W 15 min po przywróceniu krążenia w mózgowiu dochodziło do spadku prężności tlenu w obwodowej krwi tętniczej, natomiast prężność CO₂ w tym czasie wzrastała. Poziom HCO₃⁻ i TCO₂ obniżał się znamienne, podobnie, jak stężenie jonów wodorowych w krwi tętniczej.

Badania makroskopowe mięśnia sercowego

Niezależnie od czasu trwania niedokrwienia mózgowia i okresu przeżycia w grupie I zwierząt stwierdzano zmiany krwotoczne w różnym umiejscowieniu i nasileniu (ryc. 6A). Wylewy krwawe były umiejscowione zarówno podśierdziowo, jak i podnasierdziowo, a w niektórych przypadkach obejmowały one całą grubość mięśnia serca. Stwierdzano je w mięśniach przedsionków i komór (ryc. 6A). W wielu przypadkach



Ryc. 6. A. Masywne wylewy krwawe podnasierdziowe u królika po całkowitym 20-min niedokrwieniu mózgowia. Czas przeżycia 4 godz. B. Brak zmian krwotocznych w mięśniu sercowym królika po całkowitym 20-min niedokrwieniu mózgowia po podaniu PGI₂. Czas przeżycia 4 godz. Pow. 1,5 ×

Fig. 6. A. Masive subepicardial hemorrhages in rabbit with complete 20-min cerebral ischemia. Survival time 4 h. B. Lack of hemorrhages in cardiac muscle after complete 20-min cerebral ischemia in PGI₂ treated rabbit. Survival time 4 h. × 1.5

mięsień sercowy był bledy i wiotki; występowały cechy rozstrzeni serca. Natomiast u zwierząt, którym podawano PGI_2 zarówno przed, jak i po niedokrwieniu nie obserwowano zmian krwotocznych w mięśniu sercowym (ryc. 6B). W sporadycznych przypadkach stwierdzano pojedyncze wybroczyny pod wsierdziem lewej komory.

OMÓWIENIE

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że bezpośrednie efekty zatrzymania dopływu krwi do mózgowia były podobne w grupie kontrolnej i w grupach zwierząt którym podawano PGI_2 . Podobieństwa dotyczyły czasu i sekwencji zaniku aktywności ECoG, oraz ośrodków naczynioruchowych i oddechowych. Istotne różnice między tymi grupami obserwowano natomiast po wznowieniu dopływu krwi do mózgowia. Dotyczyły one czasu i stopnia trwałości powrotu czynności ośrodkowego układu nerwowego (Pluta, 1985).

Porównanie podstawowych parametrów fizjologicznych w grupach zwierząt, u których całkowite niedokrwienie mózgowia było poprzedzone podaniem PGI_2 , z wynikami uzyskanymi u zwierząt, którym nie podano PGI_2 pozwala na uchwycenie cech wspólnych dla obu grup i występujących między nimi odrębności. Cechą wspólną dla wszystkich grup zwierząt był nagły wzrost ciśnienia tętniczego dochodzący do około 200 mm Hg w pierwszych sekundach niedokrwienia. Wznowienie przepływu krwi w mózgowiu u zwierząt bez PGI_2 powodowało znamienne obniżenie ciśnienia poniżej wartości kontrolnych mimo powrotu czynności ośrodków naczynioruchowych. Podobny efekt obserwowano także u zwierząt, którym PGI_2 podawano 15 min przed i w czasie niedokrwienia. Natomiast podanie PGI_2 przez 3 minuty przed, w trakcie i przez 15 minut po niedokrwieniu przyczyniało się do stabilizacji obwodowego ciśnienia tętniczego w granicach kontrolnych po pierwszej godzinie recyrkulacji.

W czasie niedokrwienia u zwierząt bez PGI_2 występowała bradykardia, która systematycznie i znamienne nasilała się po okresie niedokrwienia. Bradykardia występująca w czasie niedokrwienia u zwierząt, które otrzymywały PGI_2 była mniejsza. W pierwszej godzinie recyrkulacji częstość akcji serca była zbliżona do wartości kontrolnych. Obserwowane po pierwszej godzinie po niedokrwieniu statystycznie znamienne obniżenie częstości akcji serca było mniejsze niż u zwierząt bez uprzedniego podania PGI_2 . Prostacyklina powodowała więc opóźnienie występowania bradykardii po niedokrwieniu.

U zwierząt którym nie podawano PGI_2 wzrostowi ciśnienia tętniczego w pierwszych sekundach niedokrwienia towarzyszyły znaczne zaburzenia rytmu serca i zmiany niedokrwienne mięśnia sercowego. Nasilały się one

w okresie recyrkulacji gdy ciśnienie tętnicze przewyższało wartości kontrolne. Zmiany niedokrwienne w zapisach EKG odpowiadały często obrazowi zawału mięśnia sercowego. Ich odpowiednikiem patomorfologicznym były rozległe zmiany krwotoczne uszkadzające mięsień sercowy. Natomiast u zwierząt, które otrzymywały PGI₂, mimo wzrostu ciśnienia krwi w omawianych powyżej okresach nie obserwowano arytmii ani innych zmian czynności bioelektrycznej serca poza przejściowymi i krótkotrwałymi okresami niedokrwienia, ustępującymi w 30 min recyrkulacji krwi w mózgu. W grupie tej badanie makroskopowe nie wykazało również zmian organicznych w mięśniu sercowym.

U królików, którym nie podawano PGI₂ obserwowano znamienne statystycznie obniżenie temperatury ciała po 15- i 20-min niedokrwieniu. Natomiast u zwierząt, które otrzymywały PGI₂ obniżenie temperatury po niedokrwieniu było nieznaczne, a średnie wartości temperatur miesciły się w granicach wartości kontrolnych. Przyczyn tego zjawiska należy zapewne upatrywać w korzystnym wpływie PGI₂ na procesy termoregulacji. Przypuszczenie to znajduje potwierdzenie w obserwacjach Feldberga i Milтона (1973), którzy wykazali, że prostaglandyny E₁ i E₂ podane dokanałowo kotom, królikom i szczurom działają hipertermicznie, natomiast podane dootrzewnowo hipotermicznie.

Przedstawione wyniki doświadczeń wskazują na istotny wpływ sposobu wentylacji zwierząt traktowanych PGI₂ na kształtowanie się wskaźników gazometrycznych krwi w okresie recyrkulacji krwi w mózgu. W okresie poniedokrwiennym najkorzystniejsza okazała się wentylacja mieszaniną powietrza z tlenem, przy szybkości przepływu tlenu 0,25—0,5 l/min. Pozwalała ona na utrzymanie prężności tlenu w granicach 100 mm Hg oraz prężności dwutlenku węgla na poziomie wartości kontrolnych we wszystkich grupach z zastosowaną PGI₂. Różnie natomiast w poszczególnych grupach doświadczalnych kształtowało się stężenie jonów wodorowych oraz wartości dwuwęglanów i TCO₂.

Wartości pH po podaniu PGI₂ były na ogół wyższe niż u zwierząt nie otrzymujących prostacykliny, zwłaszcza tych, u których nie obserwowano powrotu czynności bioelektrycznej mózgu (Pluta 1981). W grupie II zwierząt najniższe wartości pH odnotowano w 15 min po niedokrwieniu, następnie wzrastały one stopniowo osiągając najwyższy poziom w 180 min recyrkulacji krwi w mózgu. W grupie III natomiast najniższe wartości pH stwierdzono w 60 minucie po niedokrwieniu, a jego stopniowy wzrost odnotowywano od 120 min po przywróceniu krążenia w mózgu.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że 60 minuta po niedokrwieniu jest okresem krytycznym zarówno dla zwierząt traktowanych PGI₂, jak i tych, którym PGI₂ nie podawano (Pluta 1981). W tym czasie pH obniża się odpowiednio w grupach do $7,174 \pm 0,014$ i do $6,938 \pm 0,091$.

Wprawdzie w obu grupach prężność CO_2 w krwi nie ulegała istotnym zmianom, jednakże poziom HCO_3^- i TCO_2 osiągał w tym czasie najniższe wartości. Zjawisko to może być zapewne związane ze wzrostem metabolizmu ustroju po powrocie czynności ośrodków oddechowych i naczynioruchowych oraz aktywności bioelektrycznej kory mózgowej (Pluta, Kapuściński 1980).

Z przeprowadzonych badań wynika również, że w całkowitym niedokrwieniu mózgowia po uprzednim podaniu PGI_2 występują bardzo silnie wyrażone zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej obwodowej krwi tętniczej. Charakter tych zmian w okresie odnowy krążenia mózgowego jest zbliżony do obserwowanych w takich samych i podobnych modelach doświadczalnych niedokrwienia mózgowia bez uprzedniego podania prostacykliny (Hossmann, Zimmermann 1974; Snyder i wsp. 1975; Kawakami, Hossmann 1977; Kapuściński 1978; Pluta 1981).

W powyższej pracy wykazano korzystny wpływ PGI_2 na ośrodkowy układ nerwowy oraz hemodynamikę obwodowego układu krążenia przy infuzji prostacykliny przed, w czasie i po całkowitym długotrwałym niedokrwieniu mózgowia. Wydaje się, że poprawa czynności bioelektrycznej mózgowia po podaniu PGI_2 była związana z dobrym stanem hemodynamicznym obwodowego układu krążenia po niedokrwieniu. Prawdopodobnie poprawa ogólnej hemodynamiki organizmu miała znaczący wpływ na stan układu krążenia w mózgowiu.

Autor serdecznie dziękuje Panu Profesorowi Ryszardowi Gryglewskiemu za udostępnienie prostacykliny do badań, Panu Sławomirowi Januszewskiemu za współpracę przy wykonywaniu powyższych doświadczeń oraz Panu mgr inż. Marcinowi Witkowskiemu przedstawicielowi firmy CORNING za możliwość skorzystania z aparatu do oznaczeń gazometrycznych.

ВЛИЯНИЕ ПРОСТАЦИКЛИНА НА ИЗМЕНЕНИЯ ОСНОВНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ В ПОЛНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Резюме

Исследования были проведены на 37 кроликах, у которых автор вызывал полную ишемию головного мозга продолжающуюся 15 и 20 минут. В первой исследуемой группе автор вводил простаглицлин через 15 минут перед и во время 15-минутной ишемии. Во второй группе он вводил PGI_2 3 минуты перед, во время ишемии и через 15 минут после ишемии. Контрольную группу составляли животные с полной ишемией головного мозга без введения простаглицлина.

Во всех экспериментальных группах инфузия простаглицлина не влияла на содержание газов и pH артериальной крови. Зато констатировано благоприятное влияние простаглицлина на состояние периферической кровеносной системы и на центральную нервную систему во время и после полной ишемии головного мозга.

INFLUENCE OF PROSTACYCLIN (PGI₂) ON THE CHANGES IN BASIC
PHYSIOLOGICAL PARAMETRES IN COMPLETE CEREBRAL ISCHEMIA

S u m m a r y

The experiments were performed on 37 rabbits in which complete cerebral ischemia lasting 15 and 20 min was produced. In the first experimental group PGI₂ was given for 15 min before and during the 15-min ischemia. In the second, PGI₂ was administered 3 min before, during ischemia and for 15 min after it. As control served animals with complete cerebral ischemia not receiving PGI₂.

In all experimental groups PGI₂ infusion had no influence on the gases content and pH of systemic arterial blood. A beneficial effect of PGI₂ was, however, noted on the hemodynamic of the peripheral circulatory system and on the central nervous system in the course of complete cerebral ischemia and after it.

PIŚMIENNICTWO

1. Ames A. III., Wright R. L., Kowada M., Thurston J. M., Majno G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Amer. J. Pathol.*, 1968, 52, 437—453.
2. Chiang J., Kowada M., Ames A. III., Wright R. L., Majno G.: Cerebral ischemia. III. Vascular changes. *Amer. J. Pathol.*, 1968, 52, 455—476.
3. Feldberg W., Milton A. S.: Prostaglandin fever. W: *Pharmacology of thermoregulation*. Red.: E. Schönbaum, P. Lomax. Karger, Basel-New York, 1973, pp. 302—310.
4. Hossmann K-A., Olsson Y.: Suppression and recovery of neuronal function in transient cerebral ischemia. *Brain Res.*, 1970, 22, 313—325.
5. Hossmann K-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
6. Hossmann V., Hossmann K-A., Takagi S.: Effect of intravascular platelet aggregation on blood recirculation following prolonged ischemia of the cat brain. *J. Neurol.*, 1980, 222, 159—170.
7. Kapuściński A.: Blood gases and pH in the controlled brain ischemia. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1978, 26, 649—654.
8. Kapuściński A., Tołova S. V., Pluta R.: Same disturbances of cardiovascular system in experimental compression ischemia of the rabbit brain. *Bull. Acad. Pol. Sci.*, 1980, 28, 407—415.
9. Kawakami S., Hossmann K-A.: Electrophysiological recovery after compression ischemia of the rat brain. *J. Neurol.*, 1977, 217, 31—42.
10. Kramer W., Tuynman J. A.: Acute intracranial hypertension — an experimental investigation. *Brain Res.*, 1967, 6, 686—705.
11. Meinen K., Kremer B., Hücker H., Geisler W.: Intracranial pressure increase and changes in microcirculation of the pial and iridial vessels in correlation to EEG, ECG and arterial blood pressure. *Brain Res.*, 1975, 86, 439—447.
12. Negovsky V. A., Volkov A. V., Tołova S. V., Zaks I. O., Novoderzhkina I. S., Trubina I. E., Kirsanova A. K., Boliakina G. K., Zaplatkina A. I.: Some experimental methods of prophylaxis of post-resuscitation disorders of the brain functions. *Inter. Symp. on Postresuscitation Pathology of the Brain. Abstracts, Moscow, 1978, 92—95.*
13. Nowak S., Grylewski R., Kostka-Trąbkowa E., Bieroń K., Dembińska-Kieć A.,

- Kuśmiderski J., Błaszczak B., Olczyk E., Markowska E., Basista M.: Prosta-
cyklina w niedokrwinnym udarze mózgu. *Przegl. Lek.*, 1983, 40, 315—322.
14. Pluta R., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgu a czynność bioelek-
tryczna. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 41—52.
 15. Pluta R., Tołova S. V., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgowia
u królika w wyniku ostrego nadciśnienia wewnątrzczaszkowego. *Neuropat. Pol.*,
1980, 18, 365—384.
 16. Pluta R.: Zmiany pO_2 , pCO_2 i pH w tętniczej krwi królika w całkowitym
30-minutowym niedokrwieniu mózgowia. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 323—334.
 17. Pluta R.: Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu
i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska. CMDiK PAN, Warszawa, 1982.
 18. Pluta R.: Treatment of complete cerebral ischemia with prostacyclin. II-nd Eu-
ropean Conference for Neuropathology. Abstracts, Warsaw, 1984, 54—55.
 19. Pluta R.: Influence of prostacyclin on the recovery of bioelectric cerebral acti-
vity after complete ischemia. *Acta neurol. Scand.*, 1985 (w druku).
 20. Siggaard-Andersen O.: The acid-base status of the blood. Munksgaard, Co-
penhagen, 1964.
 21. Snyder J. V., Nemoto E. M., Carroll R. G., Safar P.: Global ischemia in dogs:
intracranial pressures, brain blood flow and metabolism. *Stroke*, 1975, 6, 21—27.
 22. Szczeklik A., Gryglewski R. J., Niżankowski R., Musioł J., Piętoń R., Mruk J.:
Circulatory and antiplatelet effects of intravenous prostacyclin in healthy men.
Pharmacol. Res. Commun., 1978, 10, 545—556.
 23. Szczeklik A., Niżankowski R., Skawiński S., Szczeklik J., Głuszko P., Gryglew-
ski R. J.: Successful therapy of advanced arteriosclerosis obliterans with pro-
stacyclin. *Lancet*, 1979, 1, 1111—1114.
 24. Szczeklik J.: Wpływ prostacykliny na hemodynamikę w chorobach układu krą-
żenia. Rozprawa habilitacyjna. Kraków, 1980.
 25. Żygulska-Mach H., Kostka-Trąbka E., Nitoń A., Gryglewski R. J.: Prostacyclin
in central retinal vein occlusion. *Lancet*, 1980, 2, 1075.

Adres autora: Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Kli-
nicznej PAN, Dworkowa 3, 00-784 Warszawa

MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, ROMAN GADAMSKI

WPŁYW INDOMETACYNY NA NIEDOKRWIENNE USZKODZENIA SEKTORA CA₁ ROGU AMONA U CHOMIKÓW MONGOLSKICH

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Poglądy na działanie indometacyny w warunkach niedokrwienia mózgu są kontrowersyjne. Obok opinii o jej osłaniającym wpływie na regulację przepływu krwi w mózgu, zaburzonego w okresie po niedokrwieniu (Furlow, Hallenbeck 1978; Boulu i wsp. 1982; Kärgrström i wsp. 1983), wypowiedane są zdania o jej wręcz szkodliwym oddziaływaniu (Harris i wsp. 1982). Hallenbeck i Furlow (1979) oraz Hallenbeck i wsp. (1980) wykazali z kolei jej wpływ ochronny tylko w warunkach równoczesnego stosowania z prostacykliną PGI₂ i heparyną. We wcześniejszych badaniach własnych stwierdzono, iż indometacyna pozostając bez wpływu na objawy uogólnionego przekrwienia mózgu, występującego po niedokrwieniu oraz obecność wtórnych ognisk niedokrwienia w obszarach pogranicza unaczynienia przez duże pnie tętnicze, zapobiegała skutecznie uogólnionym zaburzeniom mikrokrążenia, obejmującym praktycznie wszystkie formacje szare ośrodkowego układu nerwowego (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1982). Redukowała ona stopień uszkodzeń tkankowych i ograniczała je do wspomnianych powyżej obszarów tzw. ostatniej łąki (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983). Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały, iż indometacyna zapobiegała uogólnionemu obrzmieniu komórek glejowych oraz pozwalała na utrzymanie strukturalnej integralności neuronów w większości formacji szarych (Mossakowski, Gajkowska 1984). W oparciu o te spostrzeżenia wysunięto przypuszczenie, że podstawą korzystnego wpływu indometacyny w warunkach niedokrwienia mózgu jest jej działanie cytoprotekcyjne. Przedstawione powyżej obserwacje uzyskano w modelu drastycznego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, stanowiącego skutek 30-minutowego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych, w którym możliwe jest współdziałanie różnych mechanizmów patogenetycznych uszkodzenia tkanki nerwowej. Skłoniło to do próby oceny wpływu indometacyny w warunkach mniej

ciężkiego niedokrwienia. Modelem z wyboru wydawało się 5-minutowe obustronne podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych u chomików mongolskich, którego jedynym następstwem jest powtarzalny zanik komórek piramidowych w sektorze CA₁ rogu Amona, występujący po upływie 3—5 dni od incydentu niedokrwiennego (Suzuki i wsp. 1983a,b), a uznany za wykładnik tzw. dojrzewania procesu patologicznego (Klatzo 1975).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na chomikach mongolskich (*Meriones unguiculatus*), dorosłych samcach o masie ciała około 75 g, którym w narkozie wziewnej (eter lub 2% narkotan podawany w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70% azotu i 30% tlenu) zaciskano obustronnie tętnice szyjne wspólne przy użyciu klipsów Heifetza na czas 5 lub 7,5 min. Po zabiegu pozostawiano je w warunkach zwierzętarnianych. Zwierzęta zabijano po upływie 5 i 7 dni przez przezsercową perfuzję przy użyciu zbuforowanego 10% roztworu formaliny.

Grupa doświadczalna I obejmowała 15 zwierząt, które na 45 min przed 5-minutowym (10 zwierząt) lub 7,5-minutowym (5 zwierząt) zaciśnięciem tętnic szyjnych wspólnych, otrzymywały dootrzewnowo iniekcję indometacyny (Merck-Sharp and Dohme Res. Lab. USA) w dawce 8 mg/kg masy ciała. Roztwór indometacyny przygotowywano na świeżo przed każdym doświadczeniem, rozpuszczając sproszkowaną substancję w 70% alkoholu etylowym (5 mg/0,3 ml), a następnie rozprowadzając go w 5 ml płynu Krebsa—Ringera wysyconego dwutlenkiem węgla. Zwierzęta usypiano po upływie 5 i 7 dni od niedokrwienia mózgu.

Grupa doświadczalna II liczyła 10 zwierząt. Czas niedokrwienia mózgu, podobnie jak w grupie I, wynosił 5 (5 zwierząt) i 7,5 (5 zwierząt) minut. Różniła się ona od grupy poprzedniej dwukrotnym podaniem indometacyny w dawce 8 mg/kg masy ciała. Pierwszą iniekcję stosowano 45 min przed zaciśnięciem tętnic szyjnych, a drugą 5 godz. po niedokrwieniu. Czas przeżycia w obu podgrupach czasowych wynosił 5 dni.

Grupa doświadczalna III, obejmująca 5 zwierząt z 5-minutowym podwiązaniem tętnic szyjnych, różniła się od poprzednich czasem podania leku. Pojedynczą jego dawkę otrzymywały one w 3 godz. po niedokrwieniu mózgu. Czas przeżycia — 5 dni.

Grupa kontrolna liczyła łącznie 24 zwierzęta, których poza podwiązaniem tętnic szyjnych nie poddawano innym zabiegom doświadczalnym. U 18 zwierząt czas niedokrwienia mózgu wynosił 5 min; u 6 przedłużono go do 7,5 min. Usypiano je w większości po 5 dniach, w nielicznych przypadkach czas przeżycia wynosił 7 dni. Zwierzęta kontrolne otrzymywały w analogicznych do zwierząt doświadczalnych układach czasowych dootrzewnowo iniekcję płynu Krebsa—Ringera. Dodatkową kontrolę

stanowiły 3 chomiki mongolskie nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Po wykonaniu perfuzji mózgi wyjmowano z jamy czaszki pozostawiając je w płynie perfuzyjnym przez 5 dni. Następnie krojono je na bloki cięciami w płaszczyźnie czołowej. Blok tkankowy zawierający pełny przekrój rogu Amona przeprowadzano w sposób rutynowy do parafiny. Skrawki parafinowe o wystandaryzowanej grubości 10 μm barwiono fioletem krezyłu.

Dla ilościowej charakterystyki zmian przeprowadzono badania morfometryczne. Dzięki pasmowemu, jednowarstwowemu układowi komórek piramidowych sektora CA₁ rogu Amona, analizę morfometryczną wykonaną przy użyciu rutynowej siatki, oparto na obliczeniu liczby komórek w powtarzalnym 0,3 mm jego odcinku. Każde obliczenie przeprowadzano na 5 kolejnych skrawkach pochodzących z 3—5 zwierząt. Uśrednioną liczbę neuronów przypadających na pojedynczy 0,3 mm odcinek sektora CA₁ u zwierząt nie poddanych żadnemu zabiegowi doświadczalnemu traktowano jako 100%, do których odnoszono zmiany ilościowe stwierdzone u zwierząt doświadczalnych i kontrolnych. Znamienności statystyczne obliczano przy użyciu testu dla średnich niezależnych.

WYNIKI

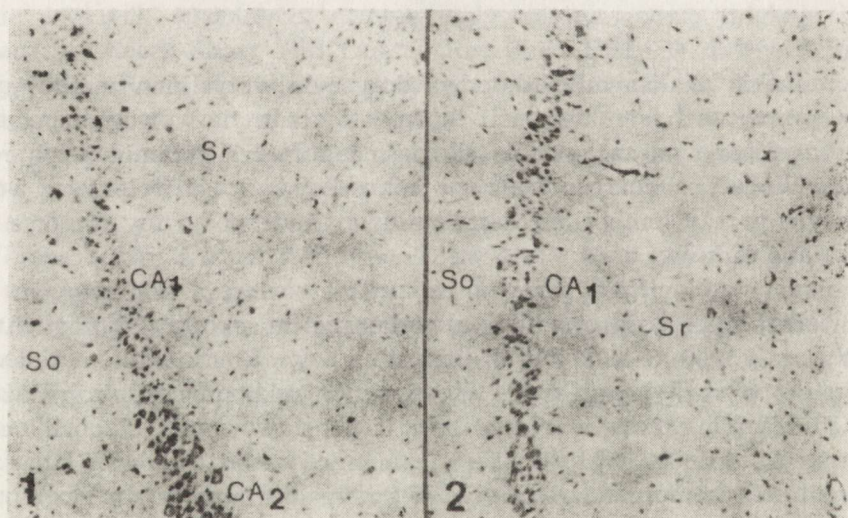
Pomimo iż analiza mikroskopowa dotyczyła wszystkich znajdujących się w preparatach struktur ośrodkowego układu nerwowego, specjalną uwagę zwrócono na zachowanie się pasma komórek piramidowych rogu Amona. Wobec braku różnic obrazu mikroskopowego u zwierząt z 5-i 7-dniowym przeżyciem po niedokrwieniu obydwie podgrupy czasowe po-traktowano łącznie.

Zmiany patologiczne zarówno w grupie zwierząt kontrolnych, jak i doświadczalnych były ograniczone wyłącznie do sektora CA₁ rogu Amona. Wyrażały się one całkowitym lub częściowym ubytkiem komórek nerwowych, z wyraźnym, niekiedy warstwowym rozplemem gleju gwiaździstego. Pozwoliło to na wprowadzenie 3 podstawowych kategorii oceny stanu strukturalnego sektora CA₁: niezmienny oraz całkowity lub częściowy ubytek komórek nerwowych. W przypadku pierwszym liczba neuronów przypadających na uśredniony 0,3 mm odcinek sektora CA₁ wynosiła $44,7 \pm 2,5$, analogicznie jak u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, w drugim — nie stwierdzano całkowicie komórek nerwowych w całym obszarze sektora CA₁ lub tylko ich pojedyncze egzemplarze. Zróznicowanie natężenia uszkodzeń struktury sektora CA₁, w grupie określonej jako „zanik częściowy” wymagało bliższej ilościowej charakterystyki stopnia uszkodzeń w oparciu o morfologiczną analizę proporcji zachowanych komórek nerwowych. Pozwoliła ona na wyróżnienie trzech stopni uszkodzenia, określonych jako znaczny (1°), umiarkowany

(2°) i nieznaczny (3°) ubytek neuronów. W przypadku 1° średnia liczba zachowanych komórek nerwowych w 0,3 mm odcinku sektora CA₁ wynosiła $15,7 \pm 4,3$, w 2° — $23,6 \pm 4,1$ a w 3° — $33,0 \pm 4,7$. Stanowiło to odpowiednio 35,1, 52,7 i 73,8% wartości prawidłowych. Analiza statystyczna wykazała wysoką znamienność różnic pomiędzy poszczególnymi grupami i każdą z nich w stosunku do wartości prawidłowej ($p \leq \leq 0,0001$).

Zwierzęta kontrolne

Pośród 18 zwierząt z 5-min niedokrwieniem mózgu zmiany patologiczne w sektorze CA₁ rogu Amona stwierdzono w 9 przypadkach, co stanowiło 50% badanego materiału. U 5 chomików wyrażały się one całkowitym zanikiem komórek piramidowych z wtórnym odczynem wytwórczym gleju gwiaździstego, zachowującym warstwowy układ struktury (ryc. 1). W pozostałych 4 przypadkach stwierdzono ubytki komórkowe o różnym nasileniu, z przewagą nieprawidłowości zakwalifikowanych do stopnia 1 i 2 (ryc. 2, 3, 4). Ubytkom komórkowym towarzyszyło zwyrodnienie znacznej części zachowanych neuronów. W 9 przypadkach obraz mikroskopowy całego pasma komórek piramidowych rogu Amona,

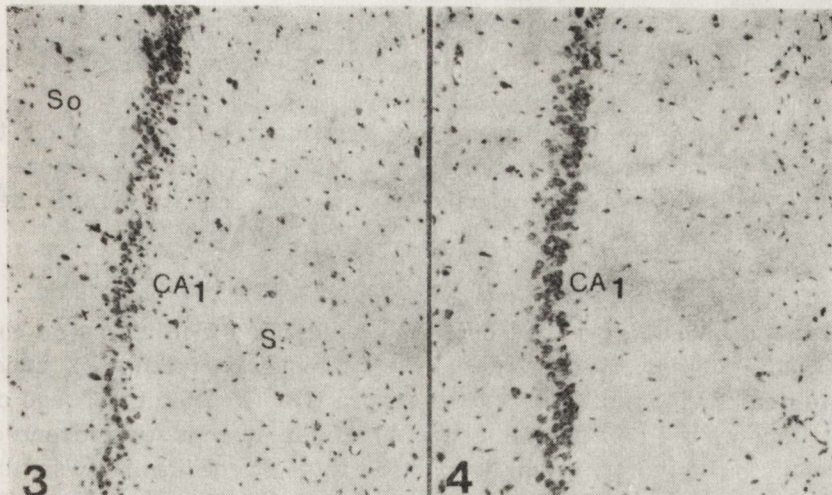


Ryc. 1. Zwierzę kontrolne z 5-min niedokrwieniem bez podawania indometacyny, 5 dni przeżycia. Całkowity zanik neuronów w sektorze CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×, CA₁ — sektor CA₁ rogu Amona, CA₂ — sektor CA₂, So — warstwa brzeżna, Sr — warstwa promienista

Fig. 1. Control animal, 5 min ischemia without indomethacin pretreatment, 5 days survival. Total loss of CA₁ neurons with secondary glial proliferation. Cresyl violet. × 100. CA₁ and CA₂ — CA₁ and CA₂ sectors of Ammon's horn, So — stratum oriens, Sr — stratum radiatum

Ryc. 2. Zwierzę kontrolne z 5-min niedokrwieniem bez podawania indometacyny, 5 dni przeżycia. Częściowy zanik neuronów sektora CA₁. Zachowanych ok. 30% komórek. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 2. Control animal, 5 min ischemia without indomethacin pretreatment, 5 days survival. Partial loss of CA₁ neurons: ca 30% of neuronal population is preserved

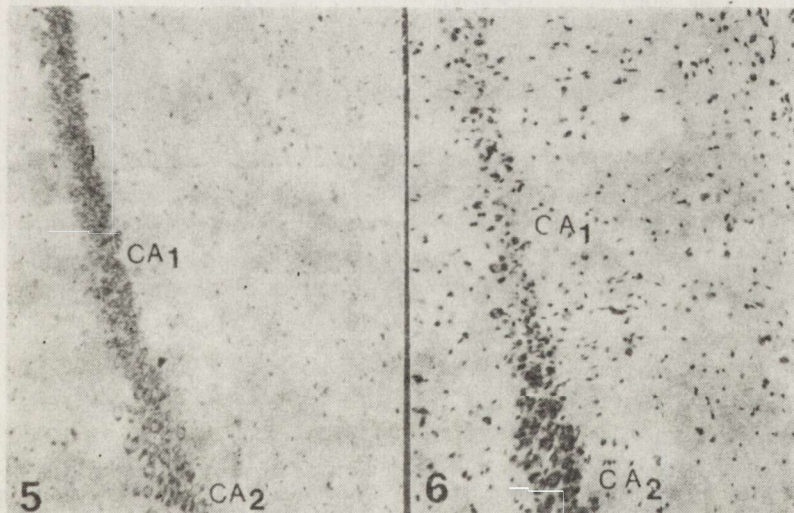


Ryc. 3. Zwierzę kontrolne z 5-min niedokrwieniem bez podawania indometacyny. Częściowy zanik neuronów sektora CA₁. Zachowanych ok. 50% neuronów. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 3. Control animal, 5 min ischemia without indomethacin pretreatment, 5 days survival. Partial loss of CA₁ neurons: ca 50% of neuronal population is preserved (2°). Cresyl violet. × 100

Ryc. 4. Zwierzę kontrolne z 5-min niedokrwieniem bez podawania indometacyny, 5 dni przeżycia. Częściowy zanik neuronów sektora CA₁. Zachowanych ok. 70% neuronów. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 4. Control animal, 5 min ischemia without indomethacin pretreatment, 5 days survival. Partial loss of CA₁ neurons: ca 70% of neuronal population is preserved (3°). Cresyl violet. × 100



Ryc. 5. Zwierzę kontrolne z 5-min niedokrwieniem bez podawania indometacyny, 5 dni przeżycia. Całkowicie zachowane neurony sektora CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 5. Control animal, 5 min ischemia without indomethacin pretreatment, 5 days survival. Unchanged neuronal population of CA₁ sector. Cresyl violet. × 100

Ryc. 6. Zwierzę doświadczalne z 5-min niedokrwieniem z wyprzedzającą pojedynczą dawką indometacyny, 5 dni przeżycia. Całkowity zanik neuronów sektora CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 6. Experimental animal, 5 min ischemia preceded by a single dose of indomethacin, 5 days survival. Total loss of CA₁ neurons with secondary gliosis. Cresyl violet. × 100

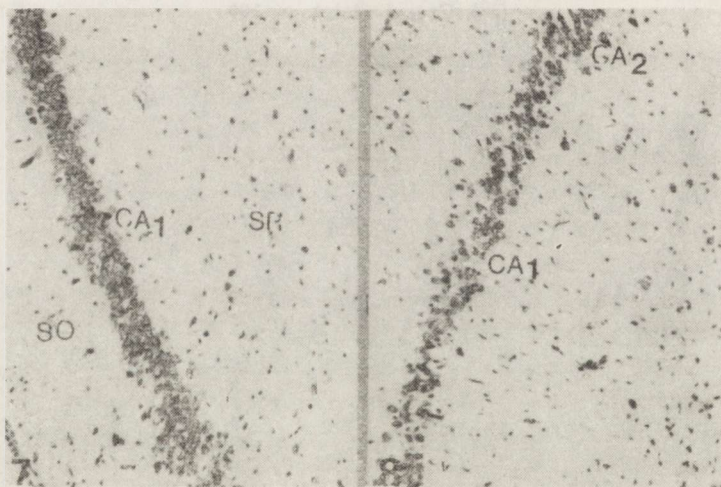
łącznie z sektorem CA₁ nie wykazywał nieprawidłowości strukturalnych (ryc. 5).

U zwierząt z 7,5 minutowym podwiązaniem tętnic szyjnych tylko u 1 spośród 6 stwierdzono prawidłowo zachowane komórki sektora CA₁, w 3 przypadkach występował całkowity, a w 2 częściowy zanik neuronów oceniony na stopień 1 i 3.

Zwierzęta doświadczalne

Grupa doświadczalna I. Spośród 10 zwierząt z 5-minutowym niedokrwieniem poprzedzonym podaniem indometacyny tylko u 2 zwierząt wystąpił całkowity zanik neuronów sektora CA₁ (ryc. 6), a u 3 jego obraz mikroskopowy był niezmieniony (ryc. 7). U pozostałych stwierdzono częściowy ubytek komórek z tym jednak, że w 4 przypadkach mieścił się w stopniu 3 (ryc. 8) i 2 (3 chomiki — stopień 3, 1 — stopień 2). Tylko u jednego zwierzęcia miał on nasilenie odpowiadające stopniowi 1 (ryc. 9).

U zwierząt z 7,5-minutowym niedokrwieniem nasilenie zmian mimo podawania leku było większe. Niezmienioną populację komórkową sektora CA₁ stwierdzono tylko w 1 przypadku na łączną liczbę 5 zwierząt. W 2 przypadkach występował całkowity, a w 2 częściowy zanik neuronów, po jednym w stopniu 2 i 3.

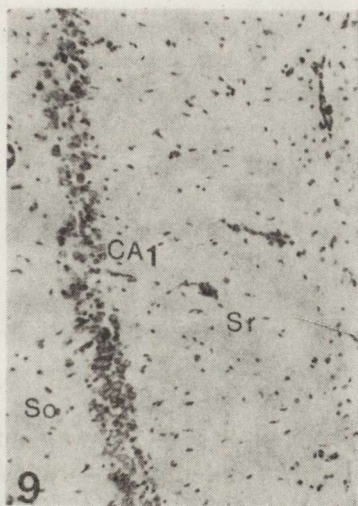


Ryc. 7. Zwierzę doświadczalne z 5-min niedokrwieniem z poprzedzającą pojedynczą dawką indometacyny, 5 dni przeżycia. Całkowicie zachowane neurony sektora CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 7. Experimental animal, 5 min ischemia with indomethacin pretreatment, 5 days survival. Unchanged neuronal population of CA₁ sector. Cresyl violet. × 100

Ryc. 8. Zwierzę doświadczalne z 5-min niedokrwieniem z poprzedzającą pojedynczą dawką indometacyny, 5 dni przeżycia. Częściowy zanik neuronów sektora CA₁. Zachowane ok. 70% komórek nerwowych. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 8. Experimental animal, 5 min ischemia with indomethacin pretreatment, 5 days survival. Partial neuronal loss in CA₁ sector (3°). Cresyl violet. × 100



Ryc. 9. Zwierzę doświadczalne z 5 min niedokrwieniem z poprzedzającą pojedynczą dawką indometacyny, 5 dni przeżycia. Częściowy zanik neuronów sektora CA₁. Zachowane ok. 30% komórek. Fiolet kryzylu. Pow. 100 ×

Fig. 9. Experimental animal, 5 min ischemia with indomethacin pretreatment, 5 days survival. Partial neuronal loss in CA₁ sector (1°). Cresyl violet. × 100

Grupa doświadczalna II. U zwierząt z 5-minutowym niedokrwieniem przy dwukrotnym podaniu indometacyny w żadnym przypadku nie stwierdzono całkowitego ubytku neuronów sektora CA₁, a aż w 4 spośród 5 obraz mikroskopowy był niezmienny. W jednym przypadku częściowego zaniku neuronów, nasilenie odpowiadało stopniowi 3. Przy wydłużeniu czasu niedokrwienia do 7,5 min, przy dwukrotnym podaniu indometacyny w żadnym przypadku nie stwierdzono również całkowitego ubytku neuronów sektora CA₁. Częściowy zanik występujący u 1 zwierzęcia spośród 5 badanych obejmował około 50% populacji komórkowej (stopień 2). U czterech królików nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości strukturalnych.

Grupa doświadczalna III. Przy przesunięciu czasu podania jednorazowej iniekcji indometacyny z 45 min przed 5-minutowym niedokrwieniem, na 3 godz. po niedokrwieniu niezmienną populację komórkową rogu Amona stwierdzono w 3 przypadkach na 5 badanych. U dwu zwierząt występował częściowy zanik komórek sektora CA₁ mieszczący się w granicach 2°.

Porównanie wyników uzyskanych u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych, przedstawionych w tabeli 1 wskazuje, że u chomików mongolskich z niedokrwieniem mózgu, którym nie podawano indometacyny uszkodzenie sektora CA₁ występowało w 58,3% przypadków, w tym ciężkie, za które uznano zarówno całkowity zanik neuronów, jak i ich ubytek w granicach stopnia 1, obecne było w 45,8%. Analogiczne dane dla grupy z indometacyną wynoszą odpowiednio 50,0 i 12,6%. Niezmienną po-

Tabela 1. Zestawienie wyników u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych
 Table 1. Comparison of results in treated and untreated animals

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt No of animals	Całkowity zanik neuronów w CA ₁ Total loss of CA ₁ neurons	Częściowy zanik neuronów w CA ₁ Partial loss of CA ₁ neurons			CA ₁ niezmieniony No changes
			1°	2°	3°	
			Zwierzęta kontrolne Untreated animals	24	8	
Zwierzęta doświadczalne Treated animals	30	4	1	3	7	15

pulację komórek nerwowych sektora CA₁ w grupie nie leczonej stwierdzono w 41,7% przypadków, a w leczonej — w 50,0%. Różnica ta kształtowała się jeszcze wyraźniej przy uwzględnieniu natężenia uszkodzeń komórkowych. Niezmieniona populacja komórkowa sektora CA₁ oraz lekkie i umiarkowane uszkodzenia (stopień 2 i 3 łącznie), występowało u zwierząt bez indometacyny w 54,2% przypadków, a u zwierząt z podawanym lekiem w 83,2%.

Tabela 2. Zestawienie wyników u zwierząt doświadczalnych w zależności od sposobu podawania indometacyny

Table 2. Comparison of results of treated animals depending on the mode of indomethacin application

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt No of animals	Całkowity zanik neuronów w CA ₁ Total loss of CA ₁ neurons	Częściowy zanik neuronów w CA ₁ Partial loss of CA ₁ neurons			CA ₁ niezmienione No changes
			1°	2°	3°	
			Grupa doświadczalna I Experimental group I	15	4	
Grupa doświadczalna II Experimental group II	10	—	—	1	1	8
Grupa doświadczalna III Experimental group III	5	—	—	—	2	3

Porównanie skuteczności indometacyny w zależności od sposobu jej podania (tab. 2) wskazuje, iż najmniej korzystne wyniki uzyskano przy jednorazowym podaniu w 45 min przed niedokrwieniem mózgu. W grupie tej w aż 33,3% przypadków stwierdzono ciężkie uszkodzenia sektora CA₁ rogu Amona, wyrażające się bądź całkowitym zanikiem neuronów bądź ich znacznym ubytkiem (1°). Najkorzystniejsze wyniki stwierdzono natomiast przy dwukrotnym podaniu indometacyny. Zmiany ciężkie nie występowały tu w ogóle, a w 80% przypadków nie stwierdzono żadnych

nieprawidłowości w strukturze sektora CA₁. Dobre wyniki uzyskano również przy opóźnionym w stosunku do poprzedniego schematu, podawaniu indometacyny. Tu również nie obserwowano zmian ciężkich, a obecne w 2 przypadkach uszkodzenia sektora CA₁ mieściły się w ich stopniu najlżejszym (3°).

Tabela 3. Zestawienie wyników u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych w zależności od czasu niedokrwienia

Table 3. Comparison of results in treated and untreated animals depending on the time of ischemia

Grupa zwierząt Group of animals	Czas niedokrwienia Time of ischemia	Liczba zwierząt No of animals	Całkowity zanik neuronów w CA ₁ Total loss of CA ₁ neurons	Częściowy zanik neuronów w CA ₁ Partial loss of CA ₁ neurons			CA ₁ niezmiennione No changes
				1°	2°	3°	
Grupa kontrolna Control group	5 min 7.5 min	18 6	5 3	2 1	1 —	1 1	9 1
Grupa doświadczalna I Experimental group I	5 min 7.5 min	10 5	2 2	1 —	1 1	3 1	3 1
Grupa doświadczalna II Experimental group II	5 min 7.5 min	5 5	— —	— —	— 1	1 —	4 4

Przedłużenie czasu niedokrwienia do 7,5 min pogłębiało nasilenie uszkodzeń tkankowych (tab. 3). Zaznaczało się to w sposób wyraźny w grupie zwierząt nie otrzymujących indometacyny oraz w grupie doświadczalnej I. Dwukrotne podanie leku różnicę tę niwelowało niemal całkowicie.

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań, w przeciwieństwie do spostrzeżeń Suzuki i wsp. (1983a) wskazują, iż zanik komórek piramidowych sektora CA₁ rogu Amona, stanowiący późne następstwo krótkotrwałego obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych u chomików mongolskich nie jest zjawiskiem stałym. Występuje ono jedynie u około 50% zwierząt, przy czym całkowity zanik obecny jest w jeszcze mniejszym odsetku przypadków. U części zwierząt ma on charakter niecałkowity wahając się w granicach od około 30 do 70% komórek nerwowych. Ubytkom komórkowym towarzyszą nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe zachowanej populacji neuronów. W 50% przypadków struktury rogu Amona nie wykazują nieprawidłowości mikroskopowych. Jest to tym bardziej zaskakujące, iż w innej serii badań Suzuki i wsp. (1983b) wykazali całkowity zanik czynności bioelektrycznej neuronów sektora CA₁, badanej przy użyciu elektrod głębinowych już w drugim dniu po niedokrwieniu, kiedy nie stwier-

dzono jeszcze wykładników ich strukturalnego uszkodzenia. Co więcej, przedłużenie czasu niedokrwienia do 7,5 min, pogłębiając wprawdzie stopień uszkodzeń tkankowych, nie prowadziło do ich wystąpienia u wszystkich zwierząt poddanych zabiegowi. Fakt ten w sposób niewątpliwy ogranicza wartość modelu doświadczalnego do badań wpływu leków, mających osłaniać tkankę nerwową przed skutkami jej niedokrwienia.

Do grupy takich substancji należą indometacyna, stanowiąca znany inhibitor cyklo-oksigenazy, katalizującej syntezę różnych klas prostaglandyn (Abdel-Halim i wsp. 1978), gromadzących się w mózgu w następstwie jego niedokrwienia (Ruszczewski 1977; Gaudet, Levine 1979; Gaudet i wsp. 1980; Iannotti i wsp. 1981; Moscowitz, Coughlin 1981a; Bhakoo i wsp. 1982). Nagromadzone w mózgu prostaglandyny, a przynajmniej niektóre ich grupy, mogą wywierać uszkodzający wpływ na elementy strukturalne tkanki nerwowej na drodze ich wazoaktywnego działania oraz destabilizującego efektu na błony komórkowe. Mogą również sprzyjać powstawaniu mikrozakrzepów płytkowych. Badania szeregu autorów, w tym Furlowa i Hallenbecka (1978), Moscowitza i Coughlina (1981b), Boulu i wsp. (1982), Bhakoo i wsp. (1982), Kärgrströma i wsp. (1983), Mossakowskiego i Kwiatkowskiej-Patzer (1983) oraz Mossakowskiego i Gajkowskiej (1984) wskazują, iż indometacyna może tym uszkodzeniom skutecznie zapobiegać.

Pogląd ten popierają również wyniki przedstawionej powyżej serii badań, jakkolwiek sugerują one, iż osłaniający wpływ indometacyny nie jest w tym przypadku całkowity i wykazuje wyraźną zależność od dawki i sposobu podawania leku. Przy pojedynczej dawce indometacyny, zastosowanej w okresie poprzedzającym niedokrwienie mózgu jej efekt niewątpliwie uchwytne, był najsłabszy zarówno u zwierząt z 5-, jak i 7,5-minutowym podwiązaniem tętnic szyjnych. W obydwu grupach występowały, choć w mniejszej proporcji niż u zwierząt nieleczonych, przypadki całkowitego lub częściowego zaniku komórek nerwowych w sektorze CA₁ rogu Amona. Znacznie wyraźniejszy wpływ osłaniający stwierdzono przy dwukrotnym podawaniu leku — w okresie poprzedzającym niedokrwienie i w 5 godz. po przywróceniu krążenia w mózgu. Przy tym sposobie podawania indometacyny zarówno u zwierząt z 5- i 7,5-minutowym niedokrwieniem nie występował całkowity zanik neuronów piramidowych, a częściowe uszkodzenia sektora CA₁ spostrzegane w pojedynczych przypadkach miały nieznaczne nasilenie. Wyjaśnienie korzystniejszego działania leku przy jego dwukrotnym podawaniu jest oczywiście w świetle 6-godzinnego okresu półtrwania indometacyny (Abdel-Halim i wsp. 1978). Podobnie dla zapobieżenia zaburzeniom mikrokrążenia w mózgu, rozwijającym się w następstwie jego niedokrwienia okazało się niezbędne wielokrotne podawanie leku (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1982). W badaniach nad ultrastrukturalnymi skutkami niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego u chomików mongolskich, Mos-

sakowski i Gajkowska (1984) stwierdzili, że osłaniające działanie indometacyny wyczerpuje się po upływie 6 godz. Podtrzymująca dawka leku okazała się tym bardziej niezbędna w przypadku długotrwałego procesu jakim jest zanik neuronów sektora CA₁, ujawniający się dopiero po upływie kilku dni od niedokrwienia i stanowiący wyraz tzw. zjawiska dojrzewania procesu patologicznego (Klatzo 1975).

Na odrębną uwagę zasługują wyniki badań w grupie zwierząt ze zmienionym schematem podawania indometacyny z wyprzedzającego niedokrwienia na wczesną fazę restytucji krążenia mózgowego. Uzyskano tu efekt niewątpliwie korzystniejszy niż w grupie I. W badaniach nad osłaniającym działaniem indometacyny w przypadkach niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego podkreśla się na ogół niezbędność jej stosowania w okresie wyprzedzającym zatrzymanie krążenia w mózgu (Furlow, Hallenbeck 1978; Hallenbeck, Furlow 1979; Iannotti i wsp. 1981; Kärgrström i wsp. 1983; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983). Związane jest to z faktem, iż cyklo-oksigenaza, której działanie jest hamowane przez indometacynę, wymaga dla ujawnienia swojej aktywności obecności tlenu (Siesjö i wsp. 1982), dostarczanego do mózgu natychmiast po przywróceniu w nim krążenia. Obecność odpowiedniego stężenia indometacyny we krwi już przed niedokrwieniem zapewnia hamowanie aktywności enzymu w mózgu we wczesnej fazie po przywróceniu krążenia, kiedy dochodzi do gromadzenia się kwasu arachidonowego, stanowiącego substrat do syntezy prostaglandyn. Uzyskanie osłaniającego efektu indometacyny przy jej podaniu po incydencie niedokrwicznym stwarza korzystne implikacje zastosowań klinicznych. Należy jednakże wziąć pod uwagę fakt, że w użytych modelach doświadczalnych mamy do czynienia z bardzo lekkim niedokrwieniem mózgu, mieszczącym się w czasowych granicach pełnej odwracalności, o ograniczonym zakresie uszkodzeń strukturalnych i bardzo powolnym przebiegu procesu patologicznego. Cechą znamioną natomiast zjawiska dojrzewania procesu patologicznego jest odwrotna proporcjonalność czasu jego rozwoju do intensywności uszkodzeń. Skuteczność tego schematu stosowania indometacyny w ciężkich epizodach niedokrwieniowych wymaga odrębnego sprawdzania doświadczalnego.

Mechanizm osłaniającego działania indometacyny, związany z zahamowaniem syntezy prostaglandyn w warunkach niedokrwienia mózgu jest nadal niewyjaśniony. Wobec braku w zastosowanym modelu doświadczalnym znaczących zaburzeń mikrokrążenia mózgowego (Mossakowski 1978) i nie stwierdzenia mikrozakrzepów naczyniowych (Mossakowski, Gajkowska 1984), najbardziej prawdopodobne wydaje się bezpośrednie działanie cytoprotekcyjne, związane z zapobieganiem destabilizacji błon komórkowych, być może między innymi przez antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do fosfolipazy A₂, aktywizującej się w czasie niedokrwienia (Jesse, Franson 1979), lub ograniczenie przepuszczalności błon

komórkowych dla jonów wapnia (Volpi i wsp. 1980). Znaczenie tego właśnie cytoprotekcyjnego działania indometacyny w zapobieganiu następstwom tkankowym niedokrwienia mózgu podnosili uprzednio Crockard i wsp. (1980), Iannotti i wsp. (1981), Bhakoo i wsp. (1982) oraz Mossakowski i Gajkowska (1984), a Pappius i Wolf (1976) zwrócili uwagę na jej korzystny wpływ na szereg metabolicznych parametrów mózgu uszkodzonego przez różne czynniki.

ВЛИЯНИЕ ИНДОМЕТАЦИНА НА ИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕКТОРА СА₁ АММОНОВА РОГА У МОНГОЛЬСКИХ ХОМЯКОВ

Резюме

Авторы проследили защищающее влияние индометацина на селективное повреждение сектора СА₁ аммонова рога вследствие кратковременной ишемии головного мозга. Эксперимент был проведен на монгольских хомяках, у которых авторы подвязывали с обеих сторон общие сонные артерии на промежуток 5 мин. и 7,5 мин. Переживаемость после ишемии составляла 5 или 7 дней. Экспериментальные животные получали брюшинную инъекцию индометацина в дозе 8 мг/кг массы тела на 45 мин. перед или в 3 часа после ишемии. Добавочную группу составляли животные с двукратным введением индометацина в промежутке 6 часов. Контрольные животные не получали лекарственного средства.

Результаты исследований показали что индометацин оказывал защищающее действие во всех экспериментальных группах, защищая от повреждения нейроны сектора СА₁ аммонова рога или уменьшая интенсивность констатированных изменений. Самый благоприятный защищающий эффект констатировано у животных, которые двукратно получали лекарственное средство. Заслуживает внимания хороший результат полученный в группе с применением лекарственного средства в 3 часа после ишемии.

Авторы выдвинули предположение, что защищающий эффект индометацина связан с предупреждением дестабилизации клеточных оболочек нейронов.

INFLUENCE OF INDOMETHACIN ON ISCHEMIC ALTERATIONS OF THE CA₁ SECTOR OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBILS

Summary

The protective influence of indomethacin on selective damage of Ca₁ neurons of Ammon's horn resulting from short lasting cerebral ischemia was studied. Experiments were performed on Mongolian gerbils in which common carotid arteries were bilaterally ligated for 5 or 7.5 min. The animals were given intraperitoneal injection of indomethacin in a dosis of 8 mg/kg b.w. either 45 min prior to cerebral ischemia or 3 h after release of carotid ligation. Animals with doubled dosis of indomethacin given 45 min before and 5 h after ischemia formed an additional experimental group. Untreated animals were considered as a control group.

The results of experiments demonstrated that indomethacin exerts a protective action in all experimental groups either preventing appearance of neuronal damage in Ammon's horn sector CA₁ or reducing its intensity. The most remarkable effect of the drug was found in the case of its double application. Good results obtained in the group of animals in which indomethacin was given 3 h following ischemia, are worth mentioning.

It seems that the protective effect of indomethacin is connected with prevention of cellular membrane destabilization.

PIŚMIENICTWO

1. Abdel-Halim M. S., Sjoquist B., Änggård E.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis in rat brain. *Pharmacol. Toxicol.*, 1978, 43, 266—272.
2. Bhakoo K. K., Lascelles P. T., Crockard H. A., Avery S. F.: Brain prostaglandins and cerebral edema following temporary vascular occlusion in gerbils. V Intern. Conf. Prostaglandins, Florence, May 18—21, 1982. Abstracts, p. 706.
3. Boulu R. G., Plotkin M., Guenian C., Sofeir M., Wiernsperger N.: Effect of indomethacin in experimental cerebral ischemia. *Pathol. Biol.*, 1982, 30, 278—281.
4. Crockard H. A., Iannotti F., Hunstock A. H., Smith R. D., Harris R. J., Symon L.: Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in gerbil. *Stroke*, 1980, 11, 494—498.
5. Furlow T. W. Jr., Hallenbeck J. M.: Indomethacin prevents impaired perfusion of the dog brain after global ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 591—594.
6. Gaudet R. J., Alam I., Levine L.: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 653—658.
7. Gaudet R. J., Levine L.: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 86, 393—401.
8. Hallenbeck J. M., Furlow T. W. Jr.: Prostaglandin I₂ and indomethacin prevent impairment of postischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke*, 1979, 10, 629—637.
9. Hallenbeck J. M., Leitch D. R., Dutka A. J., Greenbaum L. J., McKee A. E.: Prostaglandin I₂, indomethacin and heparin promot postischemic neuronal recovery in dogs. *Ann. Neurol.*, 1980, 12, 145—156.
10. Harris R. J., Bayhan M., Brandson N. M., Watson A., Symon L.: Modulation of pathophysiology of primat focal cerebral ischemia by indomethacin. *Stroke*, 1982, 13, 17—24.
11. Iannotti F., Crockard A., Ladds G., Symon L.: Are prostaglandins involved in experimental cerebral ischemia in gerbils? *Stroke*, 1981, 12, 301—306.
12. Jesse R. L., Dranson R. C.: Modulation of purified phospholipase A₂ activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1979, 375, 467—470.
13. Kårgström E., Smith M. L., Wallstedt L., Siesjö B. K.: Cyclo-oxygenase inhibition by indomethacin and recirculation following cerebral ischemia. *Acta physiol. Scand.*, 1983, 118, 193—201.
14. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *The nervous system — the basic neuroscience*. Red. D. B. Tower. Raven Press, New York 1975, 313—322.
15. Moscovitz M. A., Coughlin S. R.: Clinical application of prostaglandins and their inhibitors. *Stroke* 1981a, 12, 882—886.
16. Moscovitz M. A., Coughlin S. R.: Basic properties of the prostaglandins. *Stroke*, 1981b, 12, 689—701.
17. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. W: *Advances in Neurology*. Red. J. Cervos-Navarro. Raven Press. New York, 1978, 20, 161—171.
18. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Effect of indomethacin on the morphology of the brain vascular network in the postischemic period. International symposium on "Developmental and circulatory aspects of brain metabolism". Belgrad 1982, Abstracts p. 47.
19. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287—301.

20. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347—365.
21. Pappius H. M., Wolf L. S.: Some further studies on vasogenic edema. W: Dynamics of brain edema. Red. H. M. Pappius, W. Feindel. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 138—148.
22. Ruszczewski P.: Poziom endogennych prostaglandyn w krwi żyłnej mózgu u psa w warunkach hipo- i hiperkapnii, hipoksji i ostrego niedokrwienia mózgu. Praca doktorska. CMDiK PAN, Warszawa 1977.
23. Siesjö B. K., Wieloch T., Ingvar M.: Pathophysiology of hypoglycemic brain cell damage. W: Energy transduction and neurotransmission. Red.: G. Benzi, A. M. Giuffrida-Stella, H. S. Bachelard, A. Agnoli. World Federation of Neurology. Roma 1983, 69—82.
24. Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi F., Klatzo J.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow and local cerebral glucose utilization changes. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1983a, 69, 207—216.
25. Suzuki R., Yamaguchi T., Croh-Luh Li, Klatzo J.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils: II. Changes in spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA₁ sector of hippocampus. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1983b, 60, 217—222.
26. Volpi M., Naccache P. H., Shaafi R. I.: Arachidonate metabolites increase permeability of the plasma membrane of the neuropil to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, 92, 1221—1231.

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

PAWEŁ P. LIBERSKI, WIELISŁAW PAPIERZ, JANUSZ ALWASIAK

BRAIN FINE STRUCTURE IN CREUTZFELDT—JAKOB
DISEASE WITH PLAQUES AND TANGLES.
I. NEURITIC PLAQUES *

Department of Neurology, Department of Pathological Anatomy, and Department
of Oncology, Medical Academy, Łódź

Scrapie in sheep and goats (Dickinson 1976), Creutzfeldt—Jakob disease (CJD) (Gibbs et al. 1968), kuru (Gajdusek et al. 1966) in man and transmissible mink encephalopathy (Marsh, Hanson 1979) are fatal, transmissible diseases of the central nervous system caused by a replicating agent which has been called virino (Gajdusek 1977; Dickinson, Outram 1979). The spectrum of entities, which form the transmissible spongiform encephalopathies group is yet to be elucidated. There is some evidence suggesting that the Alzheimer disease (AD) and Gerstmann-Straussler syndrome (GSS) are of similar etiology (Rewcastle et al. 1978; Masters et al. 1980).

CJD, kuru, murine scrapie, AD and GSS share a common neuropathological phenomenon — the presence of neuritic or amyloid plaques. The senile or neuritic plaques are typical for AD (Wiśniewski, Terry 1973) and kuru plaques for kuru (Klatzo et al. 1979) and CJD (Krücke et al. 1974). The plaques encountered in GSS are of intermediate position (Masters et al. 1981). From the work done in murine scrapie it seems, however, that at least five types of plaque patterns could be recognized (Bruce, Fraser 1975). It is not unjustifiable to postulate more diversity in plaques morphology than previously recognized.

The aim of this communication was to report the fine structure of neuritic plaques encountered in a case of Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and tangles.

*The results of this paper were presented at the EMBO meeting "Scrapie and related unconventional infections", held in New Battley Abbey, Scotland, July, 1984.

Paper supported by Grant of Ministry of Health and Social Welfare (No 5).

MATERIAL AND METHODS

The detailed history of the patient was presented previously (Liberski 1984). Briefly, the patient, 32-year-old man died in the Department of Neurology, Medical Academy Łódź (Head Prof. Dr A. Prusiński) with signs of dementia, pyramidal signs, myoclonic jerks and dystonic movements of the trunk and extremities. Laboratory examinations were unremarkable except EEG which showed high-voltage, slow waves and spikes appearing in a diffuse synchronous pattern.

Autopsy was performed about 1 hour after death. After removing the brain, part of it was immediately frozen and stored at -20°C for further usage. 1–2 cubic mm samples were dissected from the cortex at the convexity and from the cingular gyrus, and fixed in 4% glutaraldehyde in cacodylate buffer at room temperature, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol solutions and embedded in Epon 812. The semithin sections were stained with methyl-blue. The ultrathin sections were double stained with lead citrate and uranyl acetate. The samples were examined and photographed with a JEM 100 C JEOL and EM 109 Zeiss.

RESULTS

At the light microscopy level the plaques appeared in diffuse manner through the cortex with special predilection to occipital and parietal lobes (Fig. 1). Some of them were most consistent with senile (neuritic) plaques of AD, some, however, were reminiscent of kuru plaques. These plaques consisted of a dense center and radiating halo composed of an amyloid (Fig. 2). The glial reaction consisting of astroglial and microglial cells was located around the plaques, what is atypical for kuru plaques, but encountered in senile plaques.

Ultrastructural analysis of the plaques revealed that they consisted of distended and degenerating axons. Synapses between them were observed (Fig. 4). In the majority of axons two types of changes were recognized. The axons were filled with inclusion bodies. Inclusions were oval or round and amorphous, electron-dense or lamellar and electron-lucent (Figs. 4, 5, 7, 8, 9). Electron-dense, amorphous and lamellar inclusions were intermingled in the same axons. All axons seemed to be in the same stage of development. The plaques, composed exclusively of distended, dystrophic axons filled with inclusion bodies were most consistent with neuritic plaques according to Wiśniewski and Terry (1973). In some plaques large vacuoles were formed (Fig. 3).

The second hallmark of the plaques were amyloid deposits (Figs. 5, 6) lying extracellularly in bundles, or haphazardly arranged fibrils. Amyloid fibrils were encountered inside the plaques themselves or be-

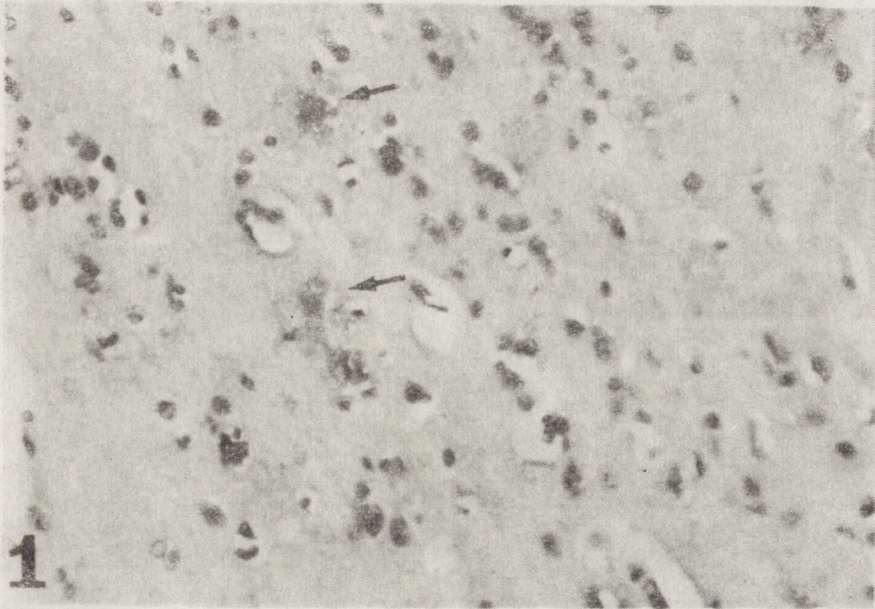


Fig. 1. Amyloid plaques reminiscent of "kuru" plaques (arrows). Cerebral cortex. H—E. $\times 160$

Ryc. 1. Płytki amyloidowe przypominające płytki typu „kuru” (strzałki). Kora mózgu. H—E. Pow. 160 \times

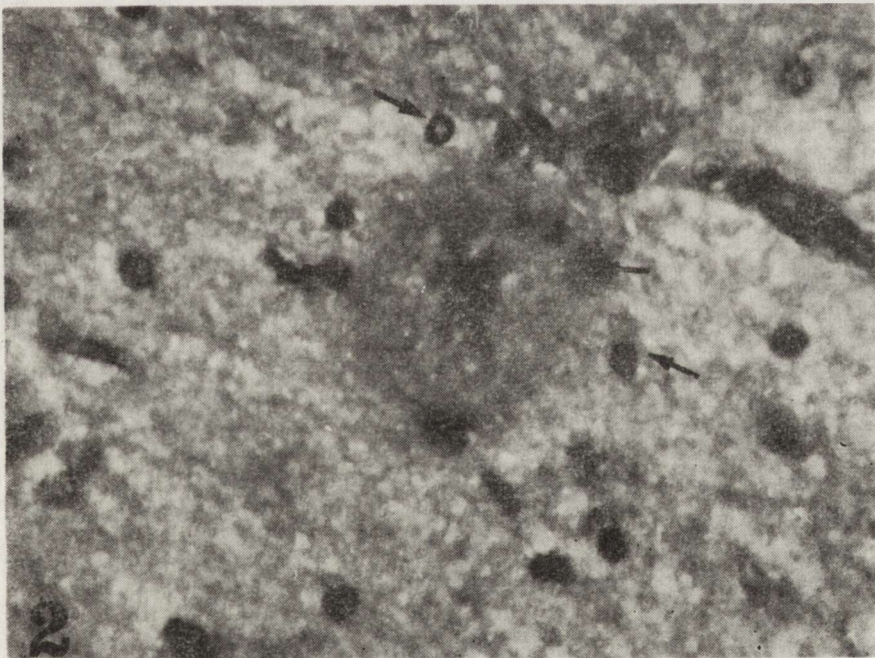


Fig. 2. Amyloid plaque reminiscent of "kuru" plaque. Note glial reaction around the plaque (arrows). H—E. $\times 400$

Ryc. 2. Płytki amyloidowa przypominająca płytkę typu „kuru”. Wyraźna reakcja glejowa wokół płytki (strzałki). H—E. Pow. 400 \times

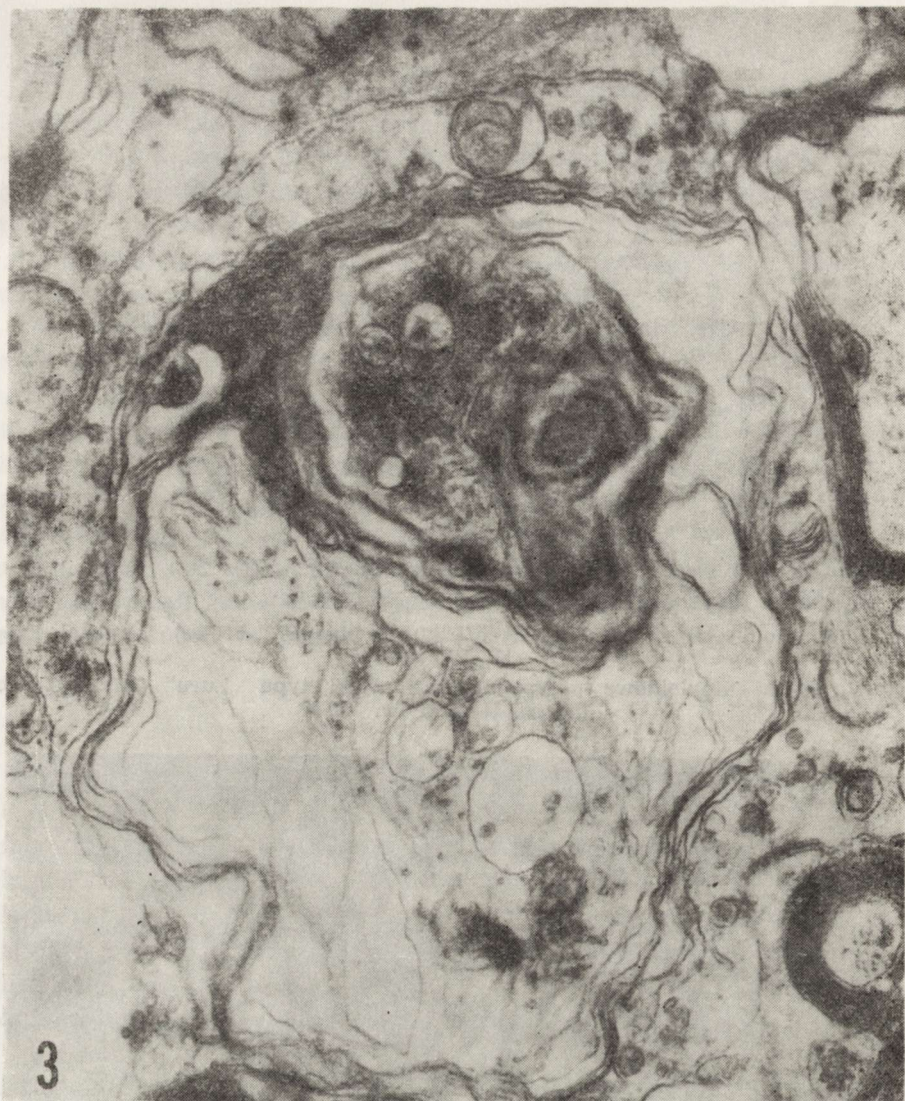


Fig. 3. Vacuole inside the degenerating axon. $\times 33\ 500$
Ryc. 3. Wakuola wewnątrz wyrodnijącego aksona. Pow. $33\ 500 \times$

tween other cellular elements. The plaques composed of amyloid fibrils as well as dystrophic neurites are called primitive plaques. It should be noted that some neurites were filled with fibrillar material of unknown nature (Fig. 8). The "kuru" plaques, identical to what is called stellate plaques of scrapie (Bruce, Fraser 1975) were never observed at the fine structural level.

The ultrastructural pattern of neurofibrillary changes, namely the tangles composed of paired helical filaments (Fig. 9) are presented in detail in the second part of this paper.

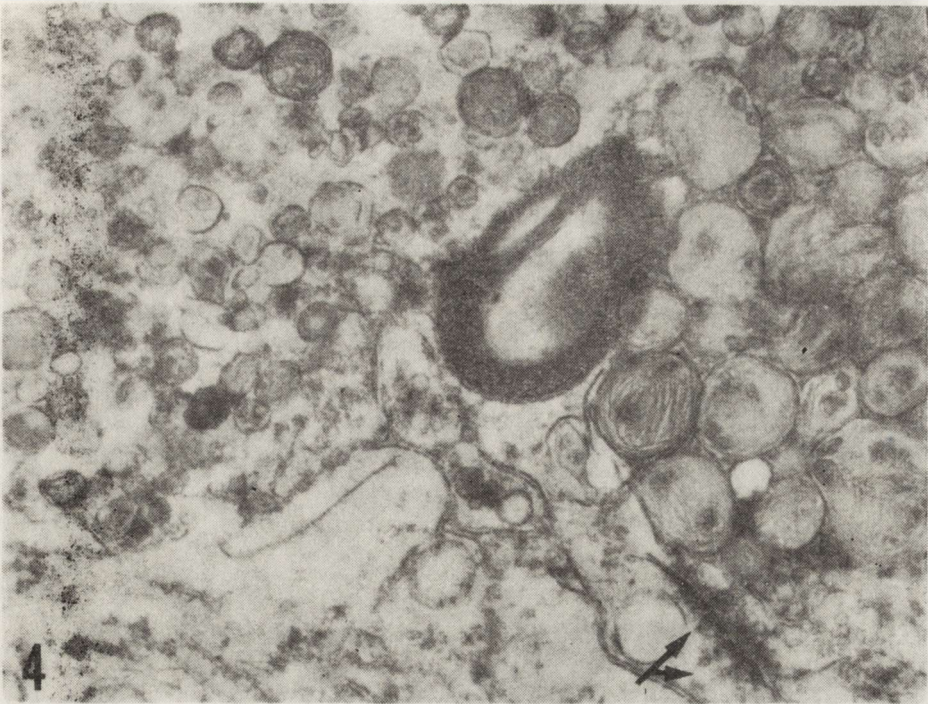


Fig. 4. Degenerating axon from neuritic plaque. Note abortive synapse on the axon (arrows). Axon filled with inclusion bodies: amorphous, homogenous, and lamellar.
 $\times 20\ 000$

Ryc. 4. Wyrodniający akson z płytki neurytycznej. Zwraca uwagę obecność zakończenia synaptycznego (strzałki). Akson wypełniają ciała wtórne: homogenne, bezpostaciowe i blaszkowate. Pow. $20\ 000 \times$

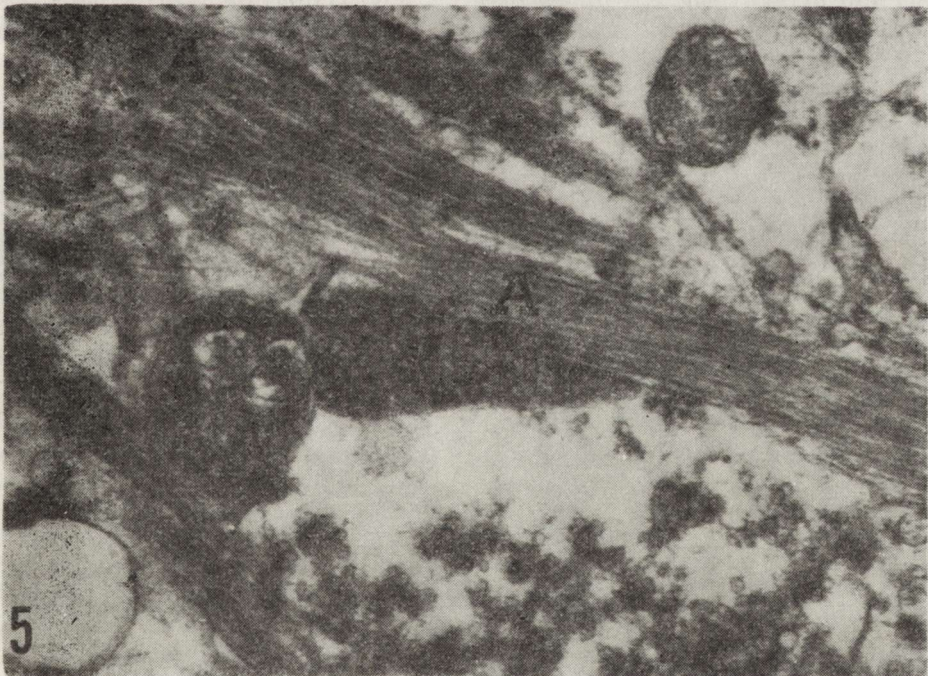


Fig. 5. Primitive plaque. Bundles of amyloid (A) lying between degenerating axons.
 $\times 20\ 000$

Ryc. 5. Płytki prymitywna. Pęczki włókienek amyloidowych (A) leżące pomiędzy wyrodniającymi aksonami. Pow. $20\ 000 \times$

DISCUSSION

Plaques composed of degenerating axons with concomitant amyloid were the ultrastructural hallmark of the case presented here. The neuritic (senile) plaque is typical for AD or senile dementia of Alzheimer type (SDAT) (Wiśniewski, Terry 1973; Wiśniewski et al. 1983). The neuritic plaque contains dystrophic or degenerating neurites. Neuritic plaques with admixture of wisps of amyloid are called primitive plaques. Those with central core of amyloid accompanied by dystrophic neurites and wisps of amyloid fibrils are named classical plaques. The latter type, with little or no neuritic processes, is referred to as amyloid plaque. Both astroglial and microglial cells surround the plaque. Beside humans, the neuritic plaques as well as other forms of plaques have been found in aged monkeys (Wiśniewski et al. 1973), rats (Vaughan, Peters 1981) and dogs (Wiśniewski, Terry 1973).

On the other hand, the plaques encountered in kuru and CJD are formed of a central stellate core of amyloid with few concomitant dystrophic neurites and glial cells. These are named kuru plaques (Krücke et al. 1974; Hayek, Ulrich 1975; Beck, Daniel 1979; Tateishi et al. 1979, 1983). The lack of glial cells around plaques differentiates them from senile plaques of AD.

The plaques in the Gerstmann-Straussler syndrome (GSS) (Masters et al. 1981) or Gerstmann-Straussler disease (Boellaard, Schlote 1980; Schlote et al. 1980; Kuzuhara et al. 1983) occupy an intermediate position. They are composed of a central core of amyloid surrounded by de-



Fig. 6. Higher magnification of a bundle of amyloid fibrils. $\times 66\ 000$
Ryc. 6. Duże powiększenie pęczka włókienek amyloidu. Pow. $66\ 000 \times$

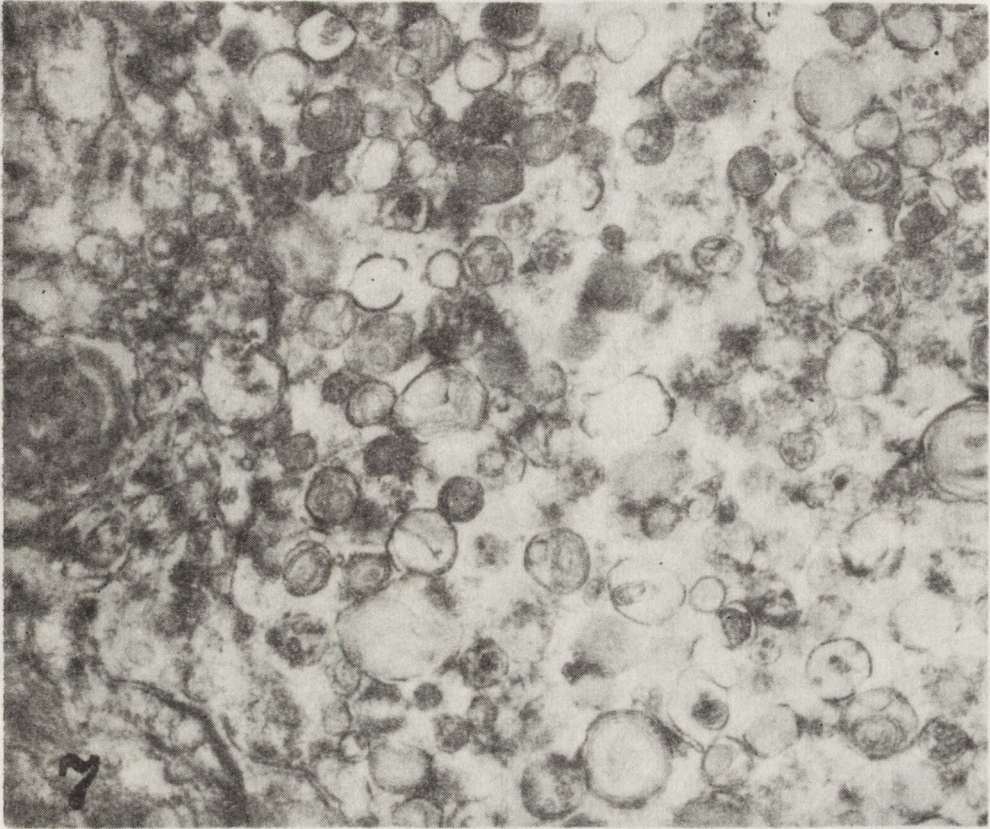


Fig. 7. Degenerating axon containing inclusion bodies. Note diversity of inclusions.
 × 33 500

Ryc. 7. Wyrodniający akson z ciałami wtętowymi. Zwraca uwagę różnorodność ciał wtętowych. Pow. 33 500 ×

generating neurites and reactive glial cells, similar to plaques in AD or SDAT. It should be stressed that GSS has been transmitted to animals (Masters et al. 1980). Nevertheless, the morphology, of GSS plaques is most consistent with AD or SDAT and not with kuru or CJD.

The plaques in murine scrapie show the greatest diversity in their morphology (Bruce, Fraser 1975). In light microscopy five types of plaques were observed. Those included: shadowy plaques, stellate ones corresponding to kuru plaques, amorphous plaques, giant plaques and diffuse formation of an amyloid. The stellate plaques are largely composed of an amyloid. The amyloid center of stellate appearance is sometimes surrounded by distended, degenerating neurites and occasionally microglial cells. It should be stressed once again, that senile plaques of AD or SDAT do not correspond strictly to any type of murine scrapie plaques.

The plaques described here, formed by degenerating neurites containing dense and lamellar bodies intermingled with wisps of amyloid

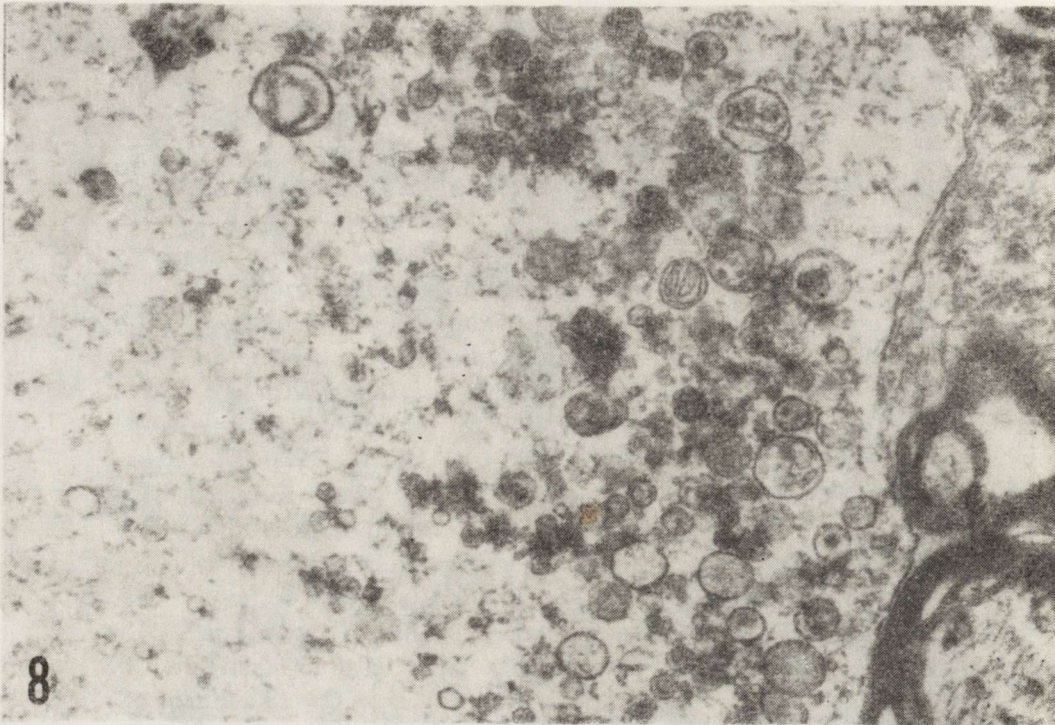


Fig. 8. Degenerating axon containing inclusion bodies, the center filled with dispersed fibrillar material. $\times 33\,500$

Ryc. 8. Wyrodniający akson zawierający ciała wtrętowe, w jego części centralnej rozproszony materiał włóknienkowy. Pow. $33\,500 \times$

filaments and surrounded by macro- and microglial cells are most consistent with the neuritic and primitive plaques of AD or SDAT (Wiśniewski, Terry 1973). The neurofibrillary tangles are also hallmarks of these disorders and were encountered in the case studied (see second part of this paper). Studies on the transmissibility of this case performed in hamsters with incubation period up to 500 days places this case within the spectrum of spongiform encephalopathies (Liberski 1984). There was, thus, some discrepancy between the etiology of the examined case and the underlying neuropathological findings (the nosological position of this case will be discussed in the second part of this paper). It should be noted, however, that 10% of CJD cases are characterized by neuritic plaques (Manuelidis — personal communication, 1984).

The pathogenetic significance of plaques formation is not clear. Plaques development was studied in AD and SDAT (Wiśniewski et al. 1983). In the early stages dystrophic neurites dominate the picture and a small amount of amyloid is observed. These are neuritic and primitive plaques. The process leads thus to the development of a central core of amyloid surrounded by degenerating neurites, and wisps of amyloid filaments occupying a peripheral position. These are classical plaques.

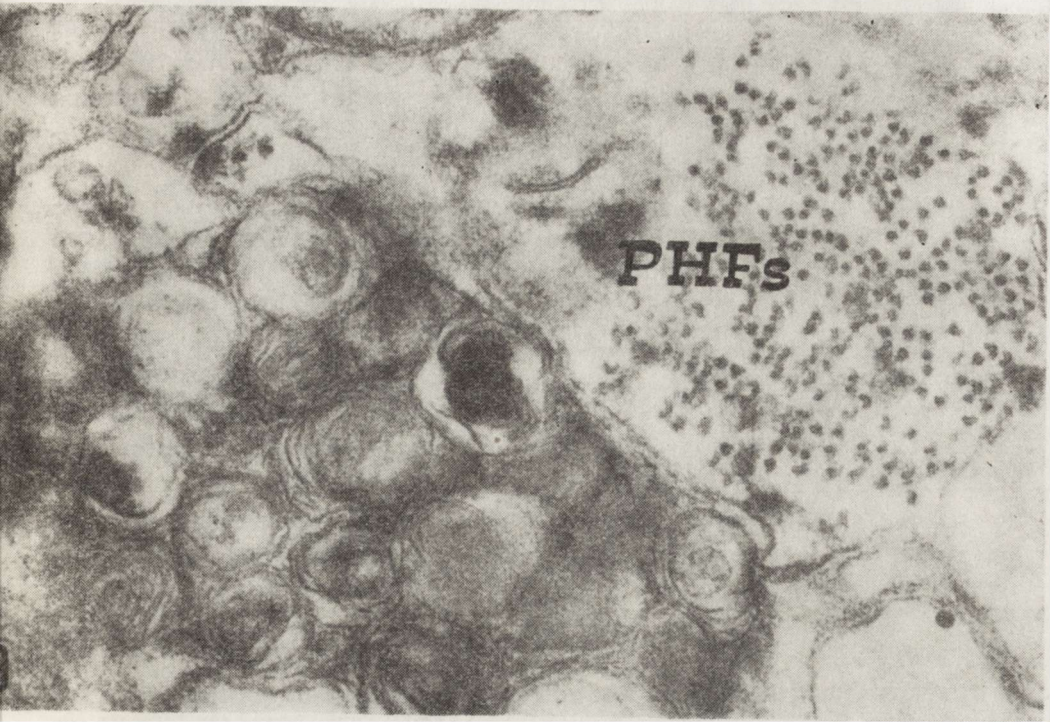


Fig. 9. Neuritic plaque containing degenerating axons. One of them filled with paired helical filaments (PHFs). $\times 52\ 000$

Ryc. 9. Płytkę neurytyczną zawierającą wyrodnijące aksony. Jeden z nich wypełniony podwójnymi helikalnymi filamentami (PHFs). Pow. $52\ 000 \times$

At the final stage the destruction of neurites is finished and only the amyloid ("burned off") center is visible. This stage corresponds to amyloid plaques. It should be stressed, however, that in spongiform encephalopathies the plaque formation pattern is not so clearly arranged, and the data concerning its development are too scanty.

The experiments performed in murine scrapie elucidated, at least partly, the data gathered from other spongiform encephalopathies studied. The formation of plaques is dependent on the particular strain of scrapie and the host genotype as well (Bruce et al. 1976). The incidence of plaques formation with different mouse genotype and scrapie strain combination varied between 0 and 100% (Bruce et al. 1976). The 87A and 87V strains show the highest incidence, and 22C, 79A and 79V the lowest. Some scrapie strains, namely, ME7 and 22A produce a moderate number of plaques. It should be stressed however, that the incidence of plaques formation is also governed by the host genotype. The plaque counts are different for both ME7 and 22A strains passaged through C57Bl, VM and F_1 cross mice, which are of different genotype as regards the Sinc gene (Dickinson, Outram 1979). In both cases the incidence of cerebral amyloidosis corresponds to the range of incubation periods.

However, the incidence of amyloidosis is not a simple consequence of prolonged incubation period. The scrapie strains 22C, 79A and 79V producing no plaques have incubation periods with the range of strains producing a large number of plaques (Bruce, Fraser 1982). This observation is supported by the results of experiments in which the increasing age of inoculation (and, therefore, of death) does not produce an increase in plaques formation (Bruce, Fraser 1980). In very old mice (from 813 to 1186 days) no plaques are encountered, thus, probably ageing itself is not a factor in plaques formation. Similar conclusions are probably justifiable for CJD. Only a limited number of cases (and probably strains) is characterized by plaques formation (Tateishi et al. 1979, 1983; Masters et al. 1981) and there is some evidence to suggest that plaques associated with isolates are easier to transmitted to small laboratory rodents (Tateishi et al. 1979, 1983; Liberski 1984). GSS differs also in scope of species of animals susceptible to experimental transmission (Masters et al. 1981). GSS, characterized by numerous plaques formation is transmissible to Spider and Squirrel monkeys, with incubation periods 20 and 30 months, respectively, but not to chimpanzees. It should be stressed, also that the duration of diseases in CJD with plaques is longer than in CJD without them, and duration of GSS is ten times longer than for CJD without kuru plaques (Masters et al. 1981). The case described here characterized by a large number of plaques observed in LM and EM studies and relatively easily transmissible to hamsters (Liberski 1984), confirmed also the view that the plaques-producing factor is mostly strain-associated and not a simple consequence of ageing or duration of disease itself.

Plaques formation is associated with a scrapie agent replication, to some degree at least (Bruce 1981). The presence of plaques is the first histopathological change to be seen which appeared at about one-sixth of the lapse of the incubation period. In each combination of scrapie-strain-mouse genotype studied so far the plaques are seen first in the corpus callosum and around lateral ventricles. These observations are supported by the fact of presence of amyloid deposits along the needle track (Wiśniewski et al. 1981). In other brain areas, remote from the site of injection the plaques appeared much later. Similar results were obtained when using different routes of inoculation (Bruce, Fraser 1981). The plaque number is consistently lower with intraperitoneal than with intracerebral injection in three strains studied and their localization is different. It should be stressed also that higher numbers of plaques are observed at the site of injection, and injection at the midline resulted in approximately equal distribution between the halves of the brain (Bruce 1981).

ULTRASTRUKTURA CHOROBY CREUTZFELDTA—JAKOBA
Z PŁYTKAMI I ZWYRODNIENIEM WŁÓKNIENKOWYM
I. PŁYTKI NEURYTYCZNE

Streszczenie

Omówiono ultrastrukturę przypadku choroby Creutzfeldta—Jakoba u 32 letniego chorego z zespołem piramidowo-pozapiramidowym, miokloniami oraz charakterystycznym zapisem w EEG. Liczne płytki neurytyczne i pierwotne dominowały w obrazie neuropatologicznym. Głównym komponentem płytek były wyrodnijące aksony, zawierające bezpostaciowe i blaszkowate ciała wtętowe. W obrębie płytek oraz w wyrodnijących aksonach o pustym wyglądzie obserwowano podwójne helikalne filamenty odpowiadające zwyrodnieniu włóknienkowemu Alzheimer'a. Część płytek zawierała leżące pozakomórkowo złogi amyloidu.

W oparciu o obraz ultrastrukturalny przedyskutowano pozycję nozologiczną przypadku oraz znaczenie i patogenezę płytek amyloidowych.

УЛЬТРАСТРУКТУРА БОЛЕЗНИ КРЕЙЦФЕЛЬДТА—ЯКОБА
С ПЛАСТИНКАМИ И С ФИБРИЛЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ.
I. НЕВРИТИЧЕСКИЕ ПЛАСТИНКИ

Резюме

Обсуждена ультраструктура случая болезни Крейцфельдта—Якоба у 32-летнего больного с пирамидально-экстрапирамидальным синдромом, с миоклониями и характерной записью ЭЭГ. В невропатологической картине преобладали множественные невритические и примитивные пластинки. Главным компонентом пластинок были дегенерирующие аксоны содержащие инклюзионные аморфические и пластинчатые тела. В пределах пластинок и в дегенерирующих аксонах с пустым внешним видом авторы наблюдали двойные геликальные филаменты соответствующие фибриллярной дегенерации Альцгеймера. Часть пластинок содержала лежащие внеклеточно конкременты амилоида.

Опираясь на ультраструктурную картину, авторы обсудили нозологическую позицию случая, а также значение и патогенез амилоидных пластинок.

REFERENCES

1. Beck E., Daniel P. M.: Kuru and Creutzfeldt—Jakob disease: neuropathological lesions and their significance. In: Slow transmissible disease of the nervous system. Vol. 1. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York 1979, 253—270.
2. Boellaard J. W., Schlote W.: Subakute spongiforme Encephalopathie mit multiformer Plaquebildung. Acta neuropath. (Berl.), 1980, 49, 205—212.
3. Bruce M. E.: Serial studies on the development of cerebral amyloidosis and vacuolar degeneration in murine scrapie. J. comp. Pathol., 1981, 91, 589—597.
4. Bruce M. E., Fraser H.: Amyloid plaques in the brains of mice infected with scrapie: morphological variation and staining properties. Neuropathol. appl. Neurobiol., 1975, 1, 189—202.
5. Bruce M. E., Fraser H.: Effect of route of infection on the frequency and

- distribution of cerebral amyloidosis in scrapie mice. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1981, 7, 289—298.
6. Bruce M. E., Fraser H.: Effect of age on cerebral amyloid plaques in murine scrapie. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1982, 8, 71—74.
 7. Bruce M. E., Dickinson A. G., Fraser H.: Cerebral amyloidosis in scrapie in mouse: effect of agent strain and mouse genotype. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1976, 2, 471—478.
 8. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. In: *Slow virus diseases of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin. North-Holland, Amsterdam 1976, 210—241.
 9. Dickinson A. G., Outram G. W.: The scrapie replication site hypothesis and its implications for pathogenesis. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Vol. 2. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Acad. Press, New York 1979, 14—31.
 10. Gajdusek D. C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 1977, 197, 943—960.
 11. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M. P.: Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzee. *Nature*, 1966, 209, 794—796.
 12. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews W. B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science*, 1968, 388—389.
 13. Hayek J., Ulrich J.: Kuru-plaques in Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur. Neurol.*, 1975, 13, 251—257.
 14. Klatzo I., Gajdusek D. C., Zigas V.: Pathology of kuru. *Lab. Invest.*, 1959, 8, 799—847.
 15. Krücke W., Beck E., Vitzhum H.: Creutzfeldt-Jakob disease. Some unusual morphological features reminiscent of kuru. *Z. Neurol.*, 1974, 206, 1—24.
 16. Kuzuhara S., Kanazawa I., Sasaki H., Nakanishi T., Shimamura K.: Gerstmann-Straussler-Scheinker's disease. *Ann. Neurol.*, 1983, 14, 216—225.
 17. Liberski P. P.: EMBO Meeting "Scrapie and related unconventional infections", New Battley Abbey, Scotland, July, 1984.
 18. Marsh R. F., Hanson R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. In: *Slow transmissible disease of the nervous system*. Vol. 1. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York 1979, 451—460.
 19. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: The Gerstmann-Straussler syndrome and the various forms of amyloid plaques which occur in the transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1980, 39, 374.
 20. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstmann-Straussler syndrome. *Brain*, 1981, 104, 559—588.
 21. Lewcastle N. E., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Transmission of familial Alzheimer's disease to primates. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1978, 37, 679.
 22. Schlote W., Boellaard J. W., Schumm F., Stohr M.: Gerstmann-Straussler-Scheinker's disease. Electron-microscopic observations on a brain biopsy. *Acta neuropath. (Berl.)* 1980, 52, 201—211.
 23. Tateishi J., Sato Y., Koga M., Ohta M., Kuroiwa Y.: A transmissible variant of Creutzfeldt-Jakob disease with kuru-plaques. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Vol. 2. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Acad. Press, New York 1979, 175—185.
 24. Tateishi J., Sato Y., Ohta M.: Creutzfeldt-Jakob disease in human and laboratory animals. In: *Progress in neuropathology*. Vol. 5. Ed. H. M. Zimmerman, Raven Press, New York 1983, 195—222.
 25. Vaughan D. W., Peters A.: The structure of neuritic plaques in the cerebral cortex of aged rats. *J. Neuropathol. exp. Neurol.* 1981, 40, 472—487.

26. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Reexamination of the pathogenesis of senile plaque. In: Progress in neuropathology. Vol. 2. Ed. H. M. Zimmerman, Grune-Stratton Inc. New York 1973, 1—26.
27. Wiśniewski H. M., Ghetti B., Terry R. D.: Neuritic senile plaques and filamentous changes in aged Rhesus Monkeys. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1973, 32, 566—584.
28. Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Lossinsky A. S.: Evidence for induction of localized amyloid deposits and neuritic plaques by an infectious agent. *Ann. Neurol.*, 1981, 10, 517—522.
29. Wiśniewski H. M., Merz G. S., Merz P. A., Wen G. Y., Iqbal K.: Morphology and biochemistry of neuronal paired helical filaments and amyloid fibers in humans and animals. In: Progress in neuropathology. Vol. 5. Ed. H. M. Zimmerman, Raven Press, New York 1983, 139—150.

Authors' address: Department of Neurology, Medical Academy, Łódź, 22 Kopcińskiego St.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Neurologicznego zawiadamia, że XIII Krajowy Zjazd Neurologów odbędzie się w Gdyni 28—30 maja 1987 r.

Głównym tematem Zjazdu będą postępy w diagnostyce i leczeniu chorób układu nerwowego. Ponadto przewiduje się tematy wolne.

W czasie Zjazdu zorganizowane zostaną sympozja Sekcji Neuroradiologicznej, Rozwojowej i Stwardnienia Rozsianego.

Zarząd Główny Polskiego Towarzystwa Neurologicznego ogłasza konkurs na pracę z historii neurologii.

Tematem jest działalność neurologów w kraju lub wkład neurologów pochodzenia polskiego do światowej neurologii. Termin nadsyłania prac upływa 30 maja 1986 r. Objętość prac nie może przekraczać 20 stron.

Prace należy przysyłać na adres: Sekretariat Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Neurologicznego Klinika Neurologiczna II Wydziału Lekarskiego, Prof. Hanna Jędrzejowska, ul. Stępińska 19/25, 00-739 Warszawa

PAWEŁ P. LIBERSKI, JANUSZ ALWASIAK, WIELISŁAW PAPIERZ

BRAIN FINE STRUCTURE IN CREUTZFELDT—JAKOB
DISEASE WITH PLAQUES AND TANGLES.
II. NEUROFIBRILLARY TANGLES COMPOSED OF PAIRED
HELICAL FILAMENTS *

Department of Neurology, Department of Oncology and Department of Pathological
Anatomy, Medical Academy, Łódź

The neurofibrillary tangles (NFT) are the second hallmark, besides neuritic plaques, of Alzheimer's disease (AD) or senile dementia of Alzheimer type (SDAT) (Wiśniewski 1978). They have not been described in transmissible spongiform encephalopathies, Creutzfeldt—Jakob disease (CJD) included (Wiśniewski et al. 1979), to which AD is related by its presumable etiology (Rewcastle et al. 1978; Goudsmit et al. 1980) or pathogenesis (Wiśniewski et al. 1976; Dickinson et al. 1983).

In the first part of this paper (Liberski et al. 1985) the fine structure of the neuritic and primitive plaques characterizing the case of atypical Creutzfeldt—Jakob disease has been described. In this study the ultrastructure of NFT composed of paired helical filaments (PHFs) was analysed. The nosological position of the studied case, and its possible relationships to both AD — SDAT and CJD were discussed.

MATERIAL AND METHODS

The brief case report as well as methods of tissue processing for electron microscopy have been described previously (Liberski et al. 1985).

RESULTS

As noted previously (Liberski et al. 1985) the neuritic and primitive plaques dominated the ultrastructural picture of the examined case. NFT were observed in axons in close association with the plaques, or in axons of "empty", electron lucent appearance (Figs 1, 2). The NFT were composed of PHFs (Figs 3, 4, 5). The PHFs were of indefinite length,

* The results of this paper were presented at the EMBO meeting "Scrapie and related unconventional infections", held in New Battley Abbey, Scotland, July, 1984.

Paper is supported by Grant of Ministry of Health and Social Welfare (No 5).

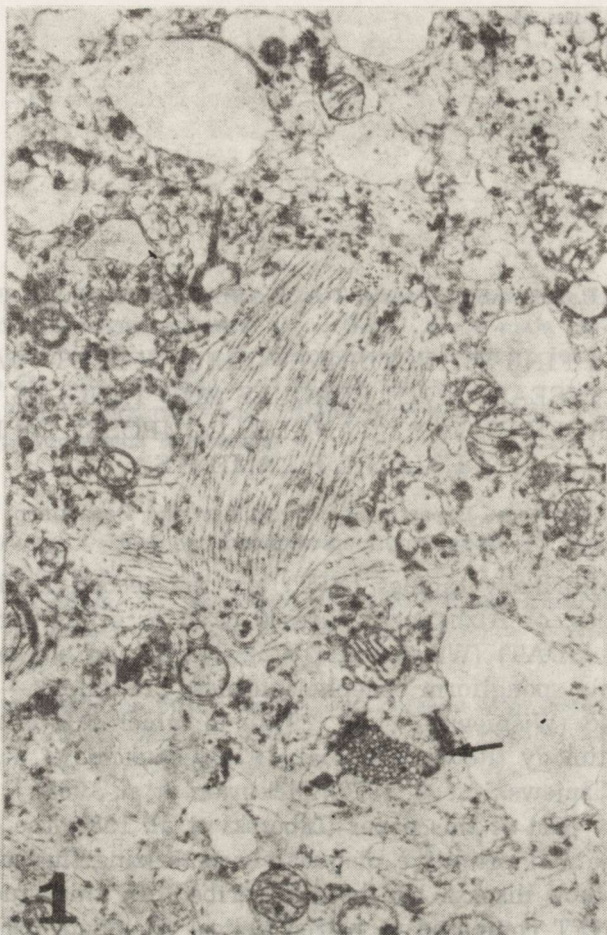


Fig. 1. Axon containing paired helical filaments. Degenerating synaptic terminal (arrow). $\times 12\ 000$

Ryc. 1. Akson zawierający podwójne helikalne filamenty. Wyrodniejące zakończenie synaptyczne (strzałka). Pow. $12\ 000 \times$

arciform or circular in cross section, 15 nm in diameter, with no side arms or branches. The filaments were twisted helically around each other at a distance of 76–92 nm between the nodal points. The pair of helical filaments measured approximately 35 nm to 38 nm of the widest and about 25 nm at their narrowest point. NFT both from axons situated at the margin of the plaques, and from the “empty” axonal profiles seemed to be identical.

DISCUSSION

The NFT are the hallmark of both AD and SDAT (Wiśniewski, Soifer 1976; Iqbal et al. 1978, 1982; Terry 1979; Terry, Katzman 1983). At the fine structural level the NFT are composed of 15 nm PHFs wound round



Fig. 2. Paired helical filaments. Each pair composed of two 15 nm filaments wound helically around each other (arrows), the distance between nodal points about 90 nm.
 × 334 000, bar = 0.5 μm

Ryc. 2. Podwójne helikalne filenty. Para utworzona z dwóch 15 nm filamentów okręconych helikalnie wokół siebie, z przewężeniami (strzałki) w odległości około 90 nm.
 Pow. 334 000 ×, skala = 0,5 μm

each other with crossovers at 80—100 nm (Wiśniewski et al. 1976; Shibayama, Kitoh 1978). The PHFs are clearly distinct from 10 nm neurofilaments and neurotubules characteristic for normal neurons. NFT composed of PHFs are found in the Guam parkinsonism-dementia-amyotrophic lateral sclerosis complex, postencephalitic parkinsonism, Down syndrome in adult persons, subacute sclerosing panencephalitis, ceroid-



Fig. 3. Paired helical filaments in cross, longitudinal and oblique sections. $\times 52\,000$
Ryc. 3. Przekroje podłużne, poprzeczne i skośne podwójnych helikalnych filamentów. Pow. $52\,000 \times$

-lipofuscinosis and Hallervorden-Spatz disease (Wiśniewski et al. 1976; Wiśniewski, Soifer 1979; Wiśniewski et al. 1979). The NFT formed by unknown structural elements but not PHFs were described in CJD (Wiśniewski et al. 1979). In several other pathological conditions both PHFs and straight filaments (SF) were observed. In progressive supranuclear palsy (Ghatak et al. 1980) the NFT are composed of SF 13—16 nm in diameter, besides PHFs measuring 20—22 nm in width with

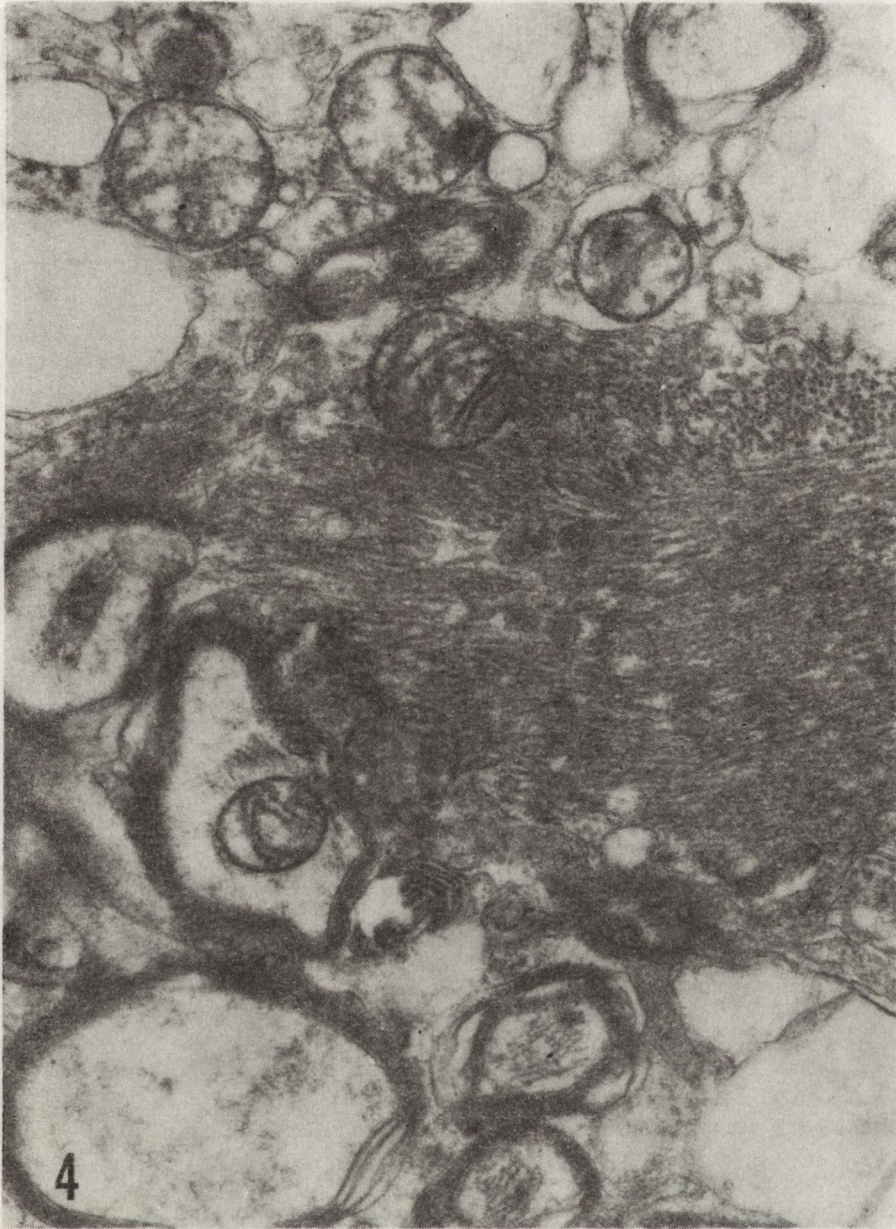


Fig. 4. Degenerating axon containing paired helical filaments. $\times 26\ 000$

Ryc. 4. Wyrodniejący akson zawierający podwójne helikalne filamenty. Pow. $26\ 000 \times$

regular constrictions at 70—90 nm intervals or twisted tubules 25—30 nm in width, with constrictions at 140—160 nm intervals, as concomitant finding. A similar mixture of SF measuring 15—20 nm in width, with twisted tubules constricted at 80—100 nm, was reported by Yagashita et al. (1980). The SF 15 nm in width intermingled with PHFs have

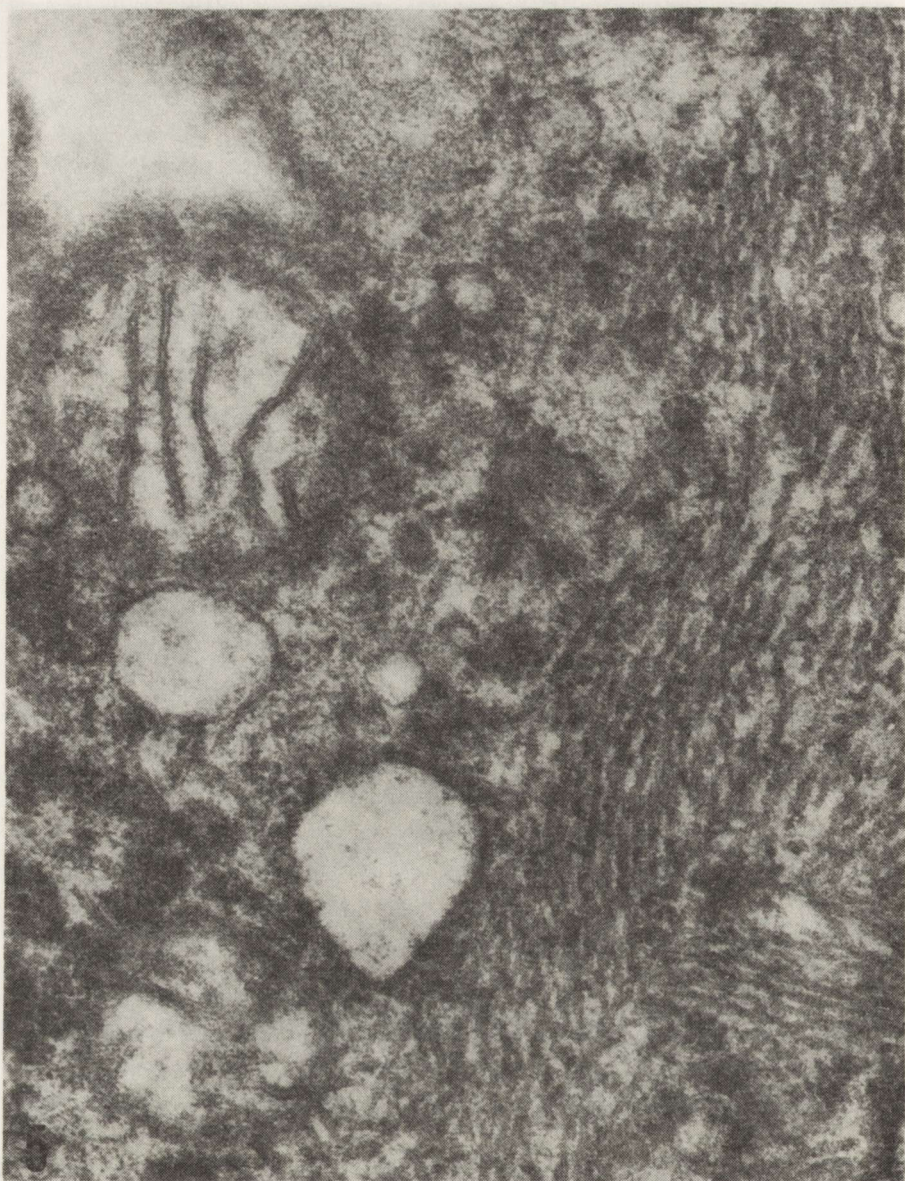


Fig. 5. Degenerating axon completely filled with paired helical filaments. $\times 52\,000$
Ryc. 5. Wyrodniejący akson całkowicie wypełniony podwójnymi helikalnymi filamentami. Pow. $52\,000 \times$

been shown by Ishii and Nakamura (1981) and by Rudelli et al. (1982) in a case of posttraumatic AD. In the latter case SF of 13–17 nm in width, showed random side arms, whereas PHFs width was 22 to 24 nm with periodic 8-nm constrictions about 70 to 100 nm apart. In a case of quadriplegia with myoclonic movements (Kuroda et al. 1979) the NFT were composed of 12-nm SF. Recently a lower motor neuron disease in

young pigs was described (Higgins et al. 1983), in which NFT were composed of 9—11-nm SF, with lateral branching arms, linking them into bundles.

The NFT of the case presented here were composed of paired helical filaments, each 15 nm in diameter, narrowning every 90 nm (77 to 92 nm). These NFT correspond to the 15-nm PHFs which characterize AD or SDAT. Other neuropathological findings in this case were numerous neuritic or primitive plaques (rarer) as classified according to Wiśniewski and Terry (1973). Thus, the ultrastructural pattern of the case presented here was most consistent with AD not with CJD. It should be stressed, however, that in about 10% of CJD cases neuritic plaques and PHFs are observed (Manuelidis 1984 — personal communication).

The apparent transmissibility of the presented case to hamsters (Liberki 1984) provided probably additional support to the hypothesis of "slow viral" etiology of AD. It was reported (Rewcastle et al. 1978) that two cases of the familial, but not the sporadic form of AD were successfully transmitted to both Spider and Squirrel monkeys but not to Chimpanzees. This report has not been confirmed by others and the significance of the above mentioned results is questionable (Goudsmit et al. 1980). It is noteworthy that extracts of brain tissue of AD patients seemed to induce the formation of PHFs in cultured human fetal neurons (DeBoni, Crapper 1978).

There are other possibilities that the case described here may represent what is called the "grey area" between AD and CJD or two independent processes are overlapping. Many questions raised by this report still remain open.

ULTRASTRUKTURA PRZYPADKU CHOROBY CREUTZFELDTA—JAKOBA Z PŁYTKAMI I ZWYRODNIENIEM WŁÓKIENKOWYM. II. ZMIANY WŁÓKIENKOWE UTWORZONE Z PODWÓJNYCH HELIKALNYCH FILAMENTÓW

Streszczenie

Omówiono ultrastrukturę podwójnych filamentów w przypadku choroby Creutzfeldta—Jakoba z płytkami starczymi i zwyrodnieniem włókienkowym Alzheimera. Pary utworzone z dwóch filamentów spotykano zarówno w aksonach powiązanych z płytkami starczymi (neurytycznymi i „prymitywnymi”), jak i poza płytkami, wewnątrz „pustych” elektronowo-jasných aksonów. Poszczególne filamenty o średnicy 15 nm tworzyły pary poprzez helikalne owinięcie dookoła siebie, ze zwężeniami co 76—92 nm (średnio 90 nm).

W dyskusji przedstawiono znaczenie patogenetyczne podwójnych filamentów oraz omówiono pozycję nozologiczną dyskutowanego przypadku (choroba Alzheimera, choroba Creutzfeldta—Jakoba lub forma pośrednia pomiędzy tymi dwoma jednostkami).

УЛЬТРАСТРУКТУРА СЛУЧАЯ БОЛЕЗНИ КРЕЙФЕЛЬДТА—ЯКОБА
С ПЛАСТИНКАМИ И ФИБРИЛЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ.
II. ФИБРИЛЛЯРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОБРАЗОВАННЫЕ ИЗ ДВОЙНЫХ ГЕЛИКАЛЬНЫХ
ФИЛАМЕНТОВ

Резюме

Обсуждена ультраструктура двойных филаментов в случае болезни Крейцфельдта — Якоба с сенильными пластинками и с фибриллярной дегенерацией Альцгеймера. Пары образованные из двух 15 нм филаментов авторы встречали как в аксонах связанных с сенильными пластинками (невротическими и примитивными), так и вне пластинок, внутри „пустых” электронно-светлых аксонов. Отдельные 15 нм филаменты образовали пары путем геликального обведения вокруг себя, со сужениями каждые 76—92 нм (в среднем 90 нм).

В дискуссии авторы представили патогенетическое значение двойных филаментов и обсудили нозологическую позицию вышеупомянутого случая (болезнь Альцгеймера, болезнь Крейцфельдта—Якоба или промежуточная форма между этими двумя единицами).

REFERENCES

1. De Boni U., Crapper D. R.: Paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured neurons. *Nature*, 1978, 271, 566—568.
2. Dickinson A. G., Bruce M. E., Scott J. R.: The relevance of scrapie as an experimental model for Alzheimer disease. In: Banbury report 15: Biological aspects of Alzheimer's disease. Cold Spring Harbor Laboratory 1983, 387—398.
3. Ghatak N. R., Nochlin D., Hadfield M. G.: Neurofibrillary pathology in progressive supranuclear palsy. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1980, 52, 73—76.
4. Goudsmit J., Norrow C. H., Asher D. M., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Evidence for and against the transmissibility of Alzheimer disease. *Neurology*, 1980, 30, 945—950.
5. Higgins R. J., Rings D. M., Fenner W. R., Stevenson S.: Spontaneous lower motor neuron disease with neurofibrillary accumulation in young pigs. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1983, 59, 288—294.
6. Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Neurofibers in Alzheimer dementia and other conditions. In: *Alzheimer's disease: senile dementia and related disorders (Aging, Vol. 7)*. Eds. R. Katzman, R. D. Terry, K. L. Bick, Raven Press, New York 1979, 409—420.
7. Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Merz P. A., Wiśniewski H. M.: Age-associated neurofibrillary changes. In: *The aging brain: cellular and molecular mechanisms of aging of the nervous system*. Ed. E. Giacobini. Raven Press, New York 1982, 247—257.
8. Ishii T., Nakamura Y.: Distribution and ultrastructure of Alzheimers neurofibrillary tangles in postencephalitic parkinsonism of Economo type. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1981, 55, 59—62.
9. Kuroda S., Otsuki A., Tateishi J., Hirano A.: Neurofibrillary degeneration in a case of quadriplegia and myoclonic movements. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1979, 45, 105—109.
10. Liberski P. P.: "Scrapie and related unconventional infections", EMBO Meeting, New Battley Abbey, Scotland, July, 1984.
11. Liberski P. P., Papierz W., Alwasiak J.: Brain fine structure of Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and tangles. I. Neuritic plaques. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 507—519.

12. Rewcastle N. E., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Transmission of familial Alzheimer disease to primates. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1978, 37, 679.
13. Rudelli R., Stom J. O., Welch P. T., Ambler M. W.: Posttraumatic praemature Alzheimer's disease. Neuropathologic finding and pathogenetic considerations. *Arch. Neurol.*, 1982, 39, 570—575.
14. Shibayama H., Kitoh J.: Electron microscopic structure of the Alzheimer's neurofibrillary changes in case of atypical senile dementia. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1978, 41, 229—234.
15. Terry R. D.: Morphological changes in Alzheimer's disease senile dementia: ultrastructural changes and quantitative studies. In: *Congenital and aquired cognitive disorders*. Ed. R. Katzman, Raven Press, New York 1979, 99—105.
16. Terry R. D., Katzman R.: Senile dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.*, 1983, 14, 497—506.
17. Wiśniewski H. M.: Possible viral etiology of neurofibrillary changes and neuritic plaques. In: *Alzheimer's disease: senile dementia and related disorders (Aging, Vol. 7)*. Eds. R. Katzman, R. D. Terry, K. L. Bick, Raven Press, New York 1978, 555—558.
18. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Reexamination of the pathogenesis of senile plaque. *Progress in neuropathology*. Vol. 2, Ed. H. M. Zimmerman, Grune and Stratton Inc., New York 1973, 1—26.
19. Wiśniewski H. M., Narang H. K., Terry R. D.: Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.*, 1976, 173—181.
20. Wiśniewski H. M., Soifer D.: Neurofibrillary pathology: current status and research perspectives. *Mech. aging Develop.*, 1979, 9, 119—142.
21. Wiśniewski K., Jervis G. A., Moretz R. C., Wiśniewski H. M.: Alzheimer neurofibrillary tangles in diseases other than senile and presenile dementia. *Ann. Neurol.*, 1979, 5, 208—294.
22. Yagashita S., Itch Y., Amano N., Nakano T.: The fine structure of neurofibrillary tangles in a case of atypical dementia. *J. Neurol. Sci.*, 1980, 48, 325—332.

Authors' address: Department of Neurology, Medical Academy, Łódź, 22 Kopcińskiego St.

LECH IWANOWSKI, ZOFIA CZECHOWSKA, MAREK SIELCZAK

ANALYSIS OF NEUROPATHOLOGICAL CHANGES
IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF 51 PATIENTS
WHO DIED FROM PROLIFERATIVE HEMATOLOGICAL DISEASES

Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre of Polish
Academy of Sciences and Department of Pathology Institute of Hematology,
Warszawa

The aim of this paper is an analysis of the neuropathological picture of the brain of adult patients who died from proliferative diseases of the hemopoetic system. They were treated according to modern methods of hematologic therapy. A similar group of patients was studied sixteen years ago (Mossakowski et al. 1963). But at that time the treatment of leukemia was not specific and different from the present one. We now try to compare the material collected recently with that collected in the period 1956—1959.

MATERIAL AND METHODS

The whole material was collected randomly during the 12 months period of 1976/1977 years in the Institute of Hematology in Warsaw. There were 51 cases (31 men and 20 women). The youngest patient was 16 y.o., the oldest 75 y.o. Survival time from the establishment of clinical diagnosis extended from 7 days to 12 years. All patients except one were treated. Treatment began directly after diagnosis was made. Thus, the time of therapy was the same as the time of survival except in two cases, where therapy began earlier because of other illness which later converted into leukemia. The classification of the nosologic entities, sex, age, and time of survival is presented in the Table 1.

The most important group consisted of patients with acute myelogenous leukemia (AML). The survival time was the shortest. The median of survival time of chronic exacerbate myelogenous leukemia (ChEML) and chronic myelogenous leukemia (ChML) was the same and it was markedly longer than in the case of chronic lymphocytic leukemia (ChLL)

Table 1. Clinical data
Tabela 1. Dane kliniczne

Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	Number of cases Liczba przypadków	Sex Płeć		Age years Wiek lata	Survival after diagnosis (months) Okres przeżycia od rozpoznania miesiące
		male mężczyźni	female kobiety		
AML	24	12	12	16–69 (35)	0.2–24 (3)
ChEML	13	9	4	21–57 (39)	0.75–132 (36)
ChML	3	3	0	46–72 (63)	24–108 (36)
ChLL	7	4	3	53–75 (69)	12–108 (24)
H. D.	3	2	1	31–56 (49)	36–156 (48)
Ly.sa.	1	1	0	23	14
Total Razem	51	31	20		

AML — *Leucaemia myelogenes acuta*

ChEML — *Leucaemia myelogenes chronica exacerbata*

ChML — *Leucaemia myelogenes chronica*

ChLL — *Leucaemia lymphatica chronica*

H. D. — *Lymphogranulomatosis*

Ly.sa. — *Lymphosarcoma*

In parentheses median is given

W nawiasach podano medianę

group. Patients with Hodgkin's disease (H.D.) survived longest. In every case precise post mortem examination was performed. All brains were examined after fixation, specimens were taken routinely and slices were stained by H—E and Heidenhain method. In some cases the technics of preparation were broadened. The whole collection was evaluated in the light microscope.

RESULTS

The pathological changes consisted in: brain edema, venostasis, leucostasis, hemorrhagic changes, leukemic infiltrations in the brain, meninges and cranial nerves and also damage of brain parenchyma. Edema and venostasis were observed in 43 cases. In 3 cases severe edema resulted in focal necrosis. Leucostasis (Fig. 1) occurred in 16 cases (Tab. 2). Leucostasis mostly accompanied a high white blood cell count (w.b.c.) in the peripheral blood. It reflected always cases with diffuse leukemic infiltrations in the brain (Fig. 2) and meninges. However, in 16 cases with

Table 2. Leucostasis — relation to peripheral blood picture and brain changes
 Tabela 2. Leukostaza — powiązanie z obrazem krwi obwodowej i zmianami w mózgu

Case catalogue no Nr katalog. przypadku	Leucostasis Leukostaza	Peripheral blood Krew obwodowa		Cause of death Przyczyna zgonu	Brain changes Zmiany w mózgu		
		w.b.c. Liczba krwinek w 1 mm ³ białych	e.c. czerwonych		hemorrhagic krwotoczne	infiltrations nacieki	edema obrzęk
AML 2948	+	12 000	8 630 000	leukemia	±	+	+
2953	++	46 000	3 780 000	pneumonia	—	+++	+
3009	+	13 000	4 400 000	leukemia	++	+	+
3041	++	60 500	2 580 000	brain hemorrhage	+++	—	+
3059	+	6 200	2 960 000	pneumonia	+	+	+
3082	++	40 400	3 860 000	brain hemorrhage	+++	+++	+
ChEML 2970	+++	650 000	2 710 000	brain hemorrhage	+++	+++	+
2998	+	1 000	1 750 000	sepsis	—	—	+
3027	+++	226 000	2 480 000	leukemia	±	++	+
3030	++	124 000	3 250 000	leukemia	—	—	+
3033	+++	465 500	1 800 000	duodenal hemorrhage	±	++	+
3079	++	36 500	3 990 000	leukemia	±	++	+
ChML 2978	++	415 000	2 720 000	brain hemorrhage	+++	++	+
ChLL 2999	+++	315 000	3 410 000	pneumonia	±	+++	+
3029	+	18 000	2 600 000	leukemia	—	—	+
3052	+++	126 000	2 790 000	pneumonia	±	—	+

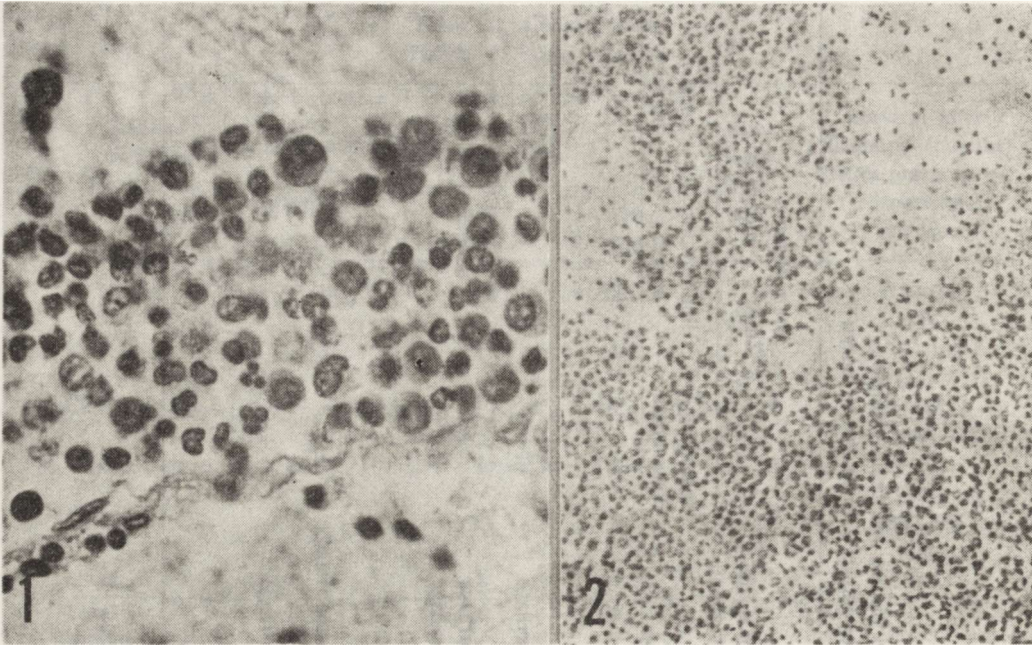


Fig. 1. Leucostasis in brain vessel. H—E. $\times 400$

Ryc. 1. Leukostaza w naczyniach mózgu. H—E Pow. $400 \times$

Fig. 2. Diffuse leukemic infiltrations in brain. H—E. $\times 64$

Ryc. 2. Rozległe nacieki białaczkowe w mózgu. H—E. Pow. $64 \times$

circumscribed leukemic infiltration leucostasis was present only in ten. It was not accompanied by diffuse infiltrations in cranial nerves. Leucostasis does not seem to be connected with hemorrhagic diathesis, because of the 12 cases with hemorrhagies, leucostasis was found only in 4. The leucostatic clot consisted mainly of myeloblasts. Table 3 shows hemorrhagic changes. Massive hemorrhagies were present in 12 cases. Small extravasations were found 8 times in the brain and 25 times in the meninges. Very often proliferation of connective tissue fibres was observed in the latter. Features of hemorrhagic diathesis were most often found in other organs than meninges and brain. Specific perivascular infiltrations were scheduled as diffuse and circumscribed to perivascular cuffing. We never saw any infiltration unconnected with a vessel. What is called leukemic nodules on the serially cut slices always seemed to be perivascular but diffuse. We found them in two cases, one AML and one ChEML. Diffuse infiltrations in the meninges were also found twice (one in the AML and one in ChLL). Diffuse infiltrations we found also in lymphosarcoma (Ly.sa), but they were present only in the choroid plexus, pituitary gland and cranial nerves. In the meninges and in the brain in this case only circumscribed cuffings were found. The other organs in this case were completely free of specific infiltrations. Except

Table 3. Neuropathological changes. A. Hemorrhagies and specific infiltrations
 Tabela 3. Zmiany neuropatologiczne. A. Zmiany krwotoczne i nacieki białczkowe

Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	Number of cases Liczba przypadków	Hemorrhagic changes Zmiany krwotoczne			Specific infiltrations Nacieki białczkowe				
		massive masywne	small drobne		perivascular okołonaczyniowe				perineurium of cranial nerves and hypophysis wokół nerwów czaszkowych i przysadki
			brain mózg	meninges opony	circumscribed ograniczone		diffuse rozlane		
					brain mózg	meninges opony	brain mózg	meninges opony	
AML	24	8	3	8	10	6	1	1	2
ChEML	13	2	1	8	3	3	1	0	0
ChML	3	2	1	3	1	1	0	0	0
ChLL	7	0	1	4	1	1	0	1	0
H.D.	3	0	2	2	0	0	0	0	0
Ly.sa.	1	0	0	0	1	1	0	0	1

Table 4. Neuropathological changes. B. Parenchymatous changes
 Tabela 4. Zmiany neuropatologiczne. B. Zmiany w parenchymie mózgowej

Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	Number of cases Liczba przypadków	Neuronal loss Ubytki neuronalne	Brain atrophy Zanik mózgu	Lacunar state Stan zatożowaty	Spongy state Stan gąbczasty	Necrosis Martwica	Gliosis Glejoza		Survival time (median) months Czas przeżycia (mediana) miesią- ce
							diffuse rozlana	focal ogniskowa	
AML	24	11	6 3 senile starczy	7 3 senile starczy	1	3 2 edematous obrzękowa	16	1	3
ChEML	13	9	0	3	1	1 1 edematous obrzękowa	12	0	36
ChML	3	1	1	1	0	0	1	0	36
ChLL	7	0	5 2 senile starczy	2 senile starczy	0	3 1 meningioma oponiak 2 senile starczy	5	0	24
H.D.	3	2	2	2	0	0	3	0	48
Ly.sa.	1	1	0	1	0	1	1	0	14

this case, diffuse specific infiltrations in the brain and meninges were always a sign of strong malignancy and aggressiveness of the neoplastic process, in these cases infiltrations and hemorrhagic diathesis features were found in all organs. Circumscribed leukemic infiltrations were observed more frequently. Sixteen times in the brain and 12 times in the meninges, mostly in AML. In other organs perivascular leukemic infiltrations were more frequent than in the brain.

Table 4 shows the changes in the brain parenchyma. They consisted of generalized neuronal loss, brain atrophy, diffuse foci of encephalomalacia, lacunar state, spongy state, and glial reaction diffuse and focal.

In 14 cases with brain atrophy five represented old people, the same was noted in status lacunaris. Large encephalomalacia foci were found in 5 cases — 4 resulted from atheromatous changes and one from a meningioma. Diffuse early spongiosis of the cerebral cortex was found in the case of Ly.sa. Demyelinating changes were found in 2 cases. One AML in the chiasma — a sharp cut plaque with disintegration of the tissue and diffuse myelin pallor with marginal infiltrations and the presence of abnormal oligodendrocytes and large reactive astrocytes in the brain hemispheres. These changes corresponded to progressive multifocal leukoencephalopathy (Figs 3, 4). Another case was secondary myelin and nerve fibres destruction due to Ly.sa. infiltrations in the optic chiasm.



Fig. 3. Progressive multifocal leukoencephalopathy. Sharp cut plaque in optic chiasm. Heidenhain. $\times 4$

Ryc. 3. Postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia. Ostro odgraniczone ognisko demielinizacji w skrzyżowaniu nerwów wzrokowych. Heidenhain. Pow. $4 \times$

Fig. 4. Progressive multifocal leukoencephalopathy. Diffuse myelin pallor in brain hemisphere. Heidenhain. $\times 1.1$

Ryc. 4. Postępująca wieloogniskowa leukoencefalopatia. Rozległe spłowienie mielin półkuli mózgu. Heidenhain. Pow. $1,1 \times$

DISCUSSION

The malignancy of pathologic process, time of survival, age of patients and neurotoxicity of the used antineoplastic agents conditioned the pattern of the changes. The whole material was revised under the aspect of the yatrogenic factor. We try to present evidence of this in Table 5. Brain atrophy was observed in 16 cases, mostly in aged patients, but in 6 cases less than 60 years old. All patients were treated intensively with combined antimetabolic drugs. The case 3009 was treated 14 years with busulfan because of polycythemia. This brain showed advanced atrophy and no arteriosclerosis. Generalized neuronal loss was observed in all cases treated in a prolonged schedule of therapy. Five cases with intense subependymal gliosis were young patients. Two of them were treated very intensively. One received the cytostatic drugs into the cerebral spinal fluid. Seven young patients (Table 6) were given cytostatic drugs via lumbar puncture, because of the high pleocytic blastic count in the cerebral spinal fluid. These findings were diagnosed by clinicians to reflect leukemic infiltrations in brain and meninges. Infiltrations were confirmed in all cases, in four cases accompanied by hemorrhages. Only one case, with shortest survival time was free from neuronal loss and gliosis. Heavy parenchymal changes in three young persons and myelin damage in two cases were found. The case with Ly.sa. was also treated with X-ray therapy. In the whole group of 42 cases intensively treated with antimetabolic drugs and 38 cases treated with corticosteroids generalized neuronal loss was found in 23 cases and diffuse gliosis in 38 cases. All patients treated with corticosteroids showed edematous changes.

Patient not treated — AML. 46 y.o., survival time 1.5 month, died from brain hemorrhage, showed neither neuronal loss nor gliosis. Similarly, we did not find parenchymal changes in one patient treated exclusively with corticosteroids (AML, 29 y.o., survival time 4 months, died from pneumonia). Six patients were treated with one cytostatic drug only, according to the schedule of prolonged therapy: one who showed generalized recent ischemic changes only — died from duodenal hemorrhage after 5 years of survival. The other five showed generalized neuronal loss and gliosis, two of them senile brain atrophy. The whole group had a long survival time.

All very intensively treated patients showed intense brain parenchyma changes. In the whole material parenchymal changes were not found in 1 patient not treated at all, 1 patient treated with corticosteroids only and 1 patient treated with one cytostatic drug according to a prolonged schedule. It should, however, be stressed that the health condition of these patients allowed for such a kind of therapy.

Table 5. Brain atrophy in relation to the therapeutic methods
 Tabela 5. Zaniki mózgu a metody leczenia

Case catalogue no Nr katalog. przypadku	Age (years) Wiek (lata)	Survival period (months) Czas przeżycia (miesiące)	Therapy — Leczenie						X-Ray napromienianie	
			prolonged przedłużone Busulfan Hydroxyurea Endoxan Leukeran	combined intensive intensywne, złożone VCR 6MP CTX ARA C LBD MOP HU			corticosteroids kortykosterydy	into c.s.f. Leki pod wane do płynu m.rdz.		
AML 3009	67	2.5	+++	B 14y				+		
3020	69	0.75						+		
3022	62	3						++		
3059	68	12						+++		
3077	67	1.75						+		
3088	20	14						+++		+++
ChEML 3044	50	36						+++		
ChML 3042	63	24	+++							
ChLL 2999	53	12						+++		
3029	75	96	+++					++		
3034	69	24						+		
3046	70	60	++					+++		
3052	59	20						+++		
H.D. 3023	49	36						+++		+
3058	56	48						+++		+
Ly.sa. 3049	23	14						++	+++	+

Table 6. Neuropathological changes in cases diagnosed on the basis of c.s.f. examination and treated with antimetabolic drugs into c.s.f.
 Tabela 6. Zmiany neuropatologiczne w przypadkach, w których podawano leki do kanału kręgowego po stwierdzeniu komórek nacieku swoistego w płynie mózgowo-rdzeniowym

Case catalogue no Nr katalog. przyp.	Clinical diagn. Rozp. klin.	Age (years) Wiek (lata)	Survival (months) Czas przeżycia (mies.)	Hemorrh. changes Zmiany krwotoczne	Infiltr. Nacieki	Neuronal loss Ubytki neuronalne	Atrophy Zanik	Lacunar state Stan zatokowaty	Spongy state Stan gąbczasty	Diffuse gliosis Glejoza rozlana	Focal gliosis Glejoza ogniskowa	Myelin lesion Uszkodzenie mieliny
3002	AML	19	14	—	+	+	—	—	—	+	—	—
3048	AML	42	10	+	+	—	—	—	—	+	—	—
3066	AML	40	24	+	+	+	—	+	—	+	—	—
3082	AML	20	8	+	+	—	—	—	—	—	—	—
3088	AML	20	14	—	+*	+	+	+	—	+	+	+
3079	ChEML	26	48	+	+	+	—	—	—	+	—	—
3049	Ly.sa.	23	14	—	+*	+	—	+	+	+	+	+

* cranial nerves only
 tylko nerwy czaszkowe

To compare the material collected recently with that accumulated 16 years ago we chose two of the most numerous groups of patients with AML and ChEML. The result is presented in Table 7. In spite of the doubtless cytotoxicity of the drugs used in the modern hematologic therapy described above and in the literature (Weiss et al 1974; White 1976) confrontation of data from recently collected cases with others,

Table 7. Comparison of collection from patients mostly not treated with antimitotic drugs (1956–1959) with collection from patients treated with antimitotic drugs (1976–1977) Case of AML and ChEML only

Tabela 7. Porównanie przypadków zebranych w latach 1956–1959, przeważnie nieleczonych z przypadkami zebranymi w latach 1976–1977 leczonymi systematycznie (białaczki szpikowej ostrej i białaczki szpikowej przewlekłej zaostrzonej)

Period Materiał zebrany w latach	1956–1959		1976–1977	
	AML	ChEML	AML	ChEML
Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne				
Number of cases Liczba przypadków	29	3	24	13
Survival time (months, median) Czas przeżycia (miesiące, mediana)	1.5	20	3	36
Number of cases treated with Liczba przypadków leczonych				
antimitotics antymityotykami	6	3	21	11
corticosteroids kortykosterydami	21	2	19	10
Hemorrhagic changes Zmiany krwotoczne	19	3	19	11
Diffuse infiltrations of brain Rozległe nacieki w mózgu	3	1	1	1
Diffuse infiltrations of meninges Rozległe nacieki w oponach	4	1	1	0
Circumscribed brain infiltrations Ograniczone nacieki w mózgu	16	1	10	3
Circumscribed meningeal infiltrations Ograniczone nacieki w oponach	12	2	6	3
Neuronal loss Ubytki neuronalne	20	0	11	9
Other parenchymatous changes: Inne zmiany parenchymalne:				
atrophy zanik	0	0	6	0
lacunar state stan zatokowaty	0	0	7	3
spongy state stan gąbczasty	0	0	0	1
Gliosis Glejoza	27	2	17	12

collected in 1956—1959 shows definitely better results in the treated cases. First of all the median of the surviving period was twice longer in the fully treated group of AML cases, and more than 40 per cent longer in ChEML cases. Moreover, in the fully treated group the number of cases showing leukemic infiltrations decreased. The frequency of hemorrhagic changes did not change in either group. However, parenchymal changes, both nervous tissue destruction, and glial reaction were more intense in the group of patients treated for a longer time. Myelin damage does not seem to be not the result of drug toxicity (Aström et al. 1958; Sibley, Weisberger 1961; Dąbska et al. 1972). The above mentioned results coincide generally with those published previously and derived from different material (Meadows, Evans 1976).

The value of our results is based on the great similarity of the material and methods. Similar were the age of patients, number of cases and conditions of the same hospital. Moreover, post mortem examinations and the whole procedure with tissue specimens were performed in the same laboratories and even evaluated by the same persons.

ANALIZA ZMIAN NEUROPATOLOGICZNYCH W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM U 51 OSÓB LECZONYCH I ZMARŁYCH Z POWODU SCHORZEŃ ROZROSTOWYCH UKŁADU KRWIOTWÓRCZEGO

Streszczenie

Przebadano w mikroskopie świetlnym mózgi wszystkich zmarłych w Instytucie Hematologii w Warszawie w ciągu 12 miesięcy w latach 1976, 1977 z powodu rozrostowych schorzeń układu krwiotwórczego. Wszyscy chorzy, z wyjątkiem jednej osoby, byli poddani chemioterapii bezpośrednio po ustaleniu rozpoznania klinicznego. Przeanalizowano zależność zmian w mózgu od obrazu krwi obwodowej, powiązanie zmian krwotocznych i nacieków białaczkowych oraz zależność zmian w mózgu od wieku chorego, czasu przeżycia i sposobu leczenia. Porównanie wyników w grupie systematycznie leczonych przypadków ostrej białaczki szpikowej i białaczki szpikowej przewlekłej zaostrzonej z analogicznymi przypadkami przeważnie nie leczonymi, opracowanymi przed 16 laty, wypadło korzystniej dla grupy osób leczonych w sposób obecnie przyjęty. Mediana okresu przeżycia u chorych na ostrą białaczkę szpikową przedłużyła się dwukrotnie, a u chorych na białaczkę szpikową przewlekłą zaostrzoną — o ponad 40%.

W mózgach chorych leczonych systematycznie rzadziej obserwowano nacieki białaczkowe przy braku wyraźnej różnicy w częstości występowania zmian krwotocznych, zwrócono natomiast uwagę na częstsze występowanie obrzęku w tej grupie. Zmiany obrzękowe stwierdzono w 43 przypadkach na 51 przebadanych. Zmiany krwotoczne stwierdzono w 20 przypadkach, podczas gdy w opracowanym uprzednio materiale chorych nie leczonych występowały one w 24 przypadkach na 45 przebadanych. Uszkodzenia parenchymalne polegające na różnego typu zmianach zanikowych (głównie przerzedzenie neuronów, również stan zatokowaty) i glejzie częściej obserwowano u osób poddanych przez dłuższy czas chemioterapii.

Ustalono, że finalny obraz zmian w mózgu w przebiegu schorzeń rozrostowych układu krwiotwórczego zależy od złośliwości procesu chorobowego, czasu przeżycia i wieku chorych, jak również od neurotoksyczności podawanych leków.

АНАЛИЗ НЕВРОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ У 51 ЛИЦА КОТОРЫЕ БЫЛИ ЛЕЧЕНЫ И УМЕРЛИ ПО ПОВОДУ ГИПЕРПЛАСТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КРОВЕТВОРНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Авторы исследовали в световом микроскопе головные мозги всех умерших в Институте Гематологии в Варшаве в течение 12 месяцев (в 1976—1977 годах) по поводу гиперпластических заболеваний кроветворной системы. Все больные, за исключением одного лица были подвергнуты химиотерапии непосредственно после установления клинического диагноза. Проанализировано зависимость изменений в мозгу от картины периферической крови, связь геморрагических изменений и лейкомических инфильтратов, а также зависимость в мозгу от возраста больного, выживаемости и способа лечения. Сопоставление результатов в группе леченных систематически случаев миелобластической лейкемии и обостренной хронической миелогенной лейкемии с аналогичными случаями по большей части не лечеными разработанными, 16 лет тому назад, оказалось более положительным для группы лиц леченных способом осуществляемым в настоящее время. Медиана выживаемости у больных миелобластической лейкемией продлилась вдвое, а у больных обостренной хронической миелогенной лейкемией — на свыше 40%.

В головных мозгах леченных систематически авторы реже наблюдали лейкомические инфильтраты при отсутствии четкой разницы в частоте выступления геморрагических изменений, зато они обратили внимание на более частое выступление отека в этой группе. Отечные изменения констатировано в 43 случаях из 51 исследованного. Геморрагические изменения констатировано в 20 случаях, в то время как в разработанном раньше материале больных не леченных они выступали в 24 случаях из 45 исследованных. Паренхимальные повреждения заключающиеся в атрофических изменениях разного типа (главным образом прорежение нейронов, также лакунарное состояние) и в глиозе авторы более часто наблюдали у лиц подвергнутых длительному времени химиотерапии.

Установлено что финальная картина изменений в головном мозгу в течение гиперпластических заболеваний кроветворной системы зависит от злокачественности болезненного процесса, выживаемости и возраста больных, а также от нейротоксичности вводимых лекарственных препаратов.

REFERENCES

1. Aström K. E., Mancall E. L., Richardson E. P.: Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain*, 1958, 81, 93—111.
2. Dąmbska M., Korthals J., Mossakowski M. J.: Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 546—556.
3. Meadows A. T., Evans A. E.: Effects of chemotherapy on the central nervous system. *Cancer*, 1976, 37, 1079—1085.
4. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Iwanowski L.: Leukemic changes in the brain. *Rozpr. Wydz. Nauk Med., PAN* 1962, 7, 157—184.
5. Sibley W. A., Weisberger A. S.: Demyelinating disease of the brain in chronic lymphatic leukemia. *Arch. Neurol.*, 1961, 5, 300—407.
6. Weiss H. D., Walker M. D., Wiernik P. H.: Neurotoxicity of commonly used antineoplastic agents. *New Engl. Med.*, 1974, 291, 75—81 and 127—133.
7. White D. C.: The histopathologic basis for functional decrements in late radiation injury in diverse organs. *Cancer*, 1976, 37, 1126—1143.

Authors' address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa

BARBARA GAJKOWSKA, TERESA E. BUGERA, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

ULTRASTRUKTURA MIELINY OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO SZCZURA PO ZATRUCIU OCTANEM KOBALTAWYM

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

Doświadczalne badania neurotoksycznego działania związków kobaltu wykazały występowanie różnych zespołów neurologicznych oraz zróżnicowanych zmian histopatologicznych, zależnych od rodzaju związku chemicznego, drogi jego podania i dawki. Nałożenie tlenku kobaltowego na określony obszar kory mózgu prowadzi do powstania ogniska padaczkorodnego (Reichenthal, Hocherman 1983; Trottier i wsp. 1983). W obrazie mikroskopowym stwierdzano ogniskowy obrzęk, opustoszenia komórkowe oraz martwicę skrzepową z mobilizacją makrofagów, a także glejozę (Willmore, Rubin 1982). Obserwowano również uszkodzenie osłonek mielinowych (Verhamme 1973).

Spośród badanych soli kobaltowych najsilniejsze działanie toksyczne na podwzgórze wykazywał octan, wywołując między innymi zmiany w postaci wakuolizacji cytoplazmy i jądra oraz nagromadzenie neurosekretu w niektórych neuronach (Niebrój 1959). W innym modelu doświadczalne zatrucie kobaltem prowadziło do odkładania ziarn lipofuscyny w perykarionach neuronów, najliczniej w mózdzku (Hasan, Ali 1981).

Po zatruciu octanem kobaltawym szczurów, u których wywoływano równocześnie częściowe niedokrwienie mózgu, uzyskiwano zespół pozapiramidowy (Bugera i wsp. 1985). W tym modelu doświadczalnym badania mikroskopowo-światłne wykazały niewielkie zmiany w formacjach szarych OUN oraz nieprawidłowości we wszystkich strukturach istoty białej mózgu i mózdzku o charakterze zmian drobnojamkowych zgąbczenia o różnym nasileniu we wszystkich szlakach pnia i rdzenia kręgowego. Charakterystyczną zmianę w zatruciu octanem kobaltawym stanowiła, poza rozluźnieniem utkania formacji białych, obecność we wnętrzu włókien mielinowych struktur owalnych, związanych z osłonką mielinową lub luźno leżących w świetle poszerzonego włókna.

Różnice w nasileniu zmian morfologicznych w obrębie poszczególnych struktur istoty białej OUN, a szczególnie trudność dokładnego określenia charakteru zmian we włóknach mielinowych pnia mózgu w mikroskopie świetlnym, skłoniły nas do badań ultrastrukturalnych białych formacji półkul oraz pnia mózgu w ostrym zatruciu octanem kobaltowym przy częściowym niedotlenieniu mózgu.

MATERIAŁ I METODY

Do badań wykorzystano doświadczalny model zatrucia szczura octanem kobaltowym w warunkach częściowego niedotlenienia ischemicznego mózgu, które prowadzi do zespołu pozapiramidowego (Bugera i wsp. 1985).

Badania przeprowadzono na 25 szczurach szczepu Wistar, samcach, w wieku 6 tygodni, o masie ciała około 150 g. W uśpieniu gammabutylolaktonem w dawce 500 mg/kg masy ciała, podanym dootrzewnowo, podwiązano obie tętnice szyjne wspólne. Natychmiast po podwiązaniu do lewej tętnicy szyjnej wspólnej wstrzykiwano octan kobaltowy w dawce 1 mg Co^{++} /mózg w objętości 50 μl roztworu soli fizjologicznej.

Materiał do badań w mikroskopie elektronowym pobierano po 24 i 72 godzinach od początku doświadczenia, z okolic prążkowania oraz jąder szwu mostu. Wycinki z tych okolic pobierano bezpośrednio po dekapitacji, utrwalano w 2% roztworze aldehydu glutarowego w buforze kacydylanowym o pH 7,3, a następnie w 2% OsO_4 w tym samym buforze; odwadniano rutynowo i zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki kontrastowano roztworem octanu uranylu i cytrynianu ołowianego. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

Nie wykonywano badań kontrolnych szczurów po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych wspólnych, ponieważ częściowe niedotlenienie ischemiczne mózgu zostało wielostronnie opracowane w naszej pracowni, przy czym w obrębie struktur istoty białej stanowiącej przedmiot naszych badań nie stwierdzono zmian morfologicznych charakterystycznych dla naszego modelu (Mossakowski 1978).

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Spośród 25 zwierząt z obustronnym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych oraz poddawanych zatruciu, 12 szczurów padło bezpośrednio po iniekcji octanu kobaltowego wśród objawów obrzęku płuc. Trzy dalsze szczury ze zwalniającym się stopniowo oddechem nie wybudziły się z uśpienia i zginęły przed upływem dwóch godzin po zabiegu operacyjnym. U 10 zwierząt po 24 godzinach pojawiło się stopniowo narastające



Ryc. 1. Szczur doświadczalny, czas przeżycia 72 godz. Most. Włókno o nieregularnym kształcie i pogrubiałej osłonce mielinowej z dużą ilością luźno ułożonych blaszek. Widoczne również włókna mielinowe o mało nasilonych zmianach. Pow. 12 150 ×

Fig. 1. Experimental rat, survival time 72 hrs, pons. Irregular shape of the fiber with thickened myelin sheath and disjunct lamellae and normal ultrastructure of the myelinated fibres is seen. × 12 150



Ryc. 2. Szczur doświadczalny, czas przeżycia 72 godz., most. We wnętrzu podłużnie przekrojonego włókna o pogrubiłej osłonce mielinowej widoczne duże owalne struktury o koncentrycznym układzie blaszek, pozostające w łączności z osłonką. Od zewnątrz do osłonki mielinowej przylegają poprzeczne przekroje włókien mielinowych. Pow. 12 150 \times

Fig. 2. Experimental rat, survival time 72 hrs, pons. In longitudinal section of fiber are visible big oval structures with concentrically rolled lamellae inside the thickened myelin sheath. Transverse section of myelin fibres lying closely to the myelin sheath. \times 12 150



Ryc. 3. Szczur doświadczalny 72 godz. po zatruciu. Most. Nieprawidłowy układ blaszek osłonki mielinowej i owalne struktury zarówno wewnątrz jak i na zewnątrz włókna (strzałki). Aksoplazma włókien bez uchwytnych odchyień ultrastrukturalnych. Pow. 12 150 \times

Fig. 3. Experimental rat, 72 hrs after intoxication. Pons. Irregular shape of the myelin and myelin-like oval structures located internally and externally (arrows). Axoplasm looks ultrastructurally normal. \times 12 150

obniżenie aktywności ruchowej, wzmożenie napięcia mięśni kończyn i grzbietu oraz okresowe drżenie żuchwy i głowy. Objawy neurologiczne nasilały się wraz z niechęcią do przyjmowania pokarmów.

Badania mikroskopowo-elektronowe

Badania mikroskopowo-elektronowe włókien mielinowych prądkowia oraz okolic jąder szwu mostu, prowadzone po 24 godzinach od podwiązania tętnic i podania kobaltu, nie wykazywały zmian w ich budowie ultrastrukturalnej. Włókna miały prawidłowy rysunek i grubość blaszek mielinowych oraz niezmienioną aksoplazmę. W niektórych neuronach spotykano obrzmiałe mitochondria, sporadycznie widywano też pojedyncze neurony „ciemne”.

Znaczne nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej włókien mielinowych obserwowano po upływie 72 godzin. Były one szczególnie nasilone w obszarze jąder szwu mostu, rzadziej natomiast widywano je w prądkowiu. W tej grupie doświadczalnej w wielu neuronach, aksonach oraz elementach glejowych obserwowano obrzmiałe mitochondria. Liczne włókna mielinowe charakteryzowały się rozluźnieniem blaszek mielinowych. Natomiast w obrębie samych aksonów zwykle nie notowano nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Neurofilamenty, neurotubule oraz nieliczne kanały gładkiej siateczki endoplazmatycznej wykazywały prawidłową budowę, tylko pojedyncze mitochondria były nieznacznie obrzmiałe. Niektóre włókna mielinowe przyjmowały na przekroju poprzecznym nieregularne kształty. Miały one nieregularnie pogrubiałą osłonkę mielinową z dużą ilością blaszek rozluźnionych na całym lub części przekroju włókna (ryc. 1). Widywano też owalne, różnej wielkości struktury mielinowe złożone z poskręcanych współśrodkowo blaszek, przeważnie ściśle przylegających do siebie. Pozostawały one w ciągłości z mniej lub więcej zmienioną osłonką mielinową. Mielinowe owalne struktury znajdowały się bądź na zewnątrz osłonki bądź też wpuklały się do wnętrza włókna (ryc. 2, 3). W wielu włóknach w obrębie krezki wewnętrznej wypustek oligodendrocytów obserwowano obrzęk z tworzeniem się różnej wielkości elektronowo przeziernych wakuoli, przemieszczających akson ku obwodowi (ryc. 4, 5).

OMÓWIENIE

Zatrucie octanem kobaltowym szczurów, u których wywoływano równocześnie częściowe niedokrwienie mózgu, spowodowało wystąpienie zmian w budowie ultrastrukturalnej osłonek włókien mielinowych. Zmiany te obserwowano przede wszystkim w obszarze jąder szwu mostu. Większość włókien mielinowych posiadała pogrubiałe osłonki, czego przyczyną było rozwarstwienie ich blaszek. Liczne włókna wykazywały stopniową utratę regularności układu blaszek mielinowych. W wielu włók-

nach blaszki mielinowe tworzyły owalne, koncentrycznie zwinięte struktury wewnątrz i na zewnątrz włókna.

Opisane przez nas uszkodzenie mieliny może być tłumaczone szczególnym powinowactwem jonów kobaltowych do składników chemicznych osłonki mielinowej. Kobalt należy do pierwiastków łatwo wiążących się z wieloma składnikami układu nerwowego, służąc w badaniach ultrastrukturalnych jako znacznik elementów błonowych, zwłaszcza kanałów aktywnego transportu komórkowego (Baker 1972; Bassemir, Strausfeld 1983). Szczególne nasilenie zmian w pniu mózgu, w jego strukturach białych, można tłumaczyć neurotoksycznym działaniem jonów kobaltowych (Waalkes i wsp. 1982). Szybkość i rozległość uszkodzenia formacji białych mostu po podaniu jonów kobaltowych do tętnicy szyjnej wspólnej można tłumaczyć między innymi hamującym działaniem Co^{++} na proces szybkiego transportu aksonalnego (Clayton, Emson 1976; Lavoie, Bennett 1984). Wędrowka kobaltu do pnia mózgu zachodzi nie tylko drogą płynu wewnątrzkomórkowego, lecz również przez przestrzenie międzykomórkowe, wzdłuż włókien nerwowych tworząc kompleksy wokół układów błonowych (Iwasa, Inbushi 1983). Te ostatnie badania wykazały podobieństwo działania kobaltu i manganu. Istnieje również duże podobieństwo uzyskanych przez nas zmian ultrastrukturalnych do opisanych w zatruciu szczura chlorkiem manganawym (Mossakowski i wsp. 1983). W tej ostatniej pracy stwierdzono również w pniu mózgu blaszkowate mielinopodobne struktury w poszerzonej przestrzeni aksonalnej oraz miejscowe rozwarstwienie blaszek osłonki mielinowej. Opisane przez nas zmiany w osłonkach mielinowych powstałe w wyniku zatrucia octanem kobaltowym szczurów z niedokrwieniem mózgu zostały spowodowane zapewne toksycznym działaniem kobaltu.

W licznych pracach dotyczących wpływu całkowitego lub częściowego niedokrwienia mózgu nie opisywano podobnych zmian ultrastrukturalnych. Natomiast zwracano między innymi uwagę na obrzmienie gleju, komórek śródbłonka naczyń krwionośnych oraz na obecność tzw. „ciemnych neuronów” (Kalimo i wsp. 1979; Pluta, Gajkowska 1984; Mossakowski, Gajkowska 1984). Opisane przez nas obrzmienie mitochondriów zarówno w komórkach neuronalnych, w aksoplazmie niektórych włókien, jak i elementach glejowych, a zwłaszcza obrzmienie wypustek oligodendrogleju przyczyniające się do deformacji osłonek mielinowych najprawdopodobniej powstają również w wyniku częściowego niedotlenienia ischemicznego. Nie można też wykluczyć wpływu kobaltu na niektóre enzymy odechowe, związane z układem redukcji-oksydacyjnym, w formie hamowania zużycia tlenu i pogłębienia istniejącego niedotlenienia mózgowia (Webb 1964).

Również powstawanie wakuoli w wypustkach oligodendrocytów i spychanie na obwód aksoplazmy oraz widoczne na rycinach 4 i 5 zaczy-



Ryc. 4. Szczur doświadczalny, 72 godz. po zatruciu. Most. Obrzmienie krezki wewnętrznej komórki gleju skąpowypustkowego z obecnością wakuoli (v) i przemieszczeniem aksonu (Ax) do pozycji obwodowej. We fragmencie cytoplazmy oligodendrocyta (O) obrzmiałe mitochondria (M). Pow. 12 150 \times

Fig. 4. Experimental rat, 72 hrs after intoxication. Pons. Swelling of the oligodendrocyte with vacuole (v) and displacement of the axon (Ax) to peripheral position. In fragment of the oligodendrocyte cytoplasm (O) swollen mitochondria (M) are visible. \times 12 150



Ryc. 5. Szczur doświadczalny, 72 godz po zatruciu. Most. W niektórych włóknach mielinowych aksony (Ax) przemieszczone na obwód. Pow. 12 150 X

Fig. 5. Experimental rat, 72 hrs after intoxication. Pons. Displacement of the axons (Ax) to the peripheral position in some myelinated fibres. X 12 150

nające się rozwarstwienie blaszek w miejscach styku: osłonka, aksoplazma, wakuola, mogą stanowić dobry wykładnik efektu złożonego działania niedotlenienia ischemicznego oraz kobaltu. Pełniejsze wyjaśnienie patomechanizmu obserwowanych zmian histopatologicznych i złożonego neurotoksycznego działania jonów kobaltowych wymaga dalszych badań.

УЛЬТРАСТРУКТУРА МИЕЛИНА В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ АЦЕТАТОМ КОБАЛЬТА

Резюме

Авторы исследовали ультраструктуру миелиновых оболочек в стриатуме и в мозговом стволе крыс, которым вводили ацетат кобальта (1 мг Co^{++} /мозг) и с обеих сторон перевязывали общие сонные артерии.

Большинство миелиновых волокон не проявляли видимых изменений. Зато констатировано аномалии в ультраструктурном строении некоторых миелиновых оболочек в области ядер шва моста. Они заключались в утолщении миелиновых оболочек и в их нерегулярной форме. Авторы наблюдали расслоение миелиновых пластинок и образование овальных структур с коаксиальной системой пластинок отходящих от миелиновой оболочки внутрь или на поверхность нервного волокна. Они наблюдали также набухание отростков олигодендроцитов сопутствующих аксону.

Можется, что при отравлении ацетатом кобальта в условиях частичной ишемии центральной нервной системы аномалии в картине миелина головного мозга крысы зависят от отека отростков скупоотростковой глии, вызывающей также смещение аксона на периферию.

ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON MYELIN OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM FOLLOWING COBALTOUS ACETATE INTOXICATION IN THE RAT

Summary

The aim of the work were ultrastructural studies of myelin in rats after administration of cobaltous acetate and additional occlusion of both common carotid arteries.

Majority of the myelin fibres in the striatum seemed to be intact. Myelinated fibres in the region of the raphae nuclei in the pons displayed distinct changes. Numerous fibres demonstrated disturbances in myelin arrangement under the form of disjunction of myelin lamellae or formation of sticking lamellae. Axoplasm was unchanged. Within the axoplasm neurofilaments, neurotubules and a few sparse profiles of agranular endoplasmic reticulum and mitochondria were visible. Some myelinated fibres demonstrated very irregular shape with dense consistence, immense amount of lamellae, while others exhibited numerous concentrically rolled external or/and internal densely packed lamellae of various sizes. They were accompanied by intact axons. Most interesting phenomenon was swelling of oligodendrocyte processes with accompanied displacement of the axon to a peripheral position.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker P. F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1972, 24, 177—223.
2. Bassemir U. K., Strausfeld N. J.: Cytology of cobalt-filled neurons in flies: cobalt deposits at presynaptic and postsynaptic sites, mitochondria and the cytoskeleton. *J. Neuropathology*, 1983, 12, 949—970.
3. Bugera T. E., Kosicka B., Kittel M., Śmiałek M.: Wpływ ostrego zatrucia octanem kobaltowym na występowanie zespołu pozapiramidowego oraz synteze GABA w mózgowiu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1985, (złoż. do druku).

4. Clayton P. R., Emson P. C.: Cobalt toxicity convulsion. *Experientia*, 1976, 32, 1002—1305.
5. Hasan M., Ali S. F.: Effects of thallium, nickel and cobalt administration on the lipid peroxydation in different regions of the rat brain. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 1981, 57, 8—13.
6. Iwasa K., Inbushi T.: Co^{+2} and Mn^{+2} uptake by crab nerve fibers in resting state and potassium depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 16, 560—566.
7. Kalimo H., Paljarvi L., Vapalanti M.: The early ultrastructural alterations in the rabbit cerebral and cerebellar cortex after compression ischemia. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1979, 5, 211—223.
8. Lavoie P. A., Bennett G.: Accumulation of 3H fucose-labelled glycoproteins in the Golgi apparatus of dorsal root ganglion neurons during inhibition of fast axonal transport caused by exposure of the ganglion to Co^{+2} -containing or Ca^{+2} -free medium. *Neuroscience*, 1983, 8, 351—362.
9. Mossakowski M. J.: Cerebral circulation disturbances in various hypoxic conditions. W: *Advances in Neurology*. Red: J. Cervos-Navarro, E. Betz, G. Ebhardt, R. Herszt, R. Wüllenweber. Raven Press, New York, 1978, 20, 161—171.
10. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 455—468.
11. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347—377.
12. Niebrój T.: Wpływ soli kobaltu na histopatologię jąder neurosekrecyjnych podwzgórza świnki morskiej. *Endokrynol. Pol.*, 1959, 10, 17—21.
13. Pluta R., Gajkowska B.: Ultrastructural changes in the sensorimotor cortex of the rabbit after complete 30-min. brain ischemia. *J. Neurosci. Res.*, 1984, 11, 35—47.
14. Reichenthal E., Hocherman S.: Surgical control of semichronic epileptic foci in the cat's sensorimotor cortex. *Surg. Neurol.*, 1983, 20, 422—426.
15. Trottier S., Claustre Y., Cabache J., Chauvel P., Dedek J., Nassif S., Scatton B.: Alterations of noradrenaline and serotonin uptake and metabolism in chronic cobalt-induced epilepsy in the rat. *Brain Res.*, 1983, 272, 255—262.
16. Varhamme E. N.: Contribution to the evaluation of the toxicity of cobalt. *Cobalt*, 1973, 3, 29—32.
17. Waalkes M. P., Ross S. M., Craig C. R., Thomas J. A.: Induction of metallothionein in the rat brain by copper implantation but not by cobalt implantation. *Toxicol. Lett.*, 1982, 12, 137—142.
18. Webb M.: The biological action of cobalt and cobaltmetals. IV. Inhibition of alpha-oxoglutarate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1964, 89, 431—446.
19. Willmore L. J., Rubin J. J.: Formation of malonaldehyde and focal brain edema induced by subpial injection of FeCl_2 and CoCl_2 into rat isocortex. *Brain Res.*, 1982, 246, 113—119.

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

LECH IWANOWSKI

ULTRASTRUCTURE OF BRAIN CAPILLARIES IN YOUNG RABBITS
TREATED
WITH CYCLOPHOSPHAMIDE

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

Chronic swelling of the perivascular glial sheaths and even severe damage of several glial cells were observed after cyclophosphamide (CP) treatment in the central nervous system of young animals (Maślińska, Dąbska 1983). Myelination rate was in those conditions normal, but some irreversible lesions of neurons and their processes were seen (Dąbska, Maślińska 1984) up to 3 months after intoxication. Verification of eventual changes in vessel walls became very important in this situation.

MATERIAL AND METHODS

Investigations were performed on 17 rabbits of the Institute's own breeding, treated orally with CP in food in doses of 50 mg/kg body weight daily from the 6th to the 16th day after birth. The animals were

Table 1. Number of examined animals of different ages
Tabela 1. Liczba zwierząt badanych w różnym wieku

Age Wiek	Control Kontrola	CP-treated Doświadczalne
16 days dni	7	6
32 days dni	3	5
48 days dni	2	4
3 months miesiące	1	1
5 months miesiący	1	1

examined on the 16th, 32nd and 48th day of their life as well after 3 and 5 months. Control animals of the same age were examined in the same schedule (Tab. 1). Under intraperitoneal Nembutal anesthesia rabbits were perfused with a mixture of 2% paraformaldehyde containing 1% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.35. Tissue blocks were taken from cerebral cortex, *fascia dentata*, *corpus callosum* and cerebellar cortex, postfixed in osmium tetroxide, dehydrated in ethanol, embedded in Epon 812 and sectioned on an LKB ultramicrotome. Ultrathin sections were treated with lead citrate and uranyl acetate. Specimens containing cerebral vessels were chosen from semithin sections.

RESULTS

According to my observations done previously on the perinatal development of brain capillaries in experimental animals, including rabbits, the main feature of immaturity are short distances between the perikarya of adjacent endothelial cells (Fig. 1). This results in a characteristic stellate form of the vessel lumina on transversal sections. The



Fig. 1. Short distance between the perikarya of adjacent endothelial cells. Longitudinal section of 16-day-old CP-treated rabbit. Capillary brain vessels of cerebral cortex. $\times 16\ 000$

Ryc. 1. Krótki odstęp pomiędzy perykarionami przylegających komórek śródbłonna. Przekrój podłużny włóscinek kory mózgu 16-dniowego królika traktowanego CP. Pow. 16 000 \times

perikarya protrude into the lumen. Their nuclei show indentations. Other features of immaturity of capillary endothelial cells are numerous microvilli, abundant free ribosomes, marked enlargement of Golgi apparatus. In addition, the basement membrane is narrow and the glial sheath not completely developed. Pinocytotic vesicles are scarce. To avoid the differences in pictures of capillary development, conditioned by the different development rates of particular brain structures, only cerebral cortex capillaries were compared in this paper.

In 16-day-old control animals the few perikarya protruding into the lumen resulted in absence of the stellate appearance of the capillary lumina. The luminal face of the endothelial lining was deprived of villi. In 16-day-old treated animals the stellate appearance of the lumina was still common and microvilli were observed (Fig. 2). In addition, a considerable swelling of astrocytic perivascular extensions was observed in the treated animals.

In 32-day-old control rabbits perikarya did not protrude into the lumen and the nuclei had no indentations. In treated animals the stellate appearance of the capillary lumen still occurred. Sucker feet swelling

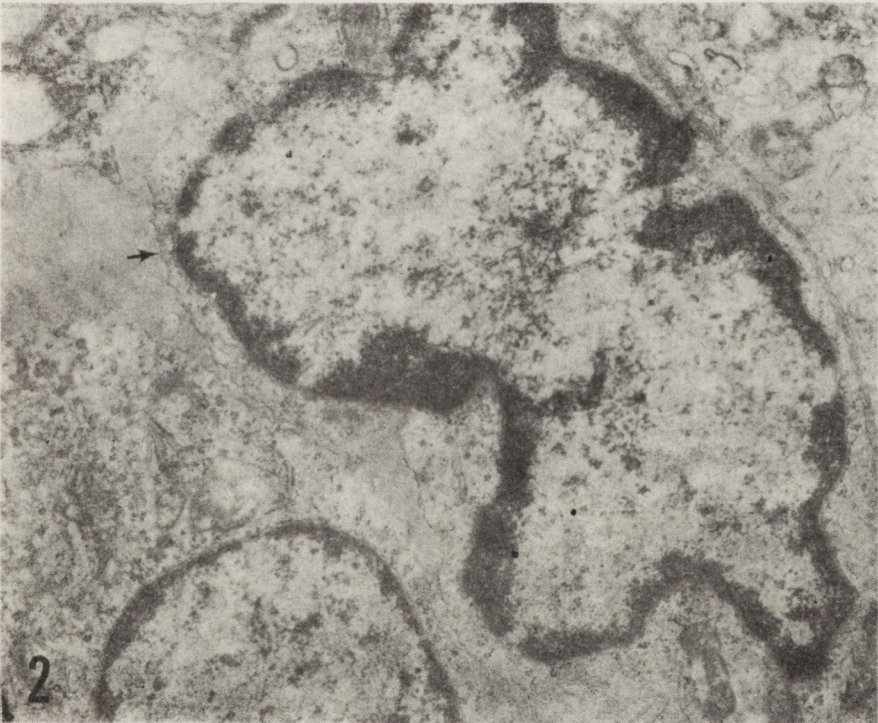


Fig. 2. Stellate form of vessel lumen. Indentated nucleus of endothelial cell (arrow). CP-treated 16-day-old rabbit. $\times 14\ 000$

Ryc. 2. Gwiazdzisty kształt przekroju światła naczynia i ząbkowane jądro komórki śródbłónka u 16-dniowego doświadczalnego królika (strzałka). Pow. $14\ 000 \times$



Fig. 3. Vessel with irregular shape of the lumen with numerous cytoplasmic projections (microvilli) and abundant free ribosomes. A narrow basement membrane. Probably proliferating capillary vessel. CP-treated 32-day-old rabbit. $\times 18\ 000$

Ryc. 3. Naczynia ze światłem o nieregularnym kształcie z licznymi mikrokosmkami, licznymi wolnymi rybosomami i wąską błoną podstawną — przypuszczalnie proliferująca włosniczka. Królik doświadczalny 32-dniowy. Pow. $18\ 000 \times$

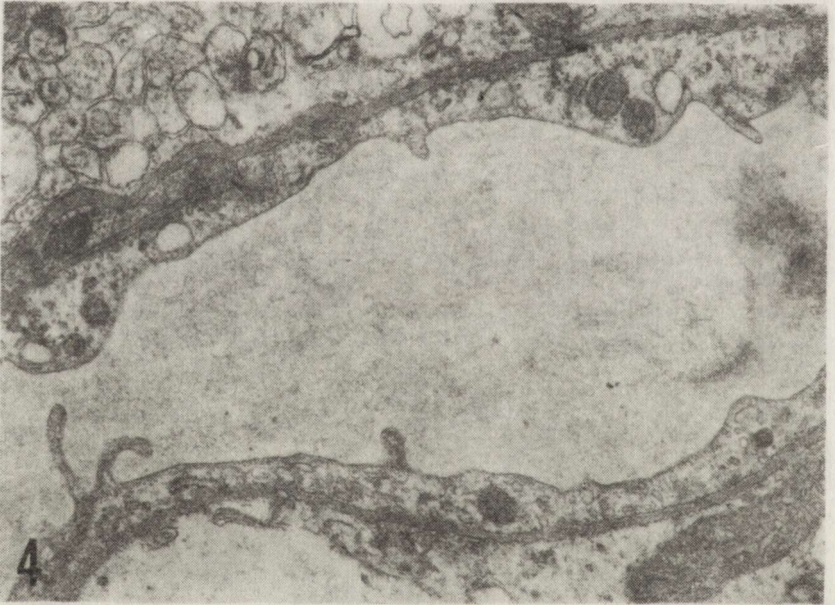


Fig. 4. Endothelial cell showing vacuoles and dense bodies. CP-treated 48-day-old rabbit. $\times 16\ 000$

Ryc. 4. Komórka śródbłonna z wodniczками i ciałami gęstymi. Królik doświadczalny 48-dniowy. Pow. $16\ 000 \times$

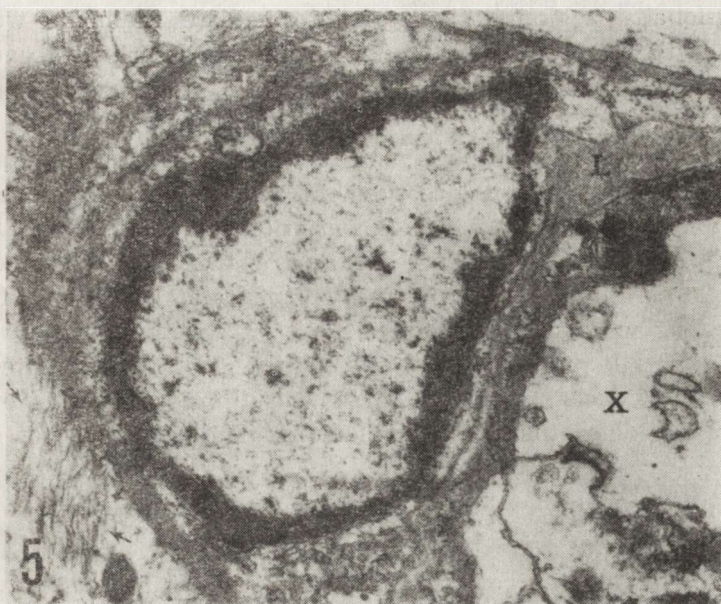


Fig. 5. Agglomeration of intermediate filaments (arrows). Swelling of perivascular astrocytic sheath (X). L — capillary lumen. CP-treated rabbit 42-day-old. $\times 14\ 000$

Ryc. 5. Pęczek filamentów pośrednich w okołonaczyniowej osłonce glejowej (strzałki). Obrzmienie okołonaczyniowej osłonce glejowej (X). L — światło włosniczki. Królik doświadczalny 32-dniowy. Pow. $14\ 000 \times$

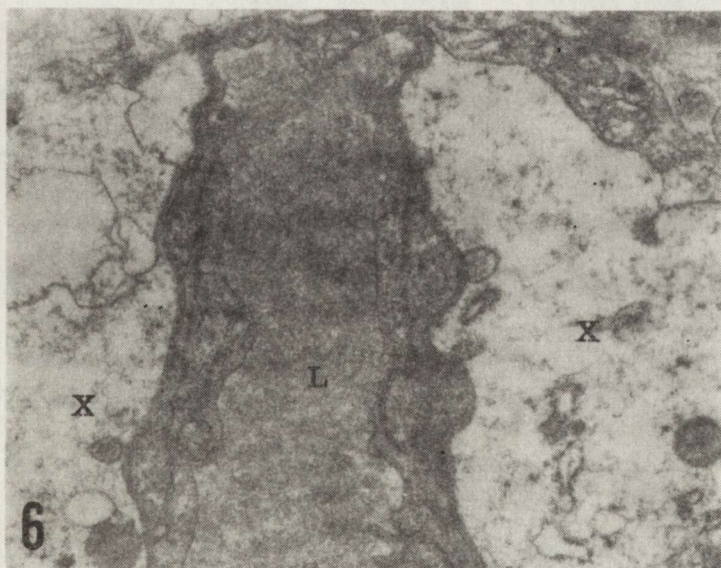


Fig. 6. Perivascular astrocytic sheath swelling (X) (persisting during 3 months of life) in experimental rabbit. L-capillary lumen. $\times 10\ 000$

Ryc. 6. Obrzmienie okołonaczyniowej osłonce astrocytarnej (X) (utrzymujące się przez 3 miesiące życia) u królika doświadczalnego. L — światło włosniczki. Pow. $10\ 000 \times$

and occasionally agglomerations of intermediate filaments were seen. In some of the treated rabbits, apart from the described above mature vessels, also capillaries showing a marked immaturity were noted (Fig. 3).

In 48-day-old control rabbits and in treated animals a regular outline of the capillary lumen was observed. In endothelial cells of the treated animals, vacuoles and dense bodies were noted (Fig. 4). Immature capillaries like in 32-day-old rabbits occurred as well. In the experimental group agglomerations of intermediate filaments and swelling of astrocytic extensions were commonly seen (Fig. 5). Swelling was observed in treated animals kept alive for three months (Fig. 6). In treated rabbits the swelling of sucker feet next to some capillaries persisted even after 5 months; agglomerations of intermediate filaments were not observed.

DISCUSSION

Retarded maturation of cerebral capillaries of rabbits treated with CP was observed in 16-day-old and 34-day-old animals. The treated 48-day-old rabbits and the untreated control animals did not show any differences in capillary structure. Another effect of CP administration was considerable swelling of astrocytic perivascular extensions, observed in all age groups of animals. This may correspond to the cytotoxic edema observed by Klatzo (1967) in some toxic encephalopathies. In 32-day-old experimental animals vacuoles and dense bodies occurred in the endothelial cells. In control animals these findings were exceptionally noted. Iwanowski (1981) observed similar alterations in cerebral vessels of senile animals and interpreted them as a feature of ageing. Markedly immature capillaries found in the brains of 32-day-old and older experimental animals seem to represent reactive capillary proliferation.

WPLYW CYKLOFOSFAMIDU NA ULTRASTRUKTURĘ KAPILARÓW MÓZGU MŁODEGO KRÓLIKA

Streszczenie

Młodym królikom podawano w pokarmie cyklofosfamid (Endoksan) w dawce 50 mg/kg masy ciała przez 10 dni — od 6 do 15 dnia życia. Materiał do badań w mikroskopie elektronowym pobierano po perfuzji od zwierząt doświadczalnych i kontrolnych w 16, 32 i 48 dniu życia oraz po 3 i 5 miesiącach. Badano drobne naczynia kory mózgu, blaszki zębatej, spoidła wielkiego i kory mózdzku.

U królików doświadczalnych zaobserwowano: 1) cechy przejściowego opóźnienia dojrzewania naczyń w okresie do 48 dnia życia; 2) obrzmienie wypustek astrocytarnych tworzących okołonacyniową osłonkę glejową już w 16 dniu życia, utrzymujące się również u zwierząt 3-miesięcznych, a sporadycznie i u 5-miesięcznych; 3) występowanie pęczków pośrednich filamentów w wypustkach okołonacyniowej

osłonki astrocytarnej w 32 i 48 dniu życia; 4) występowanie odczynowego rozplemu włóścińcek w 42 dniu życia i później; 5) zmiany w komórkach śródbłonek pod postacią wodniczek i ciał gęstych w 48 dniu życia.

Powyższe obserwacje wskazują, że w warunkach przeprowadzonego doświadczenia cyklofosfamid powoduje przejściowe opóźnienie dojrzewania ściany drobnych naczyń mózgu, uszkadza komórki śródbłonka i wywołuje obrzmienie wypustek astrocytarnych osłonki okołonaczyniowej.

ВЛИЯНИЕ ЦИКЛОФОСФАМИДА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КАПИЛЛЯРОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА МОЛОДОГО КРОЛИКА

Резюме

Молодым кроликам автор вводил в пищу циклофосфамид (эндоксан) в дозе 50 мг/кг массы тела через 10 дней от 6-го до 15 дня жизни. Материал для исследований в электронном микроскопе он брал после перфузии от экспериментальных и контрольных животных на 16-ом, 32-ом и 48-ом дне жизни и спустя 3 и 5 месяцев. Были исследованы мелкие сосуды коры головного мозга, зубчатой пластинки большой спайки и коры мозжечка.

У экспериментальных кроликов автор наблюдал: 1) признаки временного замедления созревания сосудов в периоде до 48 дня жизни; 2) набухание астроцитарных отростков образующих околососудистую глиозную оболочку уже на 15-ом дне жизни, удерживающееся также у 3-месячных животных а спорадически и у 5-месячных; 3) выступление межзучочных пучков филаментов в отростках околососудистой астроцитарной оболочки на 32-ом и 48-ом дне жизни; 4) выступление реактивной пролиферации капилляров на 32-ом дне жизни и позже; 5) изменения в клетках эндотелиев в форме вакуолей и густых тел на 48-ом дне жизни.

Вышеупомянутые наблюдения указывают на то, что в условиях произведенного эксперимента циклофосфамид вызывает временное замедление созревания стенки мелких сосудов головного мозга, повреждает клетки эндотелия и вызывает набухание астроцитарных отростков околососудистой оболочки.

REFERENCES

1. Dąbwska M., Maślińska D.: Early and late brain changes after cyclophosphamide administration in young rabbits. Second European Conference for Neuropathology. Abstracts. Warsaw 20—22 Sept. 1984, p. 9.
2. Iwanowski L.: Rola zmian w naczyniach i w splocie naczyniówkowym w procesie starzenia się mózgu. Pol. Tyg. Lek., 1979, 34, 665—668.
3. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. J. Neuropath. exp. Neurol., 1967, 26, 1—13.
4. Maślińska D., Dąbwska M.: Effect of cyclophosphamide on glia in developing brain. The 4th Hungarian-Polish Neuropathological Symposium on Astrocyte. Abstracts. Balatonszemes, 8—10 May, 1983, p. 8.

Author's address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, 3 Pasteura St., 02-093 Warszawa.

JÓZEF SZCZECH, ANTONI GODLEWSKI

EFFECT OF BCNU GIVEN TO PREGNANT FEMALE RATS
ON NEUROGLIA MORPHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY
IN THE PROGENY *

Laboratory of Neuropathology, Department of Neurology School of Medicine,
Poznań

Application of nitrosourea derivatives for treatment of neoplastic processes is linked with derangement of DNA synthesis by the derivatives which are capable of alkylating bases of nucleic acids and guanine in particular (Chang et al. 1980). The disturbance in DNA synthesis is manifested by a cytotoxic effect (Druckrey et al. 1965), immunosuppressive effect (Parmiani et al. 1971), teratogenic effect (Koyama et al. 1972) and carcinogenic effect (Ivankovič 1976; Hallas, Das 1979). Cytophotometric studies on neuroglia of adult animals subjected to BCNU action have demonstrated a decreased DNA level in neuroglia (Szczech, Godlewski 1984) and in neurocyte nuclei of the central nervous system (Godlewski, Szczech 1984). In similar studies on the effect of CNU (Lomustine) — another nitrosourea derivative, a decreased DNA level has been noted in oligodendroglia and astroglia nuclei of adult rats and an augmented DNA level in the respective nuclei of young animals (Szczech 1984 a, b).

Since the distinct effects of such drugs on adult animals, on the one hand, and on developing animals, on the other, are stressed by several authors (Ivankovič 1976; Bosch 1977), in the present study we examined the effect of BCNU (Carmustine, Nitrumon), a nitrosourea derivative used in antineoplastic therapy, on neuroglia in the progeny of rat mothers, receiving the cytostatic in the second half of pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

BCNU was dissolved in saline and given to pregnant rat females on the 12th and 18th day of pregnancy, in an intraperitoneal dose of 7.5 mg each time. The day of pregnancy was determined on the basis of sper-

* Study was supported by Polish Academy of Sciences (Grant No. 10.4.05.3.3.).

matozoa detection in vaginal smears. Twenty animals delivered from the pregnancies were sacrificed on the 14th or 18th day of extrauterine life. The control group consisted of 14- and 28-day-old originating from females given 0.5 ml saline (n.p.) on 12th and 18th day of pregnancy. For histoenzymatic studies the brains were fixed in Baker's calcium formaldehyde at 4°C for 16 h or at room temperature if followed by paraffin embedding.

Histoenzymatic studies were performed on sections cut on a freezing microtome. The activity of the following enzymes was determined: carboxyl esters hydrolase (nonspecific esterase, NsE), E.L. * 3.1.1.1., according to Nachlas and Seligmann (1949), with 30-min incubation at 4°C, acetylcholine hydrolase (acetylcholinesterase, AChE), E.L. 3.1.1.7., according to Gerebtzoff (1953), with 120 min incubation at 37°C, acylcholine acylhydrolase (cholinesterase, ChE), E.L. 3.1.1.8., according to Gerebtzoff (1953), with 180 min incubation at 37°C, phosphohydrolase of orthophosphoric monoesters (alkaline phosphatase, AP), E.L. 3.1.3.1., according to Gomori (1953), with 45 min incubation at 37°C, phosphohydrolase of orthophosphoric monoesters (acid phosphatase, AcP) E.L. 3.1.3.2., according to Gomori (1953) with 50 min incubation at 37°C, adenosine triphosphate phosphohydrolase (adenosine triphosphatase, ATPase), E.L. 3.6.1.3., according to Wachstein and Meisel (1957) with 55 min incubation at 37°C, phosphohydrolase of thiamine pyrophosphate (TPPase), E.L. 3.6.1.6., according to Novikoff and Goldfischer (1961) with 60 min incubation at room temperature. The paraffin embedded brains sections (7 μ m) were stained with H—E, according to Nissl and Klüver—Barrera and subjected to Feulgen reaction for DNA cytophotometry and karyometric measurements. Optimal duration of acid hydrolysis was pre-established experimentally at 3.5 h at 37°C (Krygier-Stojałowska 1982).

The karyometric and cytophotometric studies were performed on oligodendroglia nuclei of corpus callosum and on astroglia of gyrus cinguli. The measurements were performed using a Morphoquant automated microscopic image analyzer (VEB Carl Zeiss, Jena) coupled to a KSR 4100 computer, applying the MOSAIK computer program (Voss et al. 1974), in monochromatic light of 560 nm wavelength.

The following coefficients as well as shape and extinction indices were analyzed in neuroglia cell nuclei:

KONL ** — circumference of cell nucleus cross-section expressed by number of measuring raster points,

KOFL — surface area of cell nucleus cross-section, expressed by number of measuring raster points,

* Number of enzyme list (Florkin, Stotz 1973).

** Abbreviations of the indices originate from the MOSAIK computer program (Voss et al. 1977)

FOFA — shape index of cell nuclei: the ratio of squared circumference to area of cross-section. Value of the index increases with increasing elongation or irregularity of the object,

FLVH — cross-section regularity index of cell nuclei, i.e. ratio of cross-section area to convex area (area of the smallest octagon circumscribed on cross-section of the studied object). Value of the index increases for objects the shape of which approaches a geometric octagon, diminishes for increasingly irregular objects.

EXTS — sum of extinctions in individual measuring raster point in a given object. In Feulgen technique the index reflects the relative DNA content of the cell nucleus.

Results of measurements for individual cell nuclei in neuroglia of experimental and control animals were grouped and compared using the non-parametric Kolmogorov-Smirnov test (Greń 1982) and adapting the significance threshold for differences at $p < 0.05$.

RESULTS

No significant somatic or behavioural changes were observed in the progeny of mothers receiving BCNU during pregnancy, as compared with control animals. In brain sections stained with H—E or according to Nissl no significant morphological alterations were observed either. In sections stained according to Klüver—Barrera, however, the two experimental groups showed less intense staining of myelin sheaths than noted in control groups. The alterations were particularly well visible in the corpus callosum in cingulum (Fig. 1a and 1b) and in cerebellar cortex (Fig. 2a and 2b). In the younger group delayed myelination was more evident.

CHANGES IN HISTOENZYMATIC ACTIVITY OF NEUROGLIA IN PROGENY OF RAT FEMALES RECEIVING BCNU DURING PREGNANCY

Carboxyl ester hydrolase (NsE)

In 14-day-old rats of the control group, NsE activity in neuroglia was low. Intense activity of the enzyme was noted only in cells of myelination gliosis (Fig. 3a). In the experimental group the enzymatic reaction was negative in neuroglia of the corpus callosum. The number of myelination gliosis cells showing positive NsE reaction was decreased (Fig. 3b). In the group of 28-day-old rats, NsE enzymatic activity in neuroglia of the corpus callosum and in the cortex of gyrus cinguli was lower than in the control group of comparable age.

Acetylcholine hydrolase (AChE)

In physiologic conditions, 14-day-old rats exhibited already high AChE activity in the striatum nervous fibers, moderate activity in nervous fibers of septum area, optic tract and fimbria hippocampi and rela-

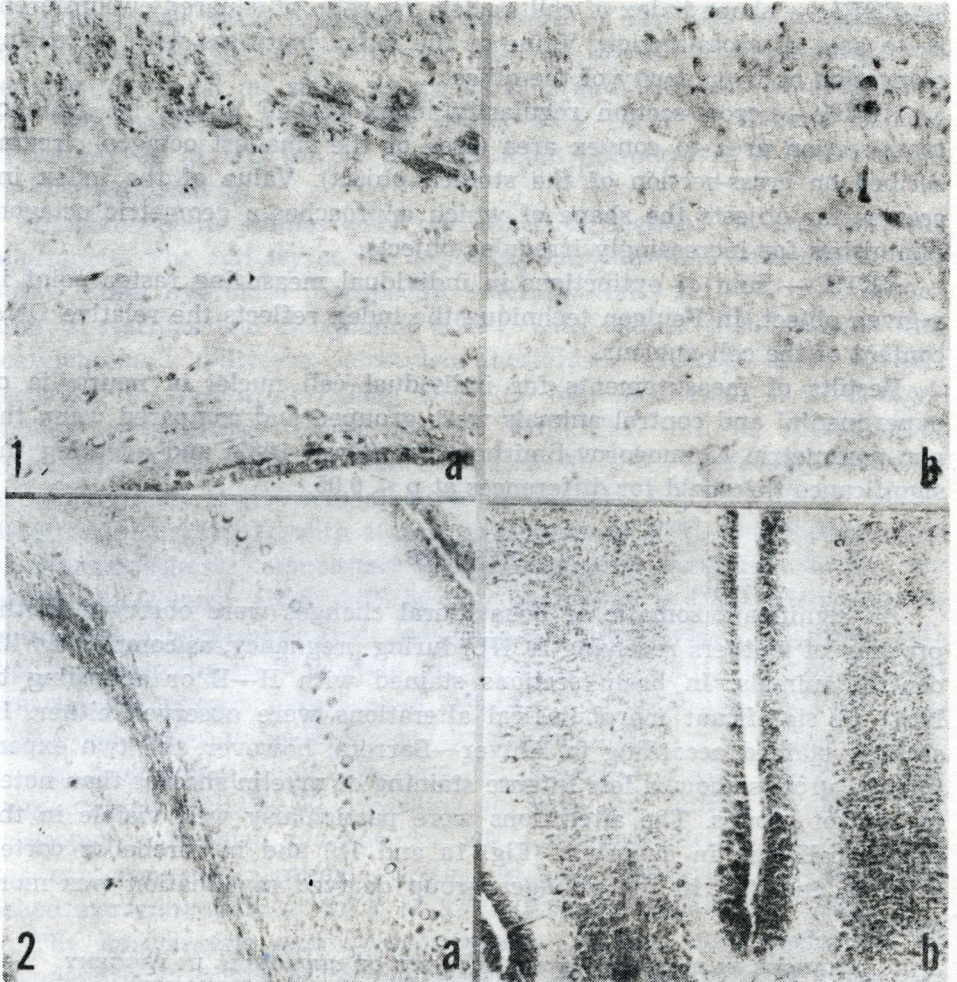


Fig. 1a. Control 14-day-old rat. Corpus callosum and cingulum. Myelin sheaths markedly stained in cingulum and less intensely in corpus callosum. Klüver—Barrera. $\times 250$

Ryc. 1a. Szczur kontrolny 14-dniowy. Spoidło wielkie mózgu i obęcz. Wyraźnie wybarwione osłonki mielinowe obrczy i mniej intensywnie spoidła wielkiego. Klüver—Barrera. Pow. $250 \times$

Fig. 1b. Experimental 14-day-old rat. Lower intensity of myelin staining than in control. Klüver—Barrera. $\times 250$

Ryc. 1b. Szczur doświadczalny 14-dniowy. Wybarwienie osłonek mielinowych mniej intensywne niż w kontroli. Klüver—Barrera. Pow. $250 \times$

Fig. 2a. Control 14-day-old rat. Cerebellar cortex. Pronounced staining of white matter myelin sheaths. Klüver—Barrera. $\times 250$

Ryc. 2a. Szczur kontrolny 14-dniowy. Kora mózdzku. Wyraźne wybarwienie się osłonek mielinowych włókien istoty białej. Klüver—Barrera. Pow. $250 \times$

Fig. 2b. Experimental 14-day-old rat. Cerebellar cortex. Myelin sheaths of white matter almost unstained. Klüver—Barrera. $\times 250$

Ryc. 2b. Szczur doświadczalny 14-dniowy. Kora mózdzku. Osłonki mielinowe włókien istoty białej w większości nie wybarwione. Klüver—Barrera. Pow. $250 \times$

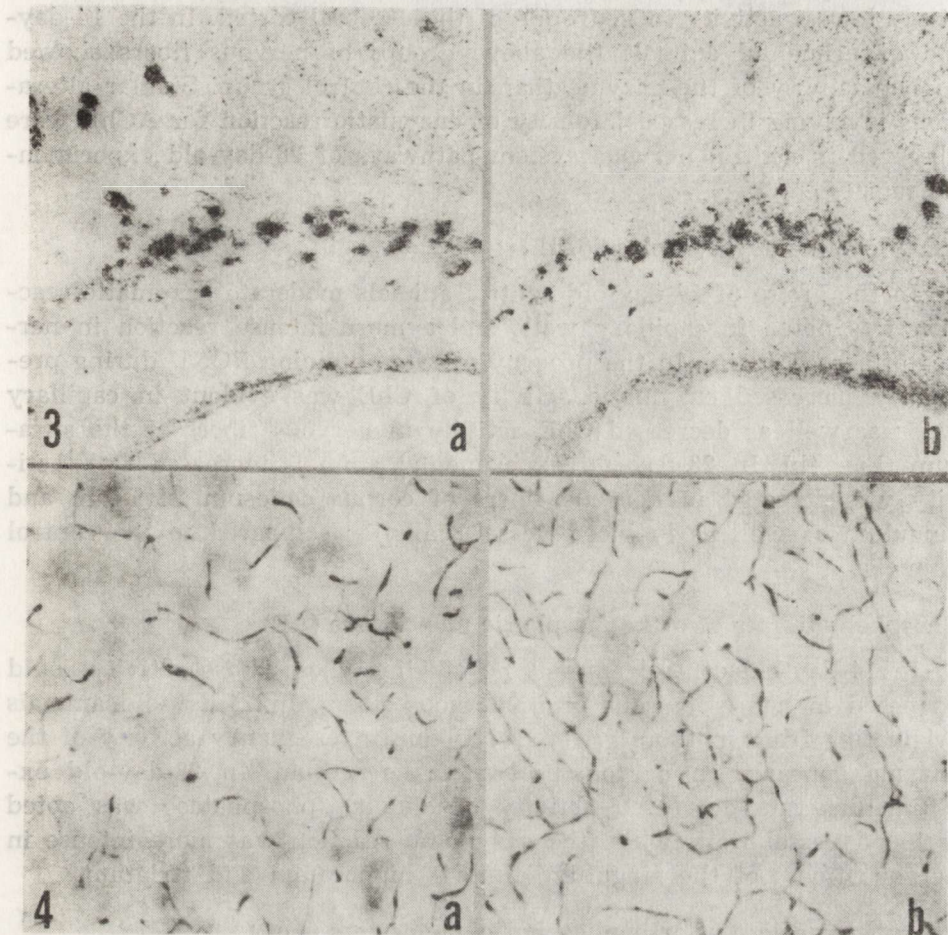


Fig. 3a. Control 14-day-old rat. Corpus callosum. NsE activity visible in myelination gliosis cells and weak in neuroglia cells. $\times 100$

Ryc. 3a. Szczur kontrolny 14-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Silna aktywność nie-swoistej esteraazy w komórkach gliozy mielinizacyjnej i słaba w pojedynczych komórkach neurogleju. Pow. $100 \times$

Fig. 3b. Experimental 14-day-old rat. Corpus callosum. Less intense reaction of NsE in myelination gliosis cells, lack of enzyme activity in neuroglia. $\times 100$

Ryc. 3b. Szczur doświadczalny 14-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Mniej intensywna reakcja na NsE w komórkach gliozy mielinizacyjnej, brak aktywności enzymu w neurogleju. Pow. $100 \times$

Fig. 4a. Control 14-day-old rat. Striatum region. Moderate ChE activity in walls of capillaries, weak reaction in nervous fibers. $\times 128$

Ryc. 4a. Szczur kontrolny 14-dniowy. Okolica prążkowie. Umiarkowana aktywność cholinesterazy w ścianach naczyń włosowatych i słaba we włóknach nerwowych. Pow. $128 \times$

Fig. 4b. Experimental 14-day-old rat. Striatum region. Increased ChE activity in walls of capillary vessels, diminished enzymatic reaction in bundles of nervous fibers. $\times 128$

Ryc. 4b. Szczur doświadczalny 14-dniowy. Okolica prążkowie. W porównaniu do grupy kontrolnej wzrost aktywności ChE w ścianach naczyń włosowatych i zmniejszenie aktywności enzymu we włóknach nerwowych. Pow. $128 \times$

tively lowest activity in neuropile of the cerebral cortex. In the 14-day-old experimental animals the above groups of nervous fibers showed higher activity of the enzyme than in the control group. Similar alterations involving increased intensity of enzymatic reaction for AChE were observed in central nervous system pathways of 28-day-old experimental rats.

Acetylcholine acylhydrolase (ChE)

In the group of 14-day-old control animals moderate enzymatic reaction was noted in capillary walls and a more intense reaction in nervous fibers (Fig. 4a). In the progeny of rats obtaining BCNU during pregnancy increased enzymatic activity of ChE was evident in capillary walls as well as decreased ChE activity in nervous fibers of the striatum (Fig. 4b). In 28-day-old experimental animals increased ChE activity was detected in nervous fibers of corpus callosum, striatum and cingulum as well as in blood vessel walls, as compared to the control animals.

Phosphohydrolase of orthophosphoric monoesters (AP)

In 14-day-old control animals no alkaline phosphatase activity could be noted in neuroglia cells or in nervous fibers. In 14-day-old animals originating from mothers given BCNU during pregnancy activity of the enzyme appeared in nervous fibers of the septum. In 28-day-old experimental rats decreased activity of alkaline phosphatase was noted in blood vessel walls while the enzymatic reaction was more intense in nervous fibers of the cingulum, fimbria hippocampi and striatum.

Phosphohydrolase of orthophosphoric monoesters (AcP)

In 14-day-old control rats low activity of acid phosphatase was detected in single oligodendroglial cells of corpus callosum and high activity of the enzyme in individual cells of myelination gliosis (Fig. 5a). In 14-day-old progeny of female rats, given BCNU during pregnancy, numerous myelination gliosis cells were seen featuring a very high activity of AcP (Fig. 5b) which corresponded to a myelination period earlier than that in the control group. In 28-day-old experimental animals AcP activity in oligodendroglia of corpus callosum, fimbria hippocampi (Fig. 6a and 6b) and optic tract was lower than in the control group but the reaction was positive in a higher number of cells.

Adenosine triphosphate phosphohydrolase (ATPase)

In the 14th day of extrauterine life a weak positive reaction for ATPase appeared in astroglia of fornix, alveus hippocampi and striatum. A weak reaction was also encountered in oligodendroglia cell membranes of the corpus callosum. Following administration of BCNU to pre-

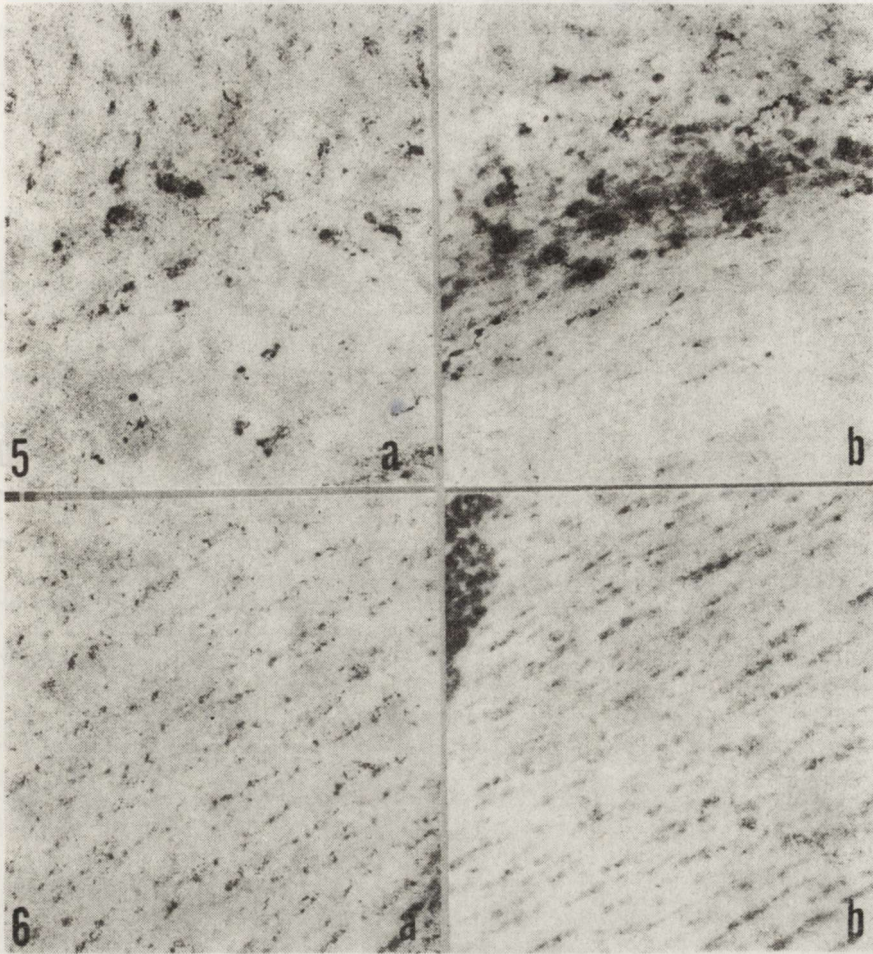


Fig. 5a. Control 14-day-old rat. Corpus callosum. Moderate AcP activity in single myelination gliosis cells and low activity in neuroglia. $\times 320$

Ryc. 5a. Szczur kontrolny 14-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Umiarkowana aktywność kwaśnej fosfatazy w pojedynczych komórkach gliozy mielinizacyjnej i słaba aktywność enzymu w neurogleju. Pow. $320 \times$

Fig. 5b. Experimental 14-day-old rat. High AcP activity in numerous cells of myelination gliosis and traces of activity in neuroglia cells of corpus callosum and gyrus cinguli. $\times 320$

Ryc. 5b. Szczur doświadczalny 14-dniowy. Wysoka aktywność fosfatazy kwaśnej w licznych komórkach gliozy mielinizacyjnej i śladowa w neurogleju spoidła wielkiego i zakrętu obręczy. Pow. $320 \times$

Fig. 6a. Control 28-day-old rat. Fimbria hippocampi. High AcP activity in numerous oligodendroglia cells. $\times 250$

Ryc. 6a. Szczur kontrolny 28-dniowy. Strzępek hipokampa. Wysoka aktywność FK w licznych komórkach oligodendrogleju. Pow. $250 \times$

Fig. 6b. Experimental 28-day-old rat. Fimbria hippocampi. AcP activity somewhat lower but present in greater number of cells. $\times 250$

Ryc. 6b. Szczur doświadczalny 28-dniowy. Strzępek hipokampa. Aktywność FK w oligodendrogleju nieco niższa niż w grupie kontrolnej, ale obecna w większej liczbie komórek. Pow. $250 \times$

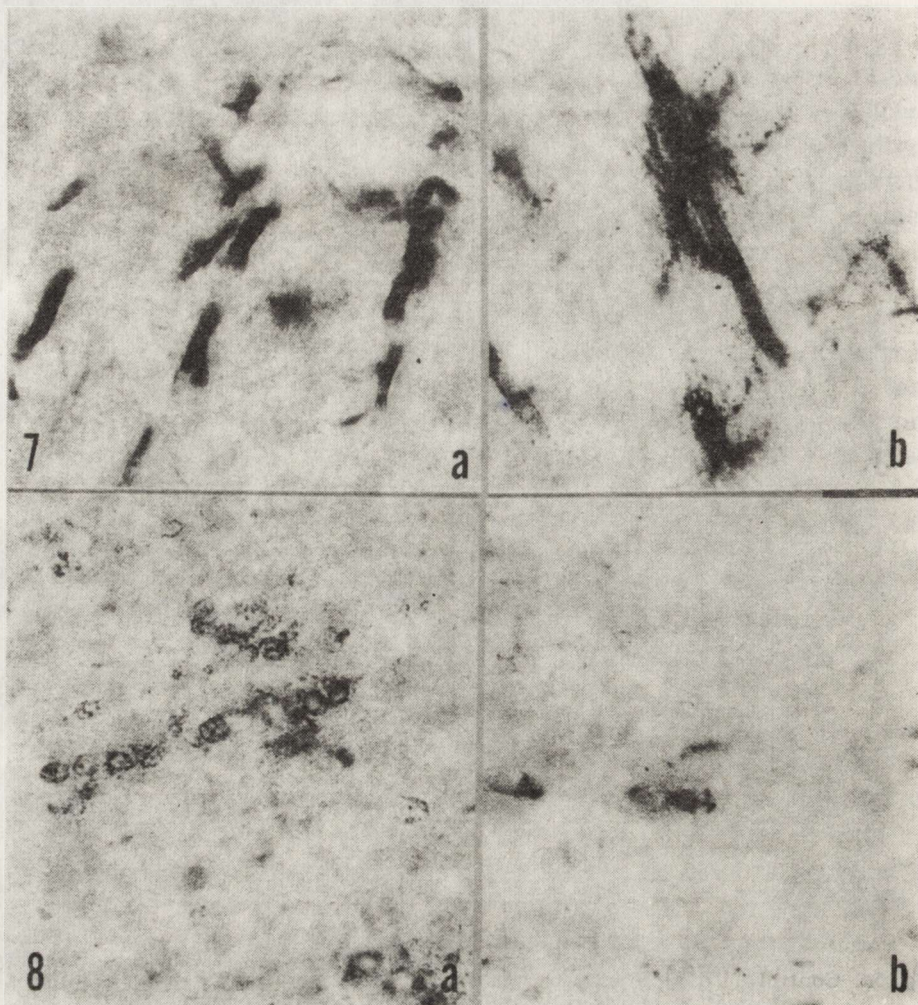


Fig. 7a. Control 28-day-old rat. Corpus callosum. Intense ATPase reaction in walls of capillaries. $\times 510$

Ryc. 7a. Szczur kontrolny 28-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Silna aktywność ATPazy w ścianach naczyń włosowatych. Pow. $510 \times$

Fig. 7b. Experimental 28-day-old rat. Corpus callosum. High ATPase activity in perivascular glia. $\times 510$

Ryc. 7b. Szczur doświadczalny 28-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Wysoka aktywność ATPazy w gleju przynaczyniowym. Pow. $510 \times$

Fig. 8a. Control 14-day-old rat. Corpus callosum. TPPase reaction in interfascicular glia. $\times 500$

Ryc. 8a. Szczur kontrolny 14-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Reakcja enzymatyczna na TPPazę w gleju międzypęczkowym. Pow. $500 \times$

Fig. 8b. Experimental 14-day-old rat. Corpus callosum. Positive TPPase reaction only in single oligodendroglia cells. Structures of Golgi apparatus not visible. $\times 500$

Ryc. 8b. Szczur doświadczalny 14-dniowy. Spoidło wielkie mózgu. Dodatni odczyn TPPazy widoczny tylko w pojedynczych komórkach oligodendrogleju. Struktury aparatu Golgiego zatarte. Pow. $500 \times$

Table 1. Results of karyometric and DNA cytophotometric measurements in oligodendroglia of 14- and 28-day-old progeny of rats given BCNU on 12th and 18th day of pregnancy
 Tabela 1. Wyniki pomiarów kariometrycznych i cytofotometrii DNA oligodendrogleju 14- i 28-dniowego potomstwa matek szczurzych, którym podano BCNU w 12 i 18 dniu ciąży

Material Materiał	Value in a group Wartość w grupie	Coefficients and shape indices Współczynniki i wskaźniki kształtu				
		KONL	KOFL	FOFA	FLVH	EXTS
14-day-old rats 14-dniowe szczury						
control group grupa kontrolna	min	58	124	127	81	45
	max	85	210	178	94	109
	\bar{x}	68	167	142	88	78
experimental group grupa doświadczalna	min	60	128	126	84	70
	max	80	205	160	94	116
	\bar{x}	69	175	137	89	97
p _{control/experimental} <		ns	ns	0.01(-)	0.05(+)	0.001(+)
28-day-old rats 28-dniowe szczury						
control group grupa kontrolna	min	65	147	127	80	73
	max	96	272	184	94	138
	\bar{x}	78	216	142	89	102
experimental group grupa doświadczalna	min	62	141	130	80	53
	max	96	279	203	93	149
	\bar{x}	77	213	142	88	94
p _{control/experimental} <		ns	ns	ns	ns	0.02(-)

KONL — circumference of cell nucleus

obwód jądra komórkowego

KOFL — surface area of cell nucleus

powierzchnia jądra komórkowego

FOFA — shape index of cell nuclei

wskaźnik kształtu jąder komórkowych

FLVH — cross-section regularity index of cell nuclei

wskaźnik regularności przekroju jąder komórkowych

EXTS — extinction sum

suma ekstynkcji

Numerical values of KONL and KOFL are expressed in numbers of measuring raster points, EXTS — in extinction working units.

Wartość liczbowa KONL i KOFL wyrażona liczbą punktów rastru pomiarowego. EXTS — w jednostkach roboczych ekstynkcji.

p — level of statistical significance, ns — insignificant

p — poziom znamienności statystycznej, ns — statystycznie nieznamiennie

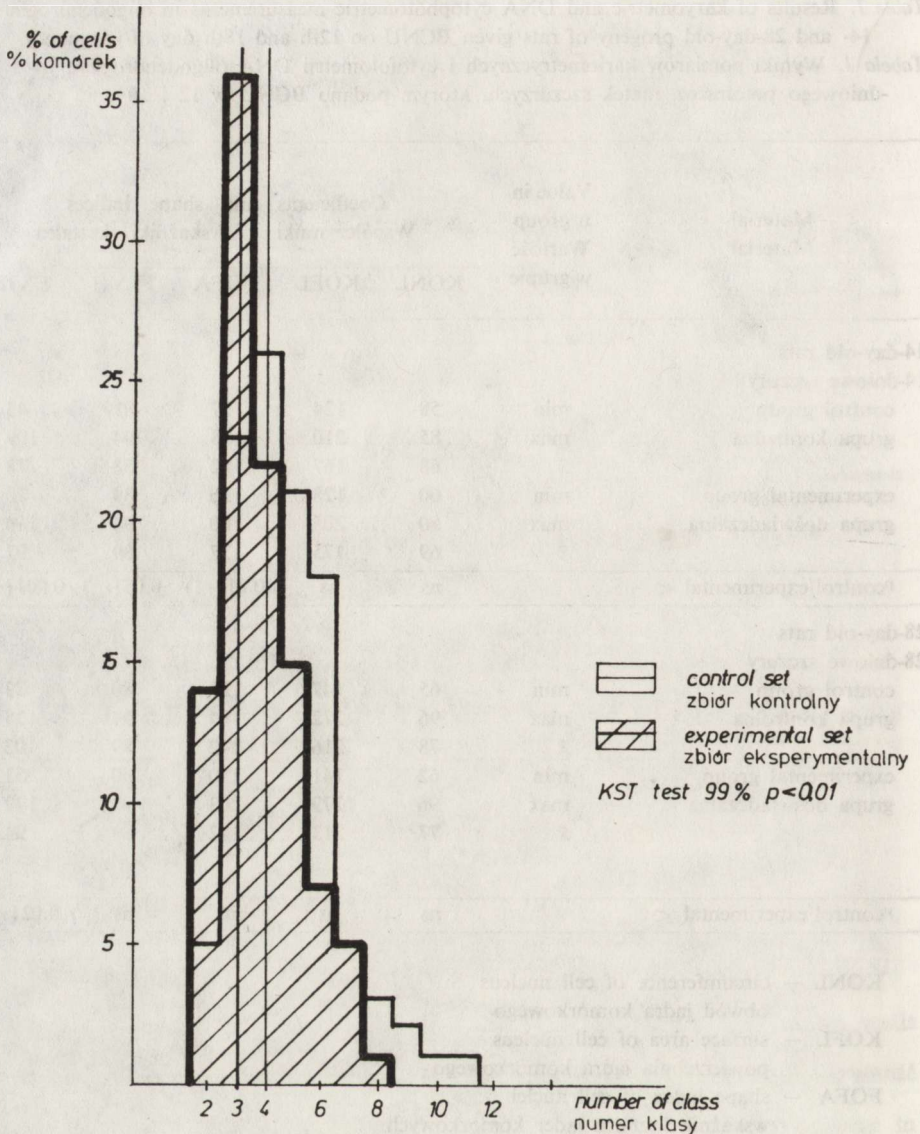


Fig. 9. Histograms of oligodendroglia nuclei shape (FOFA) index in 14-day-old control and experimental rats

Ryc. 9. Histogramy wskaźnika kształtu (FOFA) zbiorów jąder oligodendrogleju 14-dniowych szczurów grupy kontrolnej i doświadczalnej

gnant rats, an increased activity of the enzyme was noted in 14-day-old progeny both in astroglia and oligodendroglia of the above mentioned brain structures as well as increased ATPase activity in the perivascular glia. In the experimental group enhanced for ATPase was detected also in capillary walls. In 28-day-old experimental rats ATPase activity was higher in the perivascular glia of the corpus callosum (Fig. 7a, 7b)

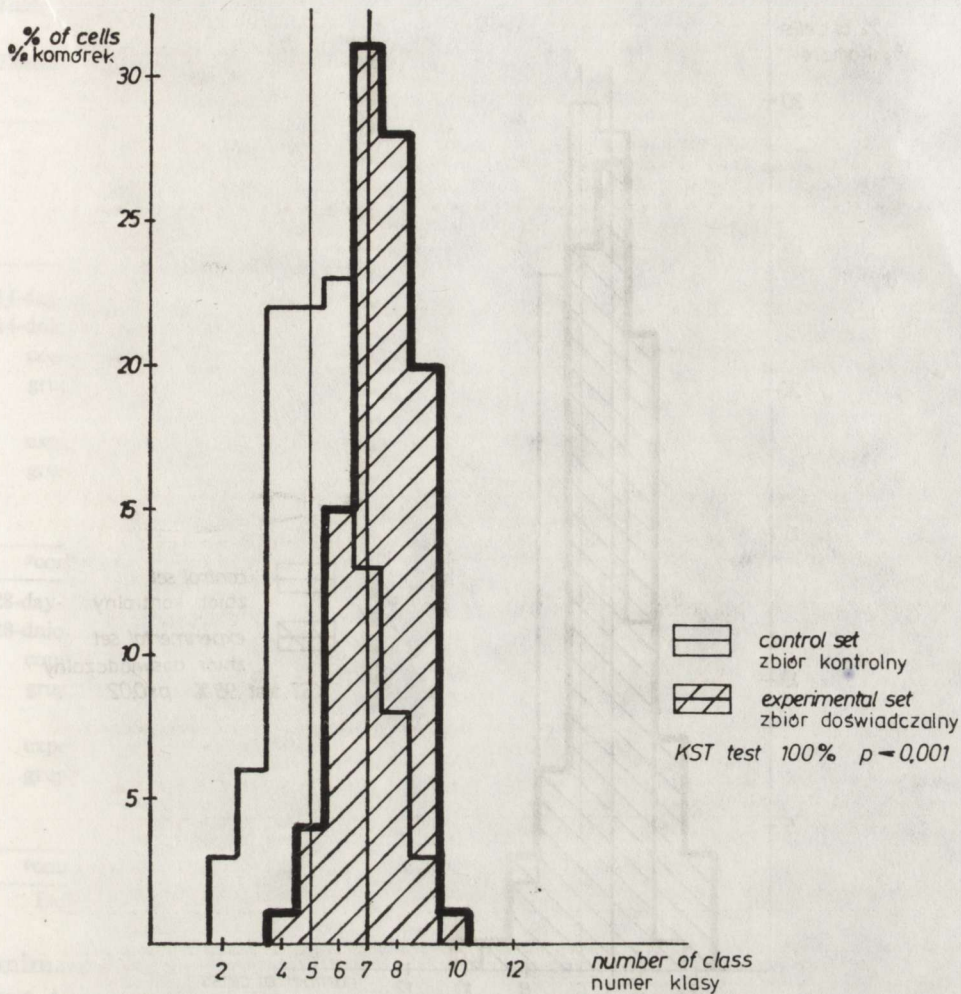


Fig. 10. Histograms of extinction sum (EXTS) for oligodendroglia nuclei in 14-day-old rats of control and experimental groups

Ryc. 10. Histogramy sumy ekstynkcji (EXTS) zbiorów jąder oligodendrogleju 14-dniowych szczurów grupy kontrolnej i doświadczalnej

fimbria hippocampi, thalamus, cerebral cortex as well as in oligodendroglia of these regions, as compared with controls of the appropriate age.

Thiamine pyrophosphate phosphohydrolase (TPPase)

In brain sections of 14-day-old control rats weak enzymatic reaction for TPPase was visible in the interfascicular oligodendroglia cells arranged in rows in the corpus callosum (Fig. 8a). In the experimental group, TPPase activity was observed only in single cells of corpus callosum interfascicular oligodendroglia (Fig. 8b). Even if relatively intense, the

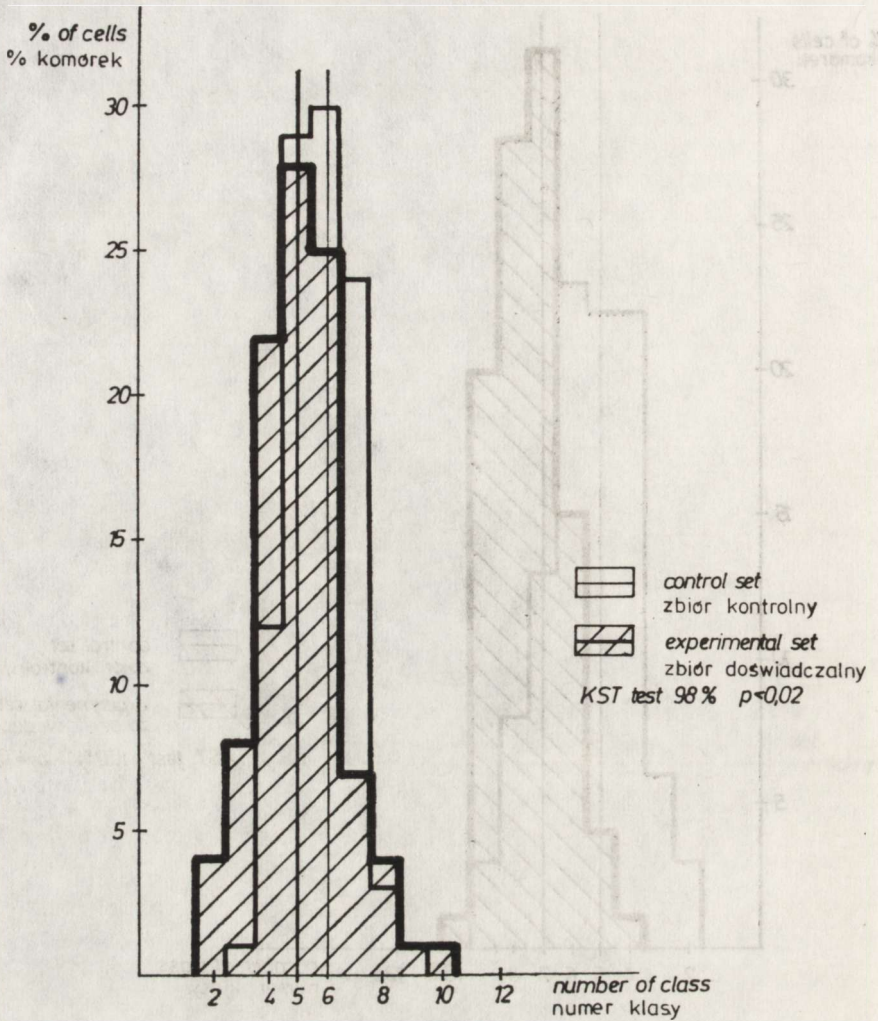


Fig. 11. Histograms of extinction sum for oligodendroglia nuclei in 28-day-old rats of control and experimental groups

Ryc. 11. Histogramy sumy ekstynkcji zbiorów jąder oligodendrogleju 28-dniowych szczurów grupy kontrolnej i doświadczalnej

enzymatic reaction was present in a lower number of cells. In 28-day-old animals TPPase activity was moderate in oligodendroglia of the corpus callosum, fimbria hippocampi and low in striatum neuroglia. In progeny of BCNU treated mothers, the activity of the enzyme somewhat decreased in corpus callosum oligodendroglia, while it increased in oligodendroglia of fimbria hippocampi and of the striatum.

Karyometric studies and DNA cytophotometry in oligodendroglia (Tab. 1)

Measurements of cross-section circumferences of oligodendroglia nuclei (KONL) and of cross-section surface areas (KOFL) in 14-day-old

Table 2. Results of karyometric and DNA cytophotometric measurements in astroglia of 14- and 28-day-old progeny of rats given BCNU on 12th and 18th day of pregnancy
 Tabela 2. Wyniki pomiarów kariometrycznych i cytofotometrii DNA astrogleju 14- i 28-dniowego potomstwa matek szczurzych, którym podano BCNU w 12 i 18 dniu ciąży

Material Materiał	Value in a group Wartość w grupie	Coefficients and shape indices Współczynniki i wskaźniki kształtu				
		KONL	KOFL	FOFA	FLVH	EXTS
14-day-old rats 14-dniowe szczury						
control group grupa kontrolna	min	60	135	128	81	69
	max	89	237	176	93	120
	\bar{x}	73	198	141	88	96
experimental group grupa doświadczalna	min	63	144	128	80	69
	max	93	269	189	94	149
	\bar{x}	75	202	141	88	105
$p_{\text{control/experimental}} <$		0.02(+)	ns	ns	ns	0.01(+)
28-day-old rats 28-dniowe szczury						
control group grupa kontrolna	min	54	114	126	79	60
	max	87	235	179	94	118
	\bar{x}	70	175	141	88	85
experimental group grupa doświadczalna	min	55	114	127	78	53
	max	82	225	197	93	120
	\bar{x}	70	170	138	89	92
$p_{\text{control/experimental}} <$		ns	ns	0.05(-)	0.05(+)	0.01(+)

Explanations as in Table 1 Objasnienia jak w tabeli 1

animals showed augmented arithmetic means in the experimental groups, but the alterations failed to be significant. The cell nucleus shape index (FOFA) decreased (nuclei became more round) in the experimental group (Fig. 9) and the change was significant at $p < 0.01$. On the other hand, the shape regularity index of oligodendroglia nuclei increased ($p < 0.05$) indicating a more regular shape of the nuclei.

Mean DNA extinction value increased from 78 to 97 working extinction units, i.e., DNA extinction increased 1.3-fold. The change was significant at $p < 0.001$. Histograms of the experimental and control sets are presented in Figure 10. The median value of the experimental set was shifted by two classes towards higher values. In the group of 28-day-old rats, nuclei cross-section circumference and cross-section area of oligodendroglia nuclei showed no significant changes as compared with the control group. Shape index and shape regularity index of oligodendroglia nuclei cross-sections also showed no alterations. However, DNA extinction estimates indicated its decrease ($p < 0.02$). In the histograms

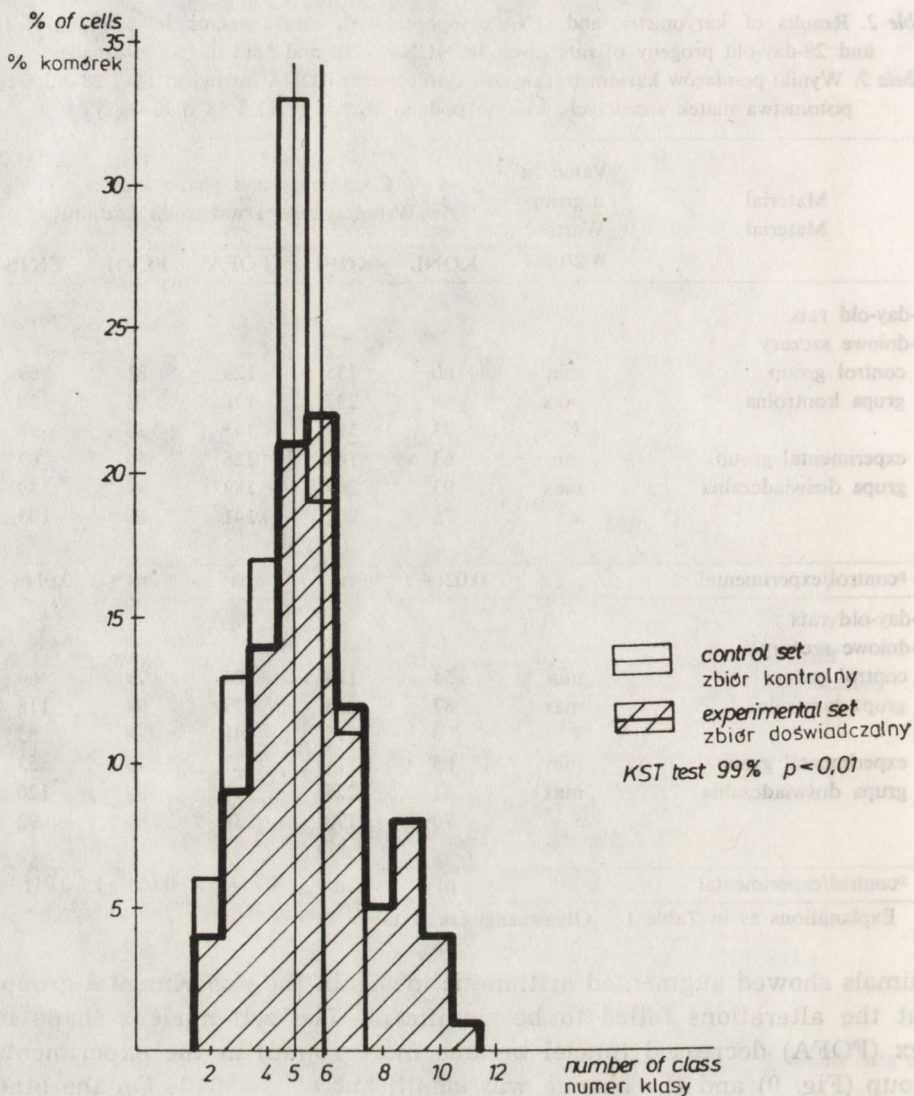


Fig. 12. Histograms of extinction sum for astroglia nuclei in 14-day-old rats of control and experimental groups

Ryc. 12. Histogramy sumy ekstynkcji zbiorów jąder astrogleju 14-dniowych szczurów grupy kontrolnej i doświadczalnej

presented in Figure 11, the experimental set is shifted towards lower classess as compared with the experimental set with median value of the experimental set in class 5.

Karyometric studies and DNA cytophotometry in astroglia (Tab. 2)

In the group of 14-day-old rats karyometric measurements demonstrated an increased circumference of the cross-section of astroglia nuclei ($p < 0.02$). The area of the cross-sections increased, but the altera-

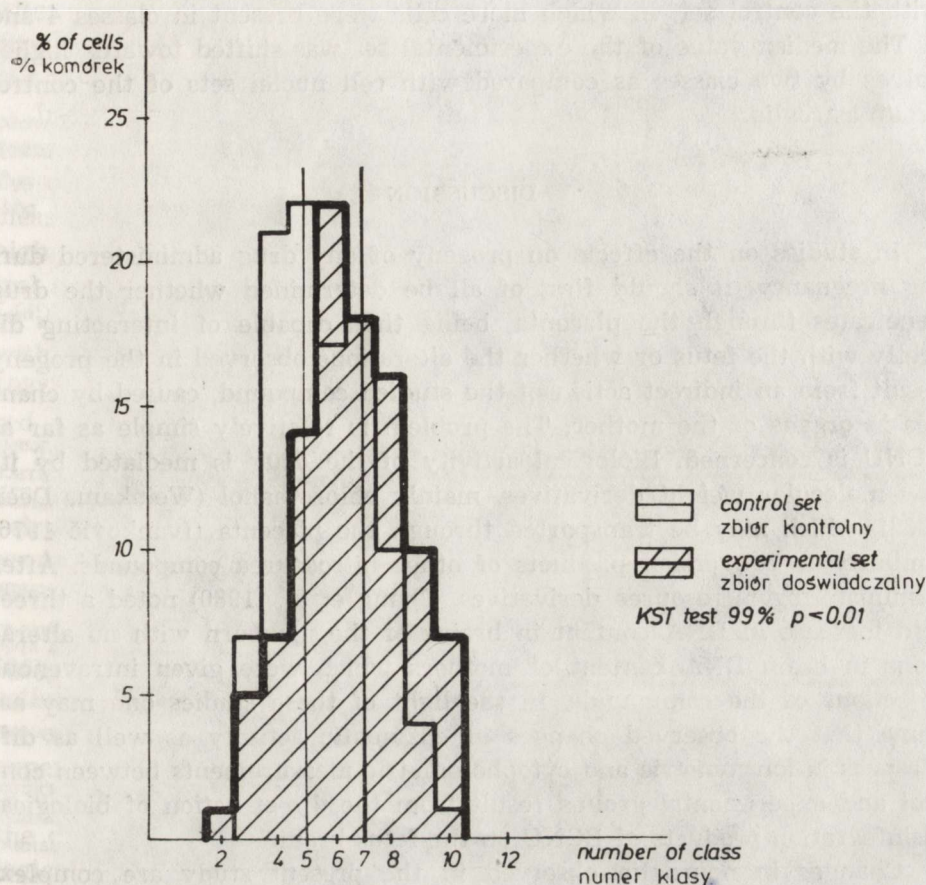


Fig. 13. Histograms of extinction sum for astroglia nuclei in 28-day-old rats of control and experimental groups

Ryc. 13. Histogramy sumy ekstynkcji zbiorów jąder astrogleju 28-dniowych szczu-
rów grupy kontrolnej i doświadczalnej

tion was insignificant. No changes were noted in indices of shape and shape regularity for nuclei cross-sections in the cells. DNA extinction increased from 96 to 105 working units ($p < 0.01$). DNA extinction histograms (Fig. 12) proved broadening of the experimental set to class 11 while the last cells of the control set were present in class 7. The experimental set featured also clearly a lower number of cells in class 5 than the control one. Karyometric studies on astroglia of 28-day-old rats showed no changes in nuclear contour and area indices (KONL and KOFL) of the cells in the experimental group. On the other hand, nuclei became more round (decreased FOFA, $p < 0.05$) and their outline became more regular (increased FLVH, $p < 0.05$). DNA extinction measurements showed it augmented, similarly as in 14-day-old animals ($p < 0.001$). Extinction histograms (Fig. 13) visualized an increase in cell numbers in classes 6, 8, 9 and 10 of the experimental set, as compared

with the control set, in which more cells were present in classes 4 and 5. The median value of the experimental set was shifted towards higher values by two classes as compared with cell nuclei sets of the control group astroglia.

DISCUSSION

In studies on the effects on progeny of any drug administered during pregnancy, it should first of all be determined whether the drug penetrates through the placenta, being thus capable of interacting directly with the fetus or whether the alterations observed in the progeny result from an indirect action of the studied compound, caused by changes in organs of the mother. The problem is relatively simple as far as BCNU is concerned. Biological activity of the drug is mediated by its low molecular weight derivatives, mainly chlorethanol (Weinkam, Deen 1982), which may be transported through the placenta (Ivankovič 1976) similarly to conversion products of other nitrosourea compounds. After administering nitrosourea derivatives, Chang et al. (1980) noted a three-fold increase in DNA content in brains of the newborn with no alterations in brain DNA content of mothers which were given intravenous injections of the compounds. In the light of these studies one may assume that the observed changes in enzymatic activity as well as differences in karyometric and cytophotometric measurements between control and experimental groups result from the direct action of biological disintegration products of BCNU on the fetus brain.

Changes in neuroglia observed in the present study are complex, this corresponding to the action of the cytostatic drug on the developing brain. In relation to oligodendroglia it is worth attention that in 14-day-old rats, as compared with the control of appropriate age, the DNA content of cell nuclei is increased, while the cells become morphologically more immature (i.e., they have acquired a more spherical shape and show a more regular nucleus cross-section). In later development, in the group of 28-day-old rats, nuclei of oligodendroglia cells in the experimental group do not differ from those in the control group in the mentioned indices, while their DNA content is lower than in the control group. Changes observed in oligodendroglia of the older progeny resemble those noted in adult animals given CCNU, another nitrosourea derivative (Szczech 1984a).

Karyometric changes and cytophotometrically detected alterations in DNA contents of astroglia nuclei are of distinct type and are more pronounced in the group of older animals (more spherical shape, increased regularity of outlines of cell nucleus cross-sections in the group of 28-day-old rats). In the two experimental groups, astroglia nuclei show an increased DNA content. It indicates, therefore, that drug-induced interference with DNA synthesis does not become evident until later in life.

Alterations noted in karyometric and cytophotometric measurements may convincingly be linked to changes observed in brain myelination and to the observed altered histoenzymatic activity of neuroglia.

In 14-day-old rats delayed myelination, observed in sections stained according to Klüver—Barrera, corresponds to lowered, as compared with the control, maturity of oligodendroglia nuclei indicated by karyometric measurements. Delayed in time is also myelination gliosis linked with high activity of NsE and AcP. The process is almost completed in control animals. Delayed myelination is accompanied by low TPPase activity in the interfascicular glia, as compared with the control group and with results of other studies on the process (Wender, Kozik 1971; Szczech 1982), indicating delayed functional maturation of the cells. As compared with 14-day-old animals, changes in histoenzymatic activity noted in 28-day-old rats are of a more quantitative type which may indicate gradual compensation of the alteration during farther extrauterine development.

Activity of the enzymes constituting blood-brain barrier markers, like ChE (Joo, Varkonyi 1969) and ATPase, may suggest earlier development of barrier mechanisms in the progeny of mothers receiving BCNU than in control animals. In the present studies a marked increase in ChE activity has been noted in blood vessel walls of 14-day-old animals and an evident increase in perivascular glia ATPase activity in 28-day-old experimental animals, as compared with the respective control groups. In view of the karyometric and DNA cytophotometric results in astroglia the changes should be interpreted rather as a result of augmented biological activity of astroglia, since in studies on ATPase activity in astroglia during development (Szczech 1982) a gradual increase in activity of the enzyme has been noted up to the 40th day of rat extrauterine life.

The conducted studies show that the cytostatic drug, considered to be free of neurotoxic activity (Young, Posner 1980), induces significant morphological and histoenzymatic changes in neuroglia of the progeny when administered in low doses during pregnancy.

WPLYW BCNU PODAWANEGO CIĘŻARNYM SAMICOM SZCZURA NA MORFOLOGIĘ I HISTOCHEMIĘ NEUROGLEJU U POTOMSTWA

Streszczenie

Stosowanie pochodnych nitrozomocznika w leczeniu rozrostowych procesów nowotworowych związane jest z zaburzeniami metabolizmu DNA. Zaburzenia te mogą manifestować się efektami cytotoksycznym i immunosupresyjnym, a także terato- i kancerogennym. Celem podjętych badań była ocena wpływu BCNU, stanowiącego pochodną nitrozomocznika, stosowaną w terapii przeciwnowotworowej, na populację neurogleju u potomstwa matek, które otrzymywały cytostatyk w drugiej połowie ciąży.

BCNU rozpuszczano w roztworze soli fizjologicznej i wstrzykiwano dootrzewnowo ciężarnym samicom szczurzym w 12 i 18 dniu ciąży, każdorazowo w dawce

7,5 mg. Potomstwo tak traktowanych szczurów było usypiane w 14 i 28 dniu życia. Przeprowadzono histologiczną, histochemiczną i kariometryczną analizę ośrodkowego układu nerwowego ze szczególnym uwzględnieniem zachowania się populacji neurogleju.

Wykazano, że transłożyskowe działanie BCNU prowadzi do nieprawidłowości obrazu histologicznego i histoenzymatycznego neurogleju i opóźnienia mielinizacji ośrodkowego układu nerwowego. Nieprawidłowości gleju uchwytnie w badaniach kariometrycznych we wczesnym okresie po urodzeniu, cofały się w okresie późniejszym.

ВЛИЯНИЕ КАРМУСТИНА ВВОДИМОГО БЕРЕМЕННЫМ САМКАМ КРЫСЫ НА МОРФОЛОГИЮ И ГИСТОХИМИЮ НЕЙРОГЛИИ У ПОТОМСТВА

Резюме

Применение производных нитрозомочевины в лечении гиперпластических опухолевых процессов связано с расстройствами метаболизма ДНК. Эти расстройства могут проявляться эффектами: цитотоксическим и иммуносупрессионным, а также тератоканцерогенным. Целью предпринятых исследований была оценка влияния кармустина являющегося производной нитрозомочевины, применяемого в противоопухолевой терапии на популяцию нейроглии у потомства матерей которые получали цитостатик во второй половине беременности.

Кармустин растворяли в физиологическом растворе соли и вводили беременным крысиным самкам на 12 и 18 дню беременности внутрибрюшинно, каждый раз в дозе 7,5 мг. Потомство этих крыс усыпляли на 14 и на 28 день жизни. Авторы провели гистологический, гистохимический и кариметрический анализ центральной нервной системы, с особенным учетом поведения популяции нейроглии.

Доказано что трансплацентарное действие кармустина приводило к аномалии гистологической и гистозиматической картины нейроглии и к замедлению миелинизации центральной нервной системы. Аномалии глии уловимые в кариметрических исследованиях в раннем периоде после рождения отступали в более позднем периоде.

REFERENCES

1. Bosch D. A.: Short and long term effects of methyl- and ethylnitrosourea (MNU and ENU) on the developing nervous system of the rat. II. Short term effects: concluding remarks on chemical neuro-oncogenesis. *Acta neurol. Scand.*, 1977, 55, 106—122.
2. Chang M. J. W., Hart R. W., Koestner A.: Retention of promutagenic 0-6-ethylguanidine in the DNA of various rat tissues following transplacental inoculation with ethylnitrosourea. *Cancer Letters*, 1980, 9, 199—205.
3. Druckrey H., Ivankovič S., Preussmann R.: Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-methyl-N-nitrosoharnstoff. *Z. Krebsforsch.*, 1965, 66, 389—408.
4. Florkin M., Stotz E. H.: Enzyme nomenclature. In: *Comprehensive biochemistry*. Elsevier, Amsterdam 1973.
5. Gerebtzoff M.: Recherches histochemique sur les acetylcholine et choline esterase. *Acta anat.*, 1953, 19, 336—339.
6. Godlewski A., Szczech J.: Morphometry and histochemistry of adult rat neurocytes after BCNU administration. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1984, (in press).
7. Gomori G.: *Microscopic histochemistry. Principles and practice*. The University of Chicago Press, Chicago 1952, 137—224.

8. Greń J.: Statystyka matematyczna. Modele i zadania. PWN Warszawa 1982, 122—130.
9. Hallas B. H., Das G. D.: An aberrant nucleus in the telencephalon following of ENU during neuroembryogenesis. *Teratology* 1979, 2, 159—164.
10. Ivankovič S.: Teratogenic and carcinogenic effects of some chemicals during prenatal life in rats, syrian golden hamsters and minipigs. *National Canc. Inst. Monograph*, 1976, 51, 103—115.
11. Joó F., Varkonyi T.: Correlation between cholinesterase activity of capillaries and the blood-brain barrier in the rat. *Acta biol. Acad. Sci. Hung.*, 1969, 20, 359—372.
12. Koyama T., Handa H., Handa J., Matsumoto S.: Experimental hydrocephalus. Postnatal observations of hydrocephalus induced by ethyl-nitrosourea in SD-JCL rat. *Z. Neurol.*, 1972, 202, 21—36.
13. Krygier-Stojałowska A.: Zasady cytofotometrii. In: *Topochemiczne metody badania komórek i tkanek*. PWN, Warszawa 1982, 111—134.
14. Nachlas M., Seligmann A.: The histochemical demonstration of esterases. *J. Nat. Canc. Inst.*, 1949, 9, 415—425.
15. Novikoff A., Goldfischer B. S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1961, 47, 802—910.
16. Parmiani G., Colnaghi M. I., Della Porta G.: Immunodepression during urethane and N-nitrosomethylurea leukaemogenesis in mice. *Brit. J. Cancer*, 1971, 25, 354—364.
17. Szczech J.: Aktywność histoenzymatyczna układu limbicznego w rozwoju ontogenetycznym szczura. In: *Problemy medycyny doświadczalnej i klinicznej*. Warszawa-Poznań 1982, 115—171.
18. Szczech J.: Karyometric, cytophotometric and histoenzymatic studies on neuroglia of rats administered with CCNU (Lomustine). *Exp. Pathol.* 1984a, (in press).
19. Szczech J.: Karyometric, cytophotometric and histoenzymatic studies on neuroglia of young rats subjected to CCNU (Lomustine) action. *Acta histochem.*, 1984b, 75, 121—132.
20. Szczech J., Godlewski A.: Histoenzymatic, karyometric and DNA cytophotometric studies on rat neuroglia following administration of BCNU (Carmustine). *Acta histochem.* 1984, (in press.).
21. Voss R. J., Barz H., Wagner H.: Automatische Bildverarbeitung in der Pathologie. III. Aufbau und Anwendung eines automatisierten Systems zur Erfassung morphometrischer Parameter von Zellkerner. *Exp. Pathol.*, 1977, 13, 145—161.
22. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 1957, 27, 13—23.
23. Weinkam R. J., Deen D. F.: Quantitative dose-response relations for the cytotoxic activity of chloroethylnitrosoureas in cell culture. *Cancer Res.*, 1982, 42, 1008—1014.
24. Wender M., Kozik M.: Histoenzymology of cerebral white matter in the developing rat brain. *J. Hirnforsch.*, 1971/1972, 1, 223—230.
25. Young D. F., Posner J.: Nervous system toxicity of the chemotherapeutic agents. In: *Handbook of clinical neurology*. Ed. P. J. Vinken, G. W. Bruyn, Elsevier North Holland, Biomedical Press. Amsterdam 1979, 36, 91—126.

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

IRMINA B. ZELMAN, JAN SAWICKI

ZMIANY MORFOLOGICZNE W UKŁADZIE WZROKOWYM KRÓLIKA LABORATORYJNEGO W NASTĘPSTWIE WRODZONEGO JEDNOSTRONNEGO MAŁOOCZA

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

Małocze, wrodzone lub nabyte, spotyka się u wszystkich gatunków zwierząt domowych i laboratoryjnych. Wrodzone małocze jest wadą, która powstaje we wczesnym okresie rozwoju zarodkowego. Przyczyny małocza są zróżnicowane i podobnie jak w większości zaburzeń tego okresu rozwoju przeważnie niemożliwe do ustalenia. W warunkach doświadczalnych pojawienie się małocza wiązano z teratogennym działaniem różnych czynników endo- i egzogennych, przede wszystkim zatruciem i niedoborów witaminowych, zwłaszcza witaminy A (Jubb, Kennedy 1968, Kircher 1978). W przeciwieństwie do wrodzonego braku gałek ocznych, który przeważnie występuje symetrycznie i u niektórych zwierząt jest uwarunkowany genetycznie, m.in. u myszy (Cullen, Kaiserman-Abramof 1976) i u szczura (Kobayashi, Otani 1981), małocze występuje zwykle sporadycznie, rzadko rodzinnie i częściej jest jedno- niż obustronne.

Małocze, jak wynika z nazwy, polega na zmniejszeniu rozmiarów gałki ocznej. Tylko w wyjątkowych przypadkach zaburzenie ogranicza się do proporcjonalnej redukcji wszystkich struktur gałki ocznej przy zachowaniu prawidłowych stosunków anatomicznych. W większości przypadków towarzyszą mu dodatkowe nieprawidłowości różnych struktur gałki ocznej, a niekiedy, zwłaszcza w przypadkach rodzinnych, również i innych narządów. Bardzo często małocze współistnieje z odwarstwieniem siatkówki, prawdopodobnie spowodowanym różnicą w szybkości wzrostu zewnętrznej i wewnętrznej warstwy embrionalnego oka (Jubb, Kennedy 1968).

U królika laboratoryjnego małocze spotyka się bardzo rzadko, a przypadki dziedziczenia tej wady nie są znane. Na przestrzeni ostatnich 10 lat mieliśmy 5 przypadków jednostronnego małocza w stadzie królików pt, które postanowiliśmy wykorzystać do przedyskutowania problemu wtórnych zaników w układzie wzrokowym.

MATERIAŁ I METODY

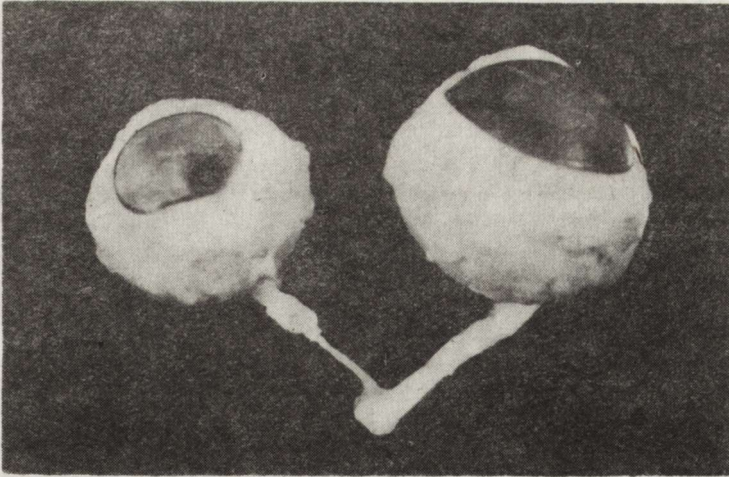
Badania przeprowadzono na 5 królikach ze stada pt, 3 samcach i 2 samicach. Trzy króliki pochodziły z różnych miotów, w 2 przypadkach małowocze pojawiło się u rodzeństwa, obarczonego dodatkowo wadą zgryzu, uniemożliwiającą prawidłowe pobieranie pokarmu i wymagającą systematycznego przycinania siekaczy. Asymetrię gałek ocznych zauważono w 10—12 dniu życia, to jest w okresie kiedy króliczeta zaczynają otwierać oczy. We wszystkich przypadkach małowoczu towarzyszyły dodatkowe nieprawidłowości w zakresie różnych struktur gałki ocznej, stwierdzone klinicznie lub w badaniu sekcyjnym. U rodzeństwa (królik Nr. 32/79 i 34/79) stwierdzono podwinięcie rzęsowej krawędzi powieki (entropion) po stronie nieprawidłowej gałki ocznej z wtórnym owrzodzeniem i zmętnieniem rogówki. U jednego królika brak było soczewki, w 2 przypadkach soczewka była nieprawidłowa (nieprzezierna w jednym, w drugim — niekształtna i przemieszczona ku obwodowi). U 3 królików niezależnie od wady układu wzrokowego rozwinął się typowy dla mutacji pt zespół neurologiczny o średnio ciężkim przebiegu z wtórną poprawą po ostrym okresie objawowym. Czas przeżycia zwierząt wynosił 3, 4 i 7 miesięcy.

We wszystkich przypadkach króliki uśmiercano wykonując przezsercową perfuzję 10% roztworem formaliny w soli fizjologicznej. Od każdego zwierzęcia pobierano po utrwaleniu mózg wraz z pniem i mózdzkiem, obie gałki oczne i nerwy wzrokowe. Gałki oczne przecinano w płaszczyźnie strzałkowej na dwie części, które po usunięciu soczewki przeprowadzano do parafiny. Ponadto pobierano pozagałkowe odcinki obu nerwów wzrokowych, skrzyżowanie wzrokowe, a z mózgu bloczki przez obie półkule, obejmujące pasma wzrokowe, ciała kolankowate boczne, jądra przednakrywkowe oraz korę wzrokową, a ponadto wycinek ze śródmózgowia z wzgórkami czworaczymi górnymi. Materiał przeprowadzano rutynowo do parafiny. Skrawki barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, według metody van Gieson, Heidenhaina lub Klüvera-Barrery i Kanzler-Arendta oraz impregnowano metodą Holmesa.

WYNIKI

Badanie makroskopowe

U wszystkich królików stwierdzono typowe dla małowocza zmniejszenie rozmiarów jednej gałki ocznej z towarzyszącym zanikiem nerwu wzrokowego (ryc. 1). Nerw wzrokowy po stronie nieprawidłowej gałki ocznej po odpreparowaniu pochewki łącznotkankowej przedstawiał się w 4 przypadkach jako szare nitkowate pasemko tkanki o średnicy zredukowanej do 1/3 średnicy normalnego nerwu. Tylko u jednego królika różnice te były mniejsze, nerw wzrokowy był prawidłowo zabarwiony i wyda-



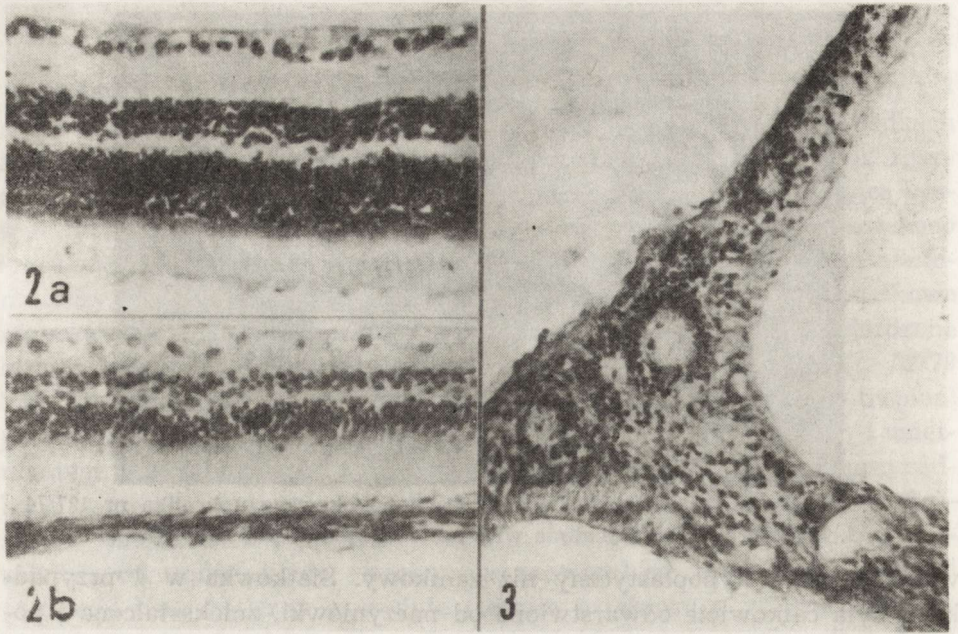
Ryc. 1. Jednostronne małowocze i zanik nerwu wzrokowego u królika nr 127/74

Fig. 1. Unilateral microphthalmia with optic atrophy in the rabbit No 127/74

wał się raczej hypoplastyczny niż zanikowy. Siatkówka w 4 przypadkach była całkowicie odwarstwiona od naczyniówki, zniekształcona i po-fałdowana; u jednego królika nie wykazywała makroskopowo uchwyt-nych zmian. We wszystkich przypadkach skrzyżowanie wzrokowe było niesymetryczne. Pasma wzrokowe u 4 królików z odwarstwowaną siatkówką były bardzo znacznie zredukowane po stronie przeciwległej do nie-prawidłowego oka. U królika z hypoplastycznym nerwem wzrokowym, różnica pomiędzy obu pasmami była nieznaczna. Na skrawkach przez półkule widoczna była ponadto asymetria ciał kolankowatych bocznych i wzgórków górnych.

Badanie mikroskopowe

Tylko u jednego królika (Nr. 74/83) siatkówka miała zachowaną pra-widłową budowę warstwową. Jej wszystkie warstwy w porównaniu z nor-malną siatkówką były węższe (ryc. 2a,b) i wykazywały znacznie mniej-szą ilość elementów komórkowych i włóknistych. Zwracały uwagę dosyć znaczne ubytki komórek zwojowych. U pozostałych 4 królików badanie mikroskopowe potwierdziło odwarstwienie siatkówki w nieprawidłowej gałce ocznej wykazując równocześnie jej całkowitą przebudowę strukturalną. Zarys budowy warstwowej można było niekiedy rozpoznać tylko w pobliżu rąbka zębatego. Na pozostałym obszarze siatkówki widoczne były jedynie pasma tkanki o mniej lub bardziej gęsto ułożonych komór-kach o okrągłych lub owalnych, bogatochromatynowych jądrach i skąpej cytoplazmie. Pasma te wpuklały się wgłąb ciała szklonego, a w ich obrę-bie spotykano rozety i pseudorozety (ryc. 3), sporadycznie również ciała komórkowate (globoid bodies). U jednego królika widoczne były bardzo liczne, różnej wielkości, torbiele wypełnione homogenną kwasochłonną substancją.



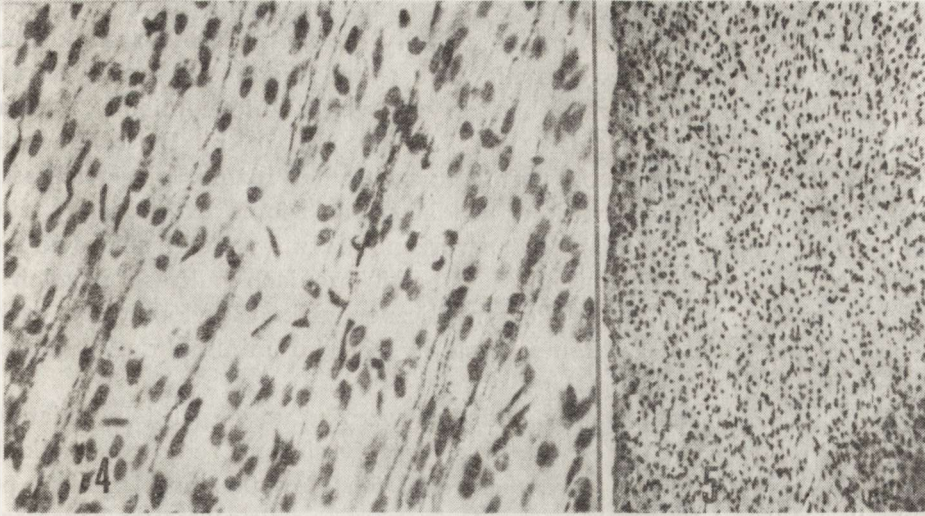
Ryc. 2a—2b. Królik nr 74/83. 2a — normalna siatkówka, 2b — siatkówka hipoplastyczna z zachowaną budową warstwową. Widoczne ubytki komórek zwojowych. H—E Pow. 200 ×

Fig. 2a—2b. Rabbit No 74/83. 2a — normal retina, 2b — hypoplastic retina with preserved laminar structure. Loss of ganglion cell is visible. H—E × 200

Ryc. 3. Królik nr 34/79. Fragment odwarstwionej siatkówki o całkowicie zatartej strukturze, widoczne rozety. H—E Pow. 200 ×

Fig. 3. Rabbit No 34/79. Fragment of detached retina. Complete obliteration of retinal structure and rosettes. H—E × 200

Odpowiednio do nasilenia uszkodzeń w siatkówce kształtował się obraz zmian w pozagałkowym odcinku nerwów wzrokowych po stronie macłocza. U 4 królików z odwarstwioną siatkówką były one prawie całkowicie pozbawione włókien nerwowych, a nieliczne zachowane wypustki osiowe wykazywały cechy zwyrodnienia i rozpadu (ryc. 4). Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi królikami, zależnych od wieku zwierząt. W barwieniach komórkowych we wszystkich przypadkach obserwowano wybitne zagęszczenie i nieregularny układ jąder glejowych (ryc. 5). W przypadku z hipoplastyczną siatkówką nerw wzrokowy po stronie uszkodzenia miał znacznie mniejszą ilość włókien wzrokowych. Włókna te wydawały się cieńsze i dosyć często wykazywały różne stadia zwyrodnienia i rozpadu, widoczne zarówno w preparatach barwionych na osłonki mielinowe, jak i impregnowanych srebrem. W jego obrębie stwierdzono niezbyt znaczne zagęszczenie gleju komórkowego bez istotnych zaburzeń w jego układzie.



Ryc. 4. Królik nr 139/83. W zanikłym nerwie wzrokowym widoczne pojedyncze włókna mielinowe o rozpadających się osłonkach. Klüver—Barrera. Pow. 400 ×
 Fig. 4. Rabbit No 139/83. Atrophic optic nerve with scanty myelinated fibres showing degenerative changes. Klüver—Barrera. × 400

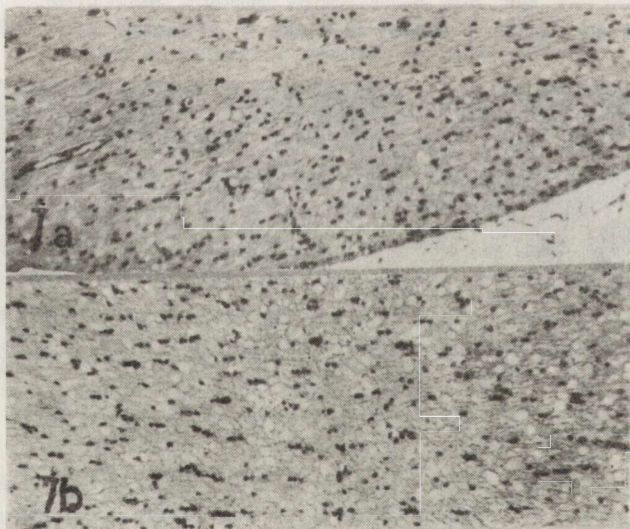
Ryc. 5. Ten sam królik. Fragment nerwu wzrokowego, tego samego co na ryc. 4. Zagęszczenie i nieregularny układ jąder komórkowych. H—E Pow. 100 ×
 Fig. 5. The same rabbit. Fragment of atrophic nerve with increased density and irregular arrangement of cellular nuclei. H—E × 100



Ryc. 6. Królik nr 127/74. Redukcja pasma wzrokowego po stronie przeciwległej do nieprawidłowej gałki ocznej. Heidenhain. Pow. lupowe.
 Fig. 6. Rabbit No 127/74. Reduced contralateral optic tract. Heidenhain. Magn. glass

U wszystkich królików z odwarstwowaną siatkówką pasma wzrokowe po stronie przeciwległej do małowocza były bardzo znacznie zredukowane (ryc. 6). Ich włókna nerwowe nie wykazywały uszkodzeń, a w obrazie komórkowym zwracał uwagę brak wyraźnych różnic pomiędzy normalnym i zredukowanym pasmem wzrokowym (ryc. 7a, b). U królika z hipoplastyczną siatkówką oba pasma nieznacznie różniły się wielkością i przy lupowej ocenie skrawków na dalszych poziomach (niekiedy) trudno było ustalić, które z nich jest utworzone przez wypustki nerwowe nieprawidłowej siatkówki. Natomiast w powiększeniach mikroskopowych w zredukowanym paśmie wzrokowym liczne włókna wykazywały cechy zwyrodnienia, a glejoza komórkowa była tylko minimalnie wzmożona (ryc. 8a,b).

Zmiany w podkorowych ośrodkach wzroku u wszystkich badanych królików miały podobny charakter. Wyrażały się one redukcją wielkości poszczególnych struktur jądrowych, a w ich obrębie zmniejszeniem populacji włókien i komórek nerwowych przy współistniejącym zagęszczeniu komórkowym oraz redukcją wielkości komórek nerwowych. Zmiany te były bardziej nasilone we wzgórkach górnych i ciałach kolankowatych bocznych niż w jądrach przednakrywkowych. Wyraźną różnicę w nasileniu uszkodzeń można było stwierdzić pomiędzy królikiem z zachowaną siatkówką i grupą pozostałych królików. W grupie tych ostatnich nie udało się wykazać różnic w nasileniu zmian, zależnych od czasu przeżycia zwierząt.



Ryc. 7a—7b. Królik nr 139/83. 7a — fragment zredukowanego pasma wzrokowego i 7b — normalnego pasma wzrokowego z drugiej półkuli mózgu. W obrazie komórkowym brak wyraźnych różnic. H—E Pow. 100 ×

Fig. 7a—7b. Rabbit No 139/83, 7a — fragment of reduced contralateral optic tract and 7b — normal optic tract from the second brain hemisphere. No essential differences in the density and arrangement of glial nuclei. H—E × 100



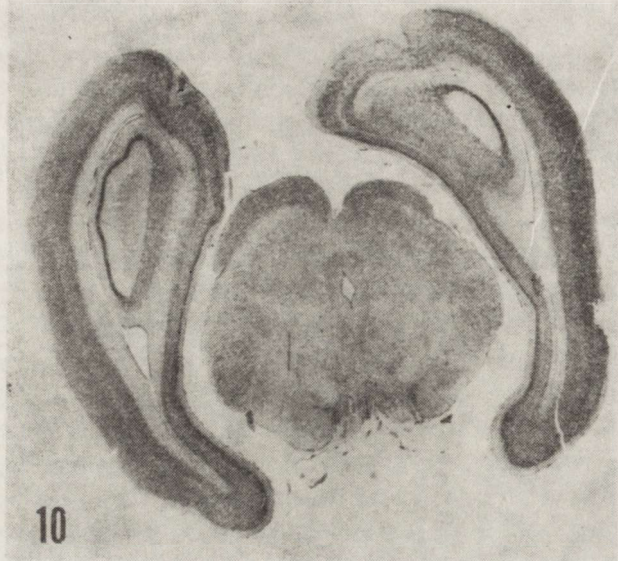
Ryc. 8a—8b. Królik nr 74/83. Pasma wzrokowe. 8a — normalne, 8b — nieznacznie zredukowane. Różnice w obrazie komórkowym prawie niewidoczne. H—E Pow. 100 ×

Fig. 8a—8b. Rabbit nr 74/83. Optic tracts. 8a — normal, 8b — contralateral to the hypoplastic optic nerve. Insignificant differences in H—E staining. × 100



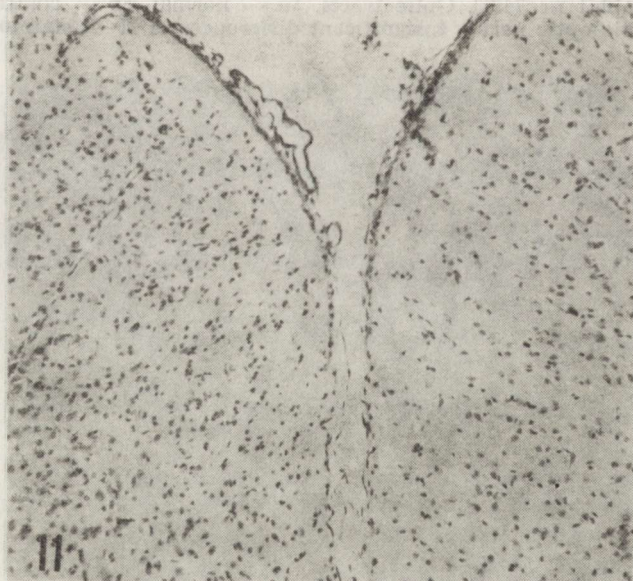
Ryc. 9. Królik nr 127/74. Jądro grzbietowe ciała kolankowatego bocznego po stronie przeciwległej do nieprawidłowej gałki ocznej wykazuje zaawansowany zanik. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe

Fig. 9. Rabbit No 127/74. Contralateral dorsal nucleus of the lateral geniculate body shows advanced atrophy. Cresyl violet. Magn. glass



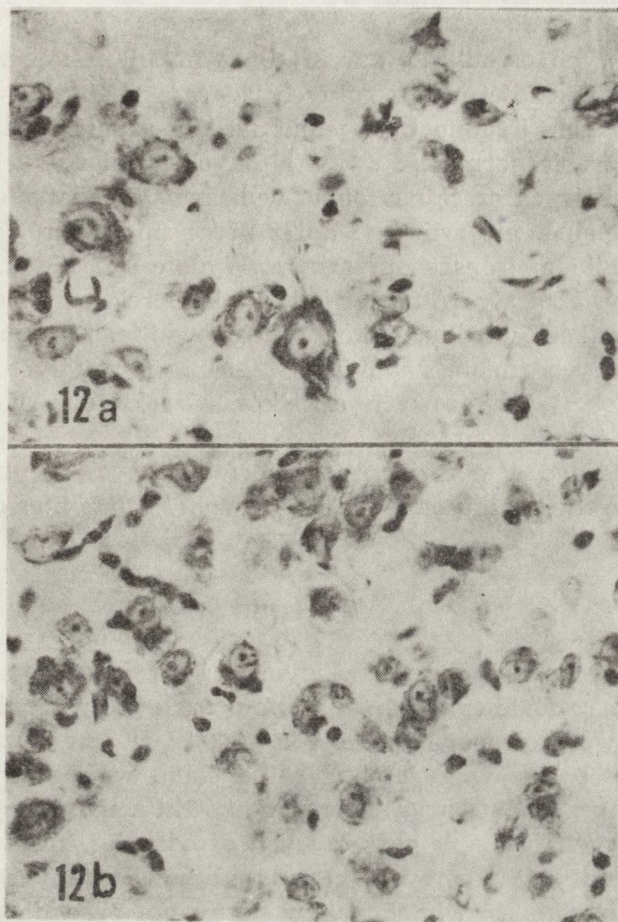
Ryc. 10. Królik nr 32/79. Zanik wzgórką górnego o znacznym nasileniu. Fiolet kre-
zylu. Pow. lupowe

Fig. 10. Rabbit No 32/79. Contralateral superior colliculus markedly reduced in size.
Cresyl violet. Magn. glass



Ryc. 11. Królik nr 139/83. Przyśrodkowa powierzchnia wzgórków górnych, po pra-
wej stronie ryciny prawidłowy, po lewej — uszkodzony, widoczne zwiężenie gór-
nych warstw i zagęszczenie komórkowe. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 11. Rabbit No 139/83. Medial surface of the two superior colliculi, on the
right — normal, on the left — atrophic, in which decreased size of the superficial
layers and increased cellular density is visible. Cresyl violet. × 100



Ryc. 12a—12b. Królik nr 32/79. Wzgórki górne. 12a — prawidłowy, 12b — po stronie przeciwległej do małowocza z widocznym zagęszczeniem komórek i zmniejszeniem wielkości neuronów. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×

Fig. 12a—12b. Rabbit No 32/79. Superior colliculi. 12a — normal, 12b — atrophic, with increased cellular density and reduction of nerve cells size. Cresyl violet. × 400

W ciałach kolankowatych bocznych jednostronny zanik obejmował przede wszystkim sektor alfa jądra grzbietowego, w którym znajduje zakończenia synaptyczne większość włókien siatkówkowo-kolankowatych. Jądro grzbietowe boczne u królików z odwarstwowaną siatkówką było o połowę mniejsze po stronie prawidłowej gałki ocznej od jądra grzbietowego bocznego po stronie małowocza (ryc. 9). Podobnie kształtowały się stosunki we wzgórkach górnych, z których jeden był jak gdyby zapadnięty (ryc. 10) w następstwie zmniejszenia szerokości jego trzech górnych warstw (*stratum zonale*, *stratum griseum superficiale* i *stratum opticum*) z towarzyszącym zagęszczeniem komórkowym i redukcją wielkości neuronów (ryc. 11 i ryc. 12a i b) oraz zmniejszeniem ilości włókien, szczególnie dobrze widocznym w pęczkach włókien w warstwie wzroko-

wej. U królika z małoczem i zachowaną siatkówką zmiany w odpowiednich podkorowych ośrodkach wzroku były mniej nasilone, zarówno w odniesieniu do wielkości poszczególnych jąder, jak i ubytku włókien i komórek nerwowych. Trudno było jednoznacznie ustalić różnice wielkości komórek w obrębie normalnie wykształconych i zmienionych jąder podkorowych, w których część neuronów wykazywała dodatkowo nieswoiste zmiany neuronalne, nie związane ani z procesem pt (królik bezobjawowy), ani z zanikiem transsynaptycznym. Wydaje się jednak, że i w tym przypadku występowały różnice wielkości komórek nerwowych w podkorowych ośrodkach wzroku. W korze wzrokowej tego królika nie stwierdzono uchwytnych zmian, natomiast w grupie pozostałych królików w obszarze projekcji podkorowych ośrodków wzroku obserwowano zubożenie włókien i zanik neuronów.

Nie stwierdzono w obrazie zmian morfologicznych w układzie wzrokowym istotnych różnic pomiędzy objawowymi i bezobjawowymi królikami pt.

OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych obserwacji wynika, że wrodzone małocze powoduje u królika rozległe zmiany patomorfologiczne we wszystkich strukturach układu wzrokowego. Mają one charakter wtórnych zaników, których nasilenie zależy w dużej mierze od stanu, w jakim znajduje się siatkówka. W przypadku zwyrodnienia siatkówki zmiany zarówno w drogach wzrokowych, jak i w podkorowych ośrodkach wzroku są znacznie bardziej nasilone niż w przypadku, gdy siatkówka jest zachowana, ale nie w takim stopniu rozwinięta jak w normalnej prawidłowo wykształconej gałce ocznej. W przypadku zaniku komórek zwojowych siatkówki ich wypustki osiowe ulegają zwyrodnieniu na całym ich przebiegu, to jest do jąder grzbietowych ciał kolankowatych bocznych i wzgórków górnych, z których neuronami tworzą one połączenia synaptyczne. Szybkość zwyrodnienia włókien wzrokowych po zniszczeniu ich komórek macierzystych, przebiegającego podobnie jak zwyrodnienie Wallera w odsiebnym odcinku przeciętego nerwu obwodowego, zależy przede wszystkim od wieku, w jakim nastąpiło uszkodzenie siatkówki. U dorosłych osobników proces rozpoczyna się później i ma znacznie wolniejszy przebieg niż w okresie rozwoju płodowego czy we wczesnym okresie po urodzeniu. W doświadczeniach na świnkach morskich, którym wyłuszczone jedną gałkę oczną pomiędzy 39—55 dniem życia płodowego, zwyrodnienie włókien nerwowych w nerwie wzrokowym i w pasmach wzrokowych obserwowano jeden dzień po zabiegu, a 4 dnia wszystkie włókna wykazywały cechy uszkodzenia (Hess 1958). Goldberg i wsp. (1983) po uszkodzeniu aksonów warstwy włókien nerwowych siatkówki 8-dniowej myszy stwierdzili wsteczne zwyrodnienie włókien pomiędzy 1—2 dniem po dokonaniu

zabiegu, podczas gdy u dorosłych osobników nie obserwowano zmian przed upływem 1—2 tygodni. Wender i wsp. (1981) pierwsze zmiany strukturalne w nerwie wzrokowym dorosłego królika, któremu usunięto jedną gałkę oczną, obserwowali dopiero w 4 dniu po operacji i podkreślali bardzo powolny przebieg procesu zwyrodnieniowego.

W naszym materiale u wszystkich królików, u których małowocze współistniało z całkowitym zwyrodnieniem i przebudową strukturalną siatkówki, w nerwie wzrokowym uszkodzonej gałki ocznej stwierdzono praktycznie całkowity zanik aksonów, ponieważ znajdowane pojedyncze włókna wzrokowe wykazywały również zaawansowane cechy zwyrodnienia. Można przypuszczać, że włókna te pochodziły z lepiej zachowanych bocznych części siatkówki, w obrębie której komórki zwojowe później uległy zwyrodnieniu, ale nie można też wykluczyć innego pochodzenia tych włókien. Na podstawie badania morfologicznego nie można ustalić w jakim okresie rozwoju pojawiło się odwarstwienie siatkówki, a przede wszystkim jakie struktury zdążyły osiągnąć włókna osiowe komórek zwojowych. Ma to istotne znaczenie, przede wszystkim przy ocenie zredukowanych pasm wzrokowych, w obrębie których nie stwierdzono istotnych zmian w obrazie komórkowym, w przeciwieństwie do nerwu wzrokowego po stronie uszkodzenia z wybitnym zagęszczeniem jąder glejowych. Nasuwało to przypuszczenie, że włókna wzrokowe nieprawidłowej gałki ocznej nie przekroczyły poziomu skrzyżowania wzrokowego. Z badań anatomicznych wiadomo, że pasmo wzrokowe u królika w 90—95% jest utworzone przez włókna skrzyżowane, a projekcja włókien nieskrzyżowanych nie przekracza 5—10% włókien, przy czym liczba nieskrzyżowanych włókien jest większa u królików pigmentowanych niż u albinotycznych (Giolli, Guthrie 1969, Sanderson 1975). Z kolei badania doświadczalne wykazały, że po jednostronnym usunięciu gałki ocznej występuje reorganizacja topograficzna włókien wzrokowych zachowanej siatkówki (Ng, Stone 1982). W okresie histogenezy nadprodukcja neuronów i włókien nerwowych jest normalnym zjawiskiem (Jeffery, Perry 1982, Lam i wsp. 1982, Young 1984). Istotną rolę w ustaleniu ostatecznej liczby neuronów odgrywa eliminacja tych komórek, które nie uzyskały połączeń synaptycznych (Young 1984). Sengelaub i Finlay (1981) wykazali, że jednostronne uszkodzenie siatkówki bezpośrednio po urodzeniu hamuje redukcję neuronów w siatkówce drugiego oka. Z kolei Shirokava i wsp. (1983) stwierdzili po jednostronnym usunięciu gałki ocznej u szczura w pierwszym dniu po urodzeniu reorganizację strukturalną w obu pasmach wzrokowych w postaci zmniejszenia liczby włókien skrzyżowanych po stronie uszkodzenia i podobnego rzędu wzrost liczby włókien nieskrzyżowanych po przeciwnej stronie.

W badanym materiale nie można ustalić bez pomiarów morfometrycznych, jak układał się w pasmach wzrokowych stosunek ilościowy włókien skrzyżowanych i nieskrzyżowanych u poszczególnych królików. Lund

i Bunt (1976) wykazali, że włókna wzrokowe siatkówki szczura osiągają poziom skrzyżowania pomiędzy 14—15 dniem życia płodowego (ciąża u szczura trwa 21 dni). Nie udało się nam znaleźć w dostępnym piśmiennictwie tego typu danych dla królika. Należy przypuszczać, że sekwencje czasowe w rozwoju dróg wzrokowych u królika układają się podobnie z przesunięciami proporcjonalnymi do dłuższego czasu trwania ciąży u tego zwierzęcia (30—31 dni). Przy ocenie różnicy wielkości obu pasm wzrokowych u naszych królików z odwarstwowaną siatkówką, wydawało się, że ta różnica nie jest w pełni adekwatna do nasilenia zmian w nerwie wzrokowym. Mogła się ona zmniejszyć lub ulec prawie całkowitemu wyrównaniu, jak to miało miejsce u królika z hipoplastycznym nerwem wzrokowym, poprzez zwiększenie projekcji nieskrzyżowanych włókien wzrokowych z siatkówki drugiej gałki ocznej.

Zmiany w topograficznej organizacji włókien siatkówki wykazano doświadczalnie również w ciałach kolankowatych bocznych i we wzgórkach górnych. U królika do jąder grzbietowych ciał kolankowatych bocznych, a zwłaszcza do wzgórków górnych dochodzą w większości włókna skrzyżowane. Reprezentacja nieskrzyżowanych włókien siatkówki jest bardzo mała i zajmuje określone obszary tych struktur (Giolli, Guthrie 1969). Chow i wsp. (1973) po usunięciu jednej gałki ocznej noworodkom króliczym stwierdzili nieskrzyżowane włókna siatkówki w tych obszarach wzgórków górnych, które są normalnie unerwione wyłącznie przez włókna skrzyżowane. Podobne obserwacje poczyniono u myszy (Godement i wsp. 1980), u szczura (Land, Lund 1979; Jen, Lund 1981) i u chomików (So, Schneider 1978), u których równocześnie wykazano, że nieprawidłowa projekcja włókien jest tym większa im wcześniej po urodzeniu usunięto gałkę oczną. Podobne zaburzenia w układzie włókien So i wsp. (1984) stwierdzili w jądrach grzbietowych ciał kolankowatych bocznych u chomików po usunięciu jednej gałki ocznej we wczesnym okresie życia. W interpretacji tego zjawiska przyjmuje się między innymi możliwość zaburzeń w procesie segregacji włókien, które w początkowym okresie są przemieszane i zajmują cały obszar jądra. W trakcie dalszego rozwoju włókna, które znajdują się w nieprawidłowym położeniu ulegają zwyrodnieniu, co w efekcie prowadzi do powstania takiej organizacji strukturalnej, jaka charakteryzuje dorosłe osobniki danego gatunku (So i wsp. 1984). Przyjmuje się również możliwość zmiany kierunku wzrostu aksonów lub wytworzenia dodatkowych połączeń (So, Schneider 1978). Można przypuszczać, że w podkorowych ośrodkach wzroku u naszych królików występują podobne nieprawidłowości. Zastosowane przez nas metody wykluczają jednak rozstrzygnięcie tego problemu.

Jednostronny zanik jąder grzbietowych ciał kolankowatych bocznych i wzgórków górnych w półkuli mózgu przeciwległej do uszkodzenia stanowi klasyczny wykładnik zwyrodnienia transsynaptycznego i jest dobrze znany zarówno w spontanicznej patologii ludzkiej, jak i z materiału

doświadczalnego. Jest to szczególna postać zaniku, który rozwija się w strukturach pozbawionych jedyne go lub podstawowego źródła impulsacji synaptycznej. Mechanizm patogenetyczny zaniku transsynaptycznego nie jest ostatecznie wyjaśniony. Z badań doświadczalnych wiadomo, że dynamika rozwoju i nasilenie zmian transsynaptycznych są zróżnicowane w zależności od gatunku zwierzęcia i struktury anatomicznej, a przede wszystkim od wieku, w jakim nastąpiło uszkodzenie (Cowan 1970). Przyczyny różnic gatunkowych i topograficznych w rozwoju zwyrodnień transsynaptycznych są nieustalone. Wiadomo natomiast, że uszkodzenia wczesnego okresu życia (przed- i po urodzeniu) powodują znacznie bardziej nasilone i wcześniej ujawniające się zmiany transsynaptyczne (Cowan 1970). Doświadczalnie udowodnił to m.in. Guillery (1972) badając ciała kolankowate boczne po jednostronnym wyłuszczeniu gałki ocznej dorosłym kotom i 7—9 dniowym noworodkom.

Proces zwyrodnienia transsynaptycznego znajduje dwa podstawowe wykładniki morfologiczne: zanik komórek nerwowych, który prowadzi do obkurczenia komórki i zwyrodnienie neuronów, prowadzące do śmierci komórki. To drugie zjawisko jest szczególnie charakterystyczne dla uszkodzeń transsynaptycznych powstających w okresie rozwoju. Chow i Spear (1974) w 4 miesiące po usunięciu gałki ocznej u noworodka królika wykazali zmniejszenie obszaru jąder grzbietowych ciał kolankowatych bocznych do około połowy normalnej wielkości, a powierzchni przekroju komórek nerwowych — do 26,6%. Drastyczne zmniejszenie populacji komórek nerwowych w strukturach odnerwionych w okresie ich rozwoju i różnicowania nie jest jednoznacznie interpretowane. Oprócz zwyrodnienia, przyjmuje się również możliwość zahamowania rozplemu komórek.

Redukcja wielkości komórek nerwowych w procesie zaniku transsynaptycznego w okresie rozwoju ma inny charakter niż u dorosłych osobników. Cullen i Kaiserman-Abramof (1976) oraz Sugita i Otani (1983) uważają, że zmniejszenie wielkości neuronów w strukturach odnerwionych wkrótce po urodzeniu nie jest wykładnikiem transsynaptycznego zaniku, a wiąże się z zahamowaniem wzrostu i dojrzewania tych komórek, które dla osiągnięcia pełnej dojrzałości muszą mieć wykształcone normalne połączenia synaptyczne. Wczesny rozwój ciał kolankowatych bocznych u mutantów myszy pozbawionych od urodzenia obu gałek ocznych, nerwów i pasm wzrokowych przebiegał normalnie, pomimo braku połączeń siatkówkowo-kolankowatych (Cullen, Kaiserman-Abramof 1976) i dopiero w późniejszym okresie ujawniło się zmniejszenie populacji komórkowej. Wymienieni autorzy prowadząc równoległe badania na normalnych myszach, u których bezpośrednio po urodzeniu usunięto gałkę oczną, stwierdzili większy ubytek neuronów w jądrach grzbietowych ciał kolankowatych bocznych u zwierząt operowanych niż u mutantów, a więc większe nasilenie uszkodzeń po odnerwieniu niż przy wrodzonym braku

aferentnych włókien. Wydaje się, że u naszych królików z odwarstwioną siatkówką ostateczny obraz zmian w podkorowych ośrodkach wzroku został ukształtowany zarówno przez zwyrodnienie neuronów tych struktur, jak i zahamowanie ich rozwoju.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ВСЛЕДСТВИЕ ВРОЖДЕННОГО МИКРОФТАЛЬМА У ЛАБОРАТОРНОГО КРОЛИКА

Резюме

Представлены neuropathологические изменения в зрительной системе у 5 кроликов происходящих из стада рт (брат и сестра, 3 спорадические случаи) у которых в возрасте 12—14 дней констатировано асимметрию глазных яблок. Во всех случаях микрофтальма сопутствовали добавочные аномалии разных структур глазного яблока. Кролики были в возрасте 3 4 и 7 месяцев умерщвлены методом чрезсердечной перфузии раствором формалина. Для исследования авторы брали оба глазные яблока вместе со зрительным нервом и блоки через полушария головного мозга на высоте зрительного перекреста зрительных путей боковых колеччатых тел прететрагенных ядер и зрительной коры а также средний мозг с верхним четверохолмием. Парафиновые срезы были крашены рутинными гистологическими методами.

В одном случае констатировано гипоплазию сетчатки с сохраненной нормальной цитологической картиной у остальных 4 кроликов — отслойку сетчатки с ее полной структурной перестройкой. В этих случаях констатировано в зрительном нерве почти полную атрофию нервных волокон. В дальнейших отрезках зрительного пути по противоположной стороне по отношению к микрофтальму присутствовали вероятно только нескрещенные волокна происходящие из здоровой сетчатки второго глаза. У кролика с сохраненной сетчаткой зрительный нерв был тоньше зато дальнейшие отрезки зрительного пути проявляли значительно меньшие различия. В подкорковых зрительных центрах по стороне противоположной по отношению к микрофтальму авторы наблюдали сокращение величины отдельных ядер вследствие уменьшения количества нервных волокон и уменьшения количества и величины нейронов. Эти изменения выступающие с разной интенсивностью в отдельных ядрах и в отдельных случаях имеют характер трансинаптической атрофии. Сокращение величины нейронов может быть вызвано заторможением их развития.

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE VISUAL SYSTEM OF THE LABORATORY RABBIT WITH CONGENITAL UNILATERAL MICROPTHALMIA

Summary

The paper presents neuropathological characteristics of the visual system in 5 rabbits in which at the age of 10—12 days decrease of one eyeball was discovered. In all cases globe abnormality was associated with additional abnormalities of the other ocular structures. Rabbits were sacrificed by intracardiac formalin perfusion at the end of third, fourth and seventh month of age. In every case both eyeballs, optic nerves and brain slices on the level of optic chiasm, optic tracts, lateral geniculate nuclei, pretectal nuclei, superior colliculi and visual cortex were taken for microscopic study. Paraffin-embedded sections were stained with routine histological methods.

In one rabbit hypoplastic retina was of normal cytological appearance. Histological examination revealed in 4 microphthalmic eyes congenital detachment of

the retina with complete dizorganization of the retinal architecture. In these cases nerve fibres in the ipsilateral optic nerves were totally lacking and contralateral optic tracts were markedly reduced possessing only ipsilateral optic nerve fibres. In the rabbit with hypoplastic retina optic nerve was thinner, but contralateral optic tract was only slightly reduced. Contralateral visual centres were reduced in size due to the decreased amount of nerve fibres and to the decreased population of nerve cells. The preserved neurons had diminished cell bodies. The abnormalities varied in degree in individual visual structures and in particular cases according to severity of retinal changes. The possible factors acting in the development of morphological changes in the visual system in congenital microphthalmia are discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Chow K. L., Spear P. D.: Morphological and functional effects of visual deprivation on the rabbit visual system. *Exp. Neurol.*, 1974, 42, 429—447.
2. Chow K. L., Mathers L. H., Spear P. D.: Spreading of uncrossed retinal projection in superior colliculus of neonatally enucleated rabbits. *J. comp. Neurol.*, 1973, 151, 307—322.
3. Cowan W. M.: Anterograde and retrograde transneuronal degeneration in the central and peripheral nervous system. W: *Contemporary research methods in neuroanatomy*. Red.: W. J. H. Nauta, S. O. E. Ebbesson. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1970, 217—251.
4. Cullen M. J., Kaiserman-Abramof I. R.: Cytological organization of the dorsal geniculate nuclei in mutant anophthalmic and postnatally enucleated mice. *J. Neurocytol.*, 1976, 5, 407—424.
5. Giolli R. A., Guthrie M. D.: The primary optic projections in the rabbit. An experimental degeneration study. *J. comp. Neurol.*, 1969, 136, 99—126.
6. Godement P., Saillour P., Imbert M.: The ipsilateral optic pathway to the dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus in mice with prenatal or postnatal loss of one eye. *J. comp. Neurol.*, 1980, 190, 611—626.
7. Goldberg S., Frank B., Krayanek S.: Axon end-bulb swelling and rapid retrograde degeneration after retinal lesions in young animals. *Exp. Neurol.*, 1983, 79, 753—762.
8. Guillery R. W.: Quantitative studies of transneuronal atrophy in the dorsal lateral geniculate nucleus of cats and kittens. *J. comp. Neurol.*, 1972, 149, 423—438.
9. Hess A.: Optic centres and pathways after eye removal in fetal guinea pigs. *J. comp. Neurol.*, 1958, 109, 91—115.
10. Jeffery G., Perry H. V.: Evidence for ganglion cell death during development of the ipsilateral projection in the rat. *Develop. Brain Res.*, 1982, 2, 176—180.
11. Jen L. S., Lund R. D.: Experimentally induced enlargement of the uncrossed pathway in rat. *Brain Res.*, 1981, 211, 33—57.
12. Jub K. V. F., Kennedy P. C.: *Pathology of domestic animals*. Academic Press, New York-London 1963, V. 2, 427—493.
13. Kircher Ch. H.: *Pathology of the eye*. W: *Pathology of laboratory animals*. Red. K. Benirschke, F. M. Garner, T. C. Jones, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1978, V. 1, 640—662.
14. Kobayashi K., Otani K.: Morphogenesis of the hereditary microphthalmia in a new strain of rat. *J. Morphol.*, 1981, 167, 265—276.
15. Lam K., Sefton A. J., Bennet M. R.: Loss of axons from optic nerve of the rat during early postnatal development. *Develop. Brain Res.*, 1982, 3, 487—491.

16. Lund R. D., Bunt A. H.: Prenatal development of central optic pathways in albino rats. *J. comp. Neurol.*, 1976, 165, 247—264.
17. Ng A. Y. K., Stone J.: The optic nerve of the cat: appearance and loss of axons during normal development. *Develop. Brain Res.*, 1982, 5, 263—271.
18. Sanderson K. J.: Retinogeniculate projections in the rabbits of the albino allelomorph series. *J. comp. Neurol.*, 1975, 159, 15—28.
19. Sengelaub D. R., Finlay B. L.: Early removal of one eye reduces normally occurring cell death in the remaining eye. *Science*, 1981, 213, 573—574.
20. Shirokawa T., Fukuda Y., Sugimoto T.: Bilateral reorganization of the rat optic tract following enucleation of one eye at birth. *Exp. Brain Res.*, 1983, 51, 172—178.
21. So K. F., Schneider G. E.: Abnormal recrossing retinotectal projections after early lesions in syrian hamster: age-related affects. *Brain Res.*, 1978, 147, 277—295.
22. So K. F., Woo H. H., Jen L. S.: The normal and abnormal postnatal development of retinogeniculate projections in golden hamster: an anterograde horseradish peroxidase study tracing. *Develop. Brain Res.*, 1984, 12, 191—205.
23. Young P. W.: Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. comp. Neurol.*, 1984, 229, 362—373.
24. Wender M., Kozik M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Goncerzewicz A.: Wallerian degeneration of the optic nerve in light of histological and biochemical studies. W: *Experimental and clinical neuropathology*. Red. K. Jellinger, F. Gullota, M. Mossakowski, Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1981, 36—39.

Adres autorów: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej CMDiK PAN, ul. Warszawska 126, 05-300 Mińsk Maz.

Lech Iwanowski: Ultrastructure of brain capillaries in young rabbits treated with cyclophosphamide	557
Józef Szczech, Antoni Godlewski: Effect of BCNU given to pregnant female rats on neuroglia morphology and histochemistry in the progeny	565
Irmina B. Zelman, Jan Sawicki: Pathomorphological changes in the visual system of laboratory rabbit with congenital unilateral microphthalmia	585

СОДЕРЖАНИЕ

Павел М. Грохович: Аллогенный трансплантат периферического нерва	455
Юдыта Орендачова, Микуляш Хавко, Анна Ферчакова, Дарина Ключова Мартин Бона, Юзеф Маршала: Ультраструктура гранулезной внутриплазматической сеточки и встроение ¹⁶ C-лейцина в спинномозговые узлы собаки в ушемии. Ультраструктурные и биохимические исследования	465
Рышард Плюта: Влияние простаглицлина на изменения основных физиологических параметров в полной ишемии головного мозга	475
Мирослав Ян Моссаковский, Роман Гадамски: Влияние индометацина на ишемическое повреждение сектора СА ² аммонова рога у монгольских хомяков	493
Павел П. Либерски, Велислав Папез, Януш Альвасяк: Ультраструктура болезни Крейцфельдта—Якова с пластинками и с фибриллярной дегенерацией. I. Невритические пластинки	507
Павел П. Либерски, Януш Альвасяк, Велислав Папез: Ультраструктура случая болезни Крейцфельдта—Якова с пластинками и фибриллярной дегенерацией. II. Фибриллярные изменения образованные из двойных геликальных филаментов	521
Лех Ивановски, Зофия Чеховска, Марек Сельчак: Анализ невропатологических изменений в центральной нервной системе у 51 лица которые были лечены и умерли по поводу гиперпластических заболеваний кроветворной системы	531
Барбара Гайковска, Тереса Э. Бугера, Мечислав Сьмялэк: Ультраструктура миелина в центральной нервной системе крыс после отравления ацетатом кобальта	545
Лех Ивановски: Влияние цифклофосаида на ультраструктуру капилляров головного мозга молодого кролика	557
Юзеф Шех, Антони Годлевски: Влияние кармустина вводимого беременным самкам крысы на морфологию и гистохимию нейроглии у потомства	565
Ирмина Зельман, Ян Савицки: Морфологические изменения в зрительной системе вследствие врожденного одностороннего микрофтальма у лабораторного кролика	585

SPIS TREŚCI

Paweł M. Grochowicz: Allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego	455
Judita Orendáčová, Mikuláš Chavko, Anna Ferčáková, Darina Kluchová, Martin Bona, Jozef Maršala: Ultrastruktura ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i wbudowywanie ¹⁴ C-leucyny w zwojach rdzeniowych psa w niedokrwieniu	465
Ryszard Pluta: Wpływ prostacykliny na zmiany podstawowych parametrów fizjologicznych w całkowitym niedokrwieniu mózgowia	475
Mirosław J. Mossakowski, Roman Gadamski: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia sektora CA ₁ rogu Amona u chomików mongolskich	493
Paweł P. Liberski, Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak: Ultrastruktura przypadku choroby Creutzfeldta—Jakoba z płytkami i zwyrodnieniem włókiennkowym. I. Płytki neurytyczne	507
Paweł P. Liberski, Janusz Alwasiak, Wielisław Papierz: Ultrastruktura przypadku choroby Creutzfeldta—Jakoba z płytkami i zwyrodnieniem włókiennkowym. II. Zmiany włókiennkowe utworzone z podwójnych helikalnych filamentów	521
Lech Iwanowski, Zofia Czechowska, Marek Sielczak: Analiza zmian neuropatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym u 51 osób leczonych i zmarłych z powodu rozrostowych schorzeń układu krwiotwórczego	531
Barbara Gajkowska, Teresa E. Bugera, Mieczysław Śmiałek: Ultrastruktura mieliny w ośrodkowym układzie nerwowym szczura po zatruciu octanem kobaltowym	545
Lech Iwanowski: Wpływ cyklofosfamidu na ultrastrukturę kapilarów mózgu młodego królika	557
Józef Szczech, Antoni Godlewski: Wpływ BCNU podawanego ciężarnym samicom szczura na morfologię i histochemię neurogleu u potomstwa	565
Irmina B. Zelman, Jan Sawicki: Zmiany morfologiczne w układzie wzrokowym królika laboratoryjnego w następstwie wrodzonego jednostronnego małocza	585

CONTENTS

Paweł M. Grochowicz: Peripheral nerve allograft	455
Judita Orendáčová, Mikuláš Chavko, Anna Ferčáková, Darina Kluchová, Martin Bona, Jozef Maršala: The fine structure of granular endoplasmic reticulum in neurons and ¹⁴ C-leucine incorporation into proteins in spinal ganglia of dog after ischemia	465
Ryszard Pluta: Influence of prostacyclin on the changes in basic physiological parameters in complete cerebral ischemia	475
Mirosław J. Mossakowski, Roman Gadamski: Influence of indomethacin on ischemic alterations of the CA ₁ sector of Ammon's horn in mongolian gerbils	493
Paweł P. Liberski, Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak: Brain fine structure in Creutzfeldt—Jakob disease with plaques and tangles. I. Neuritic plaques	507
Paweł P. Liberski, Janusz Alwasiak, Wielisław Papierz: Brain fine structure in Creutzfeldt—Jakob disease with plaques and tangles. II. Neurofibrillary tangles composed of paired helical filaments	521
Lech Iwanowski, Zofia Czechowska, Marek Sielczak: Analysis of neuropathological changes in the central nervous system of 51 patients who died from proliferative hematological diseases	531
Barbara Gajkowska, Teresa E. Bugera, Mieczysław Śmiałek: Ultrastructural studies on myelin of the central nervous system following cobaltous acetate intoxication in the rat	545