

*Dr. Laska - Rowalska eqz 2*

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 24

1986

ZESZYT 1

---

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

<http://rcin.org.pl>



# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 24

1986

ZESZYT 1

## KOMITET REDAKCYJNY

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

## PRZY 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, 49-70-18

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1986.  
Nakład: 570 egz. Objętość ark. wyd. 8,90, ark. druk. 8,50, ark.  
A<sub>1</sub> - 11. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, B-1. Oddano do składania  
1985-11-11. Podpisano do druku 1986-04-25. Druk ukończono w maju  
1986. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3493/85 J-11 Cena zł 150,—



KRYSTYNA RENKAWEK

## DOŚWIADCZALNY MODEL CHOROBY PARKINSONA WYWOŁANY N-METYLO-4-FENYLO-1,2,3,6-TETRAHYDROPIRYDYNA (MPTP)

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Idiopatyczna choroba Parkinsona i zespół parkinsonowski mają dokładnie określone cechy kliniczne oraz obraz zaburzeń metabolicznych i strukturalnych w ośrodkowym układzie nerwowym (Schwab, England 1968; Selby 1968). Wiadomo, że charakterystyczny zespół objawów ze strony układu pozapiramidowego u chorych powstaje w wyniku uszkodzenia i zaniku dopaminergicznych komórek nerwowych istoty czarnej (Calne, Langston 1983). Pomimo znanego obrazu uszkodzeń morfologicznych i związanych z nimi zaburzeń metabolicznych, przyczyna zwyrodnienia komórek istoty czarnej nie jest znana. Trudne lub często niemożliwe jest wytłumaczenie znacznego zróżnicowania obrazu klinicznego choroby u poszczególnych pacjentów, jak również różnej reakcji na substytucyjne leczenie preparatami L-dopy.

Dlatego też w poznaniu przyczyny choroby Parkinsona istotne znaczenie mają badania nad substancjami chemicznymi o charakterze neurotoksyn, powodującymi swoiste bądź wybiórcze uszkodzenia w niektórych, ściśle określonych strukturach anatomicznych układu nerwowego lub uszkodzającymi poszczególne typy komórek nerwowych. Taką substancją neurotoksyyczną wywołującą u ludzi i zwierząt doświadczalnych objawy parkinsonizmu jest N-metylo-4-fenylo-1,2,3,6-tetrahydropirydyna (MPTP), jak również inne analogi metylopirydyny (Langston i wsp. 1983). Pierwszy opis MPTP podali Ziering i wsp. w 1947 r., natomiast jej działanie jako wybiórczej neurotoksyny wykryto przypadkowo po zażyciu MPTP przez młodych ludzi w celu uzyskania efektu narkotycznego (Davis i wsp. 1979; Langston i wsp. 1983).

MPTP wprowadzona do ustroju zwierząt doświadczalnych, głównie małp i myszy, wywołuje szereg objawów zespołu parkinsonowskiego, między innymi takich jak sztywność, akinezja i drżenie. Objawy te, uzyskane u małp nawet po podaniu bardzo małych dawek neurotoksyny odpowiadają w znacznym stopniu obrazowi klinicznemu choroby Parkinsona



u ludzi (szczegółowe zestawienie objawów klinicznych podano w pracy Burnsa i wsp. 1983). Zatrutowane zwierzęta stawały się akinetyczne, a już po 4 dniach podawania MPTP zachodziła konieczność ich sztucznego karmienia. W badaniach biochemicznych na tych zwierzętach stwierdzono, że w 10—11 dniu po zaprzestaniu doświadczenia wychwyty egzogennej dopaminy i poziom endogennej dopaminy były znacznie obniżone, bądź też zerowe. W obrazie histologicznym występował natomiast zanik komórek nerwowych istoty czarnej (Heikkilä i wsp. 1984; Langston i wsp. 1984).

Zmiany strukturalne i objawy kliniczne choroby Parkinsona po zastosowaniu MPTP wykazują zależność od wielokrotności dawki i czasu obserwacji po wprowadzeniu neurotoksyny. Pełny, rozwinięty obraz choroby u zwierząt otrzymuje się po stosowaniu dawki wielokrotnej i po dłuższym niż kilka dni okresie przeżycia po doświadczeniu (Langston 1985). Współzależność obrazu klinicznego od długości czasu działania substancji występuje również u ludzi. W obrazie klinicznym można wyróżnić kolejne okresy choroby od postaci ostrej poprzez podostrą do przewlekłej fazy choroby mającej swój odpowiednik w zaburzeniach funkcji różnych neuroprzebiegów, nie tylko dopaminy. Langston (1985) omawiając zebrany materiał kliniczny i doświadczalny wysuwa przypuszczenie, że utrzymujący się przez długi okres po zaprzestaniu podawania MPTP, zespół objawów parkinsonizmu mógłby być tłumaczony utrwalonym niedoborem dopaminy, podobnie jak przewlekły parkinsonizm u ludzi jest wyrazem przewlekłego stanu hipodopaminergicznego.

Zespół zaburzeń czynnościowych znajduje swój pełny odpowiednik w badaniach neuropatologicznych prowadzonych po różnie długich okresach działania MPTP u poszczególnych gatunków zwierząt. Obserwacje neuropatologiczne wykazały, że MPTP powoduje wybiórcze zwyrodnienie i zanik dopaminergicznych komórek nerwowych części zbitej istoty czarnej oraz utratę dopaminergicznej inervacji w strukturach z nią czynnościowo powiązanych, takich jak jądro ogoniaste i skorupa (Burns i wsp. 1983; Heikkilä i wsp. 1984; Langston i wsp. 1984; Wallace i wsp. 1984; Fuller, Steranka 1985). Uszkodzenie komórek wydaje się swoiste dla neuronów dopaminergicznych istoty czarnej; neurony noradrenergiczne i serotoninerne nie są bowiem uszkodzone (Heikkilä i wsp. 1984). Na podkreślenie zasługuje fakt, iż neurotoksyczne działanie substancji charakteryzuje się wybiórczym uszkodzeniem istoty czarnej i jej połączeń ze skorupą, podczas gdy jej neurony związane z układem limbicznym, mające również charakter komórek dopaminergicznych, nie ulegają zmianom (Chíueh i wsp. 1985).

Nasilenie i rozległość uszkodzeń morfologicznych zależne są od gatunku zwierząt, w znacznie mniejszym natomiast stopniu od dawki MPTP (Johannessen i wsp. 1985). Substancja jest wysoce toksyczna dla człowieka i dla małp. U małp, bardzo małe jej dawki w granicach 300 µg na



kg masy ciała wywołują rozległe zniszczenie wyżej wymienionych struktur, znajdujące potwierdzenie w wynikach badań biochemicznych (Burns i wsp. 1983). Znacznie wyższe dawki, dochodzące do 30 mg na kg masy ciała wywołują mniej nasilone zmiany u myszy (Heikkila i wsp. 1984). U innych gatunków zwierząt takich jak szczur, kot i świnka morska nawet znacznie zwiększone dawki MPTP nie prowadzą do wystąpienia zmian, bądź też stwierdzone uszkodzenia histologiczne są minimalne (Chiueh i wsp. 1984; Johannessen i wsp. 1985). Różnice gatunkowe są najprawdopodobniej związane z różną liczbą miejsc wiązania MPTP w komórkach istoty czarnej i jądra ogoniastego u poszczególnych gatunków zwierząt (Javitch i wsp. 1984).

W ostatnich latach zainteresowanie MPTP — substancją chemiczną spełniającą wszystkie kryteria neurotoksyny — jest szczególnie wielkie, ponieważ przypuszcza się, że wyjaśnienie mechanizmu jej uszkodzającego działania mogłoby wyjaśnić mechanizm zwyrodnienia i zaniku komórek istoty czarnej w idiopatycznej chorobie Parkinsona u ludzi.

Mechanizm cytotoksycznego działania MPTP nie jest znany. Dokładniejsze badania nad strukturą związku i związaną z nią toksycznością wykazały, że substancją chemiczną bezpośrednio uszkodzającą dopaminergiczne neurony istoty czarnej i ich połączenie z prążkowiec jest, nie jak pierwotnie sądzono MPTP, ale jej utleniony metabolit — N-metylo-4-fenylopirydyna ( $MPP^+$ ); forma zredukowana MPP jest nieczynna (Markey i wsp. 1984; Heikkila i wsp. 1985). MPTP jest związkiem nietrwałym, ulegającym szybkiej przemianie do  $MPP^+$  we wszystkich tkankach ustroju z wyjątkiem oka (Langston i wsp. 1984; Markey i wsp. 1984). Badania *in vitro* wykazały, że przemiana ta zachodzi w mitochondriach mózgu zwierząt (Markey i wsp. 1984; Castagnoli i wsp. 1985).

W kolejnych pracach doświadczalnych starano się wyjaśnić swoisty mechanizm działania MPTP. Okazało się, że MPTP metabolizowana jest przy udziale monoaminooksydazy (MAO). Analogi MPTP, nie będące substratem dla MAO nie są toksyczne dla komórek nerwowych istoty czarnej. Zaobserwowano ponadto, że neurotoksyczny efekt MPTP u małp i myszy nie występuje przy równoczesnym zastosowaniu inhibitorów MAO takich, jak pargylina czy deprenil (Langston i wsp. 1984; Cohen, Mytilineou 1985; Heikkila i wsp. 1985; Irvin, Langston 1985). Zjawisko to jest następstwem zahamowania metabolizmu MPTP i powstawania jej toksycznego metabolitu jakim jest  $MPP^+$ . Badania te wskazują na kluczową rolę monoaminooksydazy (MAO) w patogenezie choroby Parkinsona. Uzasadniało to również hipotezę, że w chorobie Parkinsona, podobnie jak stwierdzono to w badaniach doświadczalnych u zwierząt przy użyciu MPTP, MAO może uaktywniać chemiczne substancje endogenne o znacznej neurotoksyczności dla komórek dopaminergicznych istoty czarnej (Fuller, Hemrick-Luecke 1982; Parson, Rainbow 1984).

W dalszych badaniach biochemicznych stwierdzono, że przemiana



MPTP do  $MPP^+$  katalizowana jest jedynie przez monoaminooksydazę typu B (MAO-B). Wskazują na to obserwacje nad wpływem na przemianę MPTP do  $MPP^+$  u zwierząt inhibitorów MAO-A i MAO-B. Wykazano w nich, że jedynie inhibitory MAO-B, takie jak deprenil i pargyлина, a także AGN 1135, podane zwierzętom doświadczalnym przed zastosowaniem MPTP hamowały zarówno jej przejście do  $MPP^+$ , jak również skutecznie zapobiegały neurotoksycznemu działaniu MPTP na dopaminergiczne neurony istoty czarnej (Langston i wsp. 1984a). Zjawiska tego nie obserwowano przy użyciu klogyliny, stanowiącej wybiórczy inhibitor MAO-A (Heikkila i wsp. 1985). Inhibitory MAO-B nie wywierają działania osłaniającego przy użyciu innych substancji neurotoksycznych uszkadzających dopaminergiczne neurony istoty czarnej. Stosowanie pargyliny pozostawało bez wpływu w stosunku do uszkodzeń wywołanych przy użyciu metamfetaminy i 6-hydroksydopaminy (Jarvis, Wagner 1985).

Ochronne działanie inhibitorów MAO-B w stosunku do neurotoksycznego efektu MPTP tłumaczone jest w dwojaki sposób. Według Langstona i wsp. (1984) oraz Parsona i Rainbowa (1984) — hamują one produkcję metabolitów MPTP, wytwarzanych przy udziale MAO, a wykazujących toksyczne właściwości w stosunku do neuronów dopaminergicznych. Cohen (1983) wysuwa natomiast przypuszczenie, iż rolę podstawowego czynnika uszkadzającego miałyby odgrywać reakcje wolnorodnikowe towarzyszące oksydatywnej dezaminacji dopaminy przy udziale MAO. Wzrost ilości nadtlenu wodoru towarzyszący temu procesowi miałyby powodować gwałtowne starzenie się neuronów dopaminergicznych. Jest faktem powszechnie znanym, że wolne rodniki są odpowiedzialne za ciężkie uszkodzenia i rozpad komórek w wielu układach, nie tylko dopaminergicznych. W konkluzji swojego wywodu Cohen (1983) stwierdza, iż uszkodzenie komórek istoty czarnej wywołane przez MPTP może być następstwem zarówno wzrostu ilości produktów autooksydacji dopaminy, jak i przede wszystkim działania wolnych rodników. Należy mieć jednak na uwadze, że mimo niewątpliwego stwierdzenia, iż przemianie MPTP do  $MPP^+$  towarzyszą reakcje wolnorodnikowe, to ich produkty powstają również w tkankach nieuszkodzonych. Nie można więc na tej drodze wyjaśnić selektywnych uszkodzeń występujących u ludzi w chorobie Parkinsona i u zwierząt doświadczalnych przy stosowaniu MPTP.

W poszukiwaniu mechanizmów wyjaśniających wybiórczość uszkadzającego działania MPTP zwrócono uwagę na różnice ilościowe nagromadzenia MPTP i jej metabolitów w poszczególnych okolicach ośrodkowego układu nerwowego, stwierdzając iż ich najwyższe stężenie występuje właśnie w istocie czarnej (Langston i wsp. 1984; Irvin, Langston 1985). Komórki nerwowe istoty czarnej nie tylko wychwytyują MPTP, lecz również magazynują  $MPP^+$ . Struktura jonowa czynnej substancji  $MPP^+$  nie pozwala bowiem na jej przejście przez błonę komórkową. W prążkowie  $MPP^+$  zlokalizowana jest przede wszystkim w zakończe-



niach nerwowych włókien pochodzących z istoty czarnej. Możliwe jest, że metabolit ten powstaje miejscowo, lub też przenoszony jest drogą przepływu aksonalnego z perykarionów komórek dopaminergicznych części zbitnej istoty czarnej. W przypadku jego produkcji w zakończeniach dopaminergicznych, wydaje się prawdopodobny jego transport wsteczny do perykarionów komórek macierzystych. Kumulacja neurotoksyny transportowanej z zakończeń nerwowych i wytwarzanej w perykarionach komórkowych prowadziłyby do osiągnięcia przez nią stężenia prowadzącego do zniszczenia komórek nerwowych istoty czarnej. Należy przy tym podkreślić, że przy równoczesnym podawaniu pargyliny poziom MPTP spadał we wszystkich strukturach ośrodkowego układu nerwowego z wyjątkiem istoty czarnej (Irvin, Langston 1985).

Nagromadzenie produktów utleniania MPTP w istocie czarnej nasuwa przypuszczenie o powinowactwie MPTP do melaniny, a zwłaszcza neuromelaniny. Sugestia, iż obecność melaniny w komórkach nerwowych może mieć znaczenie dla neurotoksycznego działania MPTP wydaje się jednak wątpliwa w świetle braku uszkodzeń zawierających melaninę neuronów brzusznej części nakrywki śródmózgowia (Marsden 1983). Z drugiej strony stwierdzono, iż nadnercza nie zawierające melaniny gromadzą znaczne ilości MPP<sup>+</sup> (Lyden i wsp. 1983).

Badania prowadzone na organotypowych hodowlach tkankowych śródmózgowia przyniosły cenne uzupełnienie i potwierdzenie spostrzeżeń uzyskanych w doświadczeniach na zwierzętach. W prawidłowo utrzymanej tkance eksplantaty śródmózgowia pobranego od zarodków szczura charakteryzują się występowaniem neuronów dopaminergicznych, możliwością wychwytu i gromadzenia egzogennej dopaminy, obecnością endogennej dopaminy oraz gromadzeniem kwasu homowanilinowego w wyniku przemiany dopaminy.

Analogiczne hodowle poddane działaniu MPTP przez okres od 1 do 7 dni nie wykazywały wyraźnych uszkodzeń tkankowych poza wybiórczym zniszczeniem ciał komórkowych neuronów dopaminergicznych oraz ich wypustek wyrastających z eksplantatu. Zmianom morfologicznym w tym samym przedziale czasowym towarzyszyła utrata zdolności wychwytu egzogennej dopaminy, nasilona zwłaszcza po dłuższym i wielokrotnym podawaniu MPTP. Neurotoksyczny efekt MPTP, podobnie jak w doświadczeniach *in vivo* znoszony był przez inhibitory MAO-B: pargylinę i deprenil (Mytilineou, Cohen 1984; Cohen, Mytilineou 1985).

Przedstawione powyżej wyniki badań doświadczalnych prowadzonych zarówno *in vivo*, jak i *in vitro* wskazują na niewątpliwy wybiórczy efekt MPTP w stosunku do dopaminergicznych neuronów istoty czarnej. Występowanie zaburzeń patofizjologicznych, metabolicznych i strukturalnych składających się na zespół parkinsonowski po jej wprowadzeniu do ustroju wskazuje, iż stosowanie MPTP stanowi korzystny model do badań nad patogenezą idiopatycznej choroby Parkinsona u ludzi.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА, ВЫЗВАННОЙ  
N-МЕТИЛО-4-ФЕНИЛО-1,2,3,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНОМ (МРТР)

Резюме

Приводятся данные из литературы на тему экспериментальной модели болезни Паркинсона, вызванной у животных N-метило-4-фенило-1,2,3,6-тетрагидропиридином. Этот нейротоксин вызывает клинические симптомы болезни Паркинсона путем селективных повреждений дофаминергических нейронов чёрного вещества. В работе представлен тоже предполагаемый механизм невропатологических изменений, хотя точная причина возникновения этого синдрома пока что остается неясной.

EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE INDUCED BY  
N-METHYL-4-PHENYL-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE (MPTP)

Summary

Data concerning Parkinson's disease induced by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in men and experimental animals were reviewed. Neurotoxin induces a damage to substantia nigra dopaminergic neurons. The mechanism of neuropathological changes is discussed although the exact pathogenesis of lesions is still unknown.

PIŚMIENNICTWO

1. Burns R. S., Chiueh C. C., Markey S. P., Ebert M. H., Jacobowitz D. M., Kopin I. J.: A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1, 2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 1983, 80, 4546—4550.
2. Castagnoli N., Chiba J. K., Trevor A. J.: Potential bioactivation for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci.*, 1985, 36, 225—230.
3. Chiueh C. C., Markey S. P., Burns R. S., Johannessen J. N., Pert A., Kopin I. J.: Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Europ. J. Pharmacol.*, 1984, 100, 189—194.
4. Chiueh C. C., Burns R. S., Markey S. P., Jacobowitz D. M., Kopin I. J.: Primate model of parkinsonism: selective lesion of nigrostriatal neurons by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine produces an extrapyramidal syndrome in Rhesus monkeys. *Life Sci.*, 1985, 36, 213—218.
5. Cohen G.: The pathobiology of Parkinson's disease. *Biochemical aspects of dopamine neuron senescence. J. Neural Transmiss.* 1983, Supl., 19, 89—103.
6. Cohen G., Mytilineou C.: Studies on the mechanism of action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci.*, 1985, 36, 237—242.
7. Calne D. B., Langston J. W.: Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet*, 1983, 1457—1459.
8. Davis G. C., Williams A. C., Markey S. P., Ebert M. H., Caine E. D., Reichart



- C. M., Kopin I. J.: Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of mepiridine analogues. *Psychiat. Res.*, 1979, 1, 249—254.
9. Fuller R. W., Hemrick-Luecke S. K.: Further studies on the long term depletion of striatal dopamine in iprindole-treated rats by amphetamine. *Neuropharmacol.*, 1982, 21, 433—438.
  10. Fuller R. W., Steranka L. R.: Central and peripheral catecholamine depletion by 1-methyl-4-phenyl-tetrahydropyridine (MPTP) in rodents. *Life Sci.*, 1985, 36, 243—247.
  11. Heikkila R. E., Hess A., Duvoisin R. C.: Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, 1984, 224, 1451—1453.
  12. Heikkila R. E., Hess A., Duvoisin R. C.: Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci.*, 1985, 36, 231—236.
  13. Irvin I., Langston J. W.: Selective accumulation of MPP<sup>+</sup> in the substantia nigra: a key to neurotoxicity? *Life Sci.*, 1985, 36, 207—212.
  14. Jarvis M. F., Wagner G. C.: Neurochemical and functional consequences following 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) and methamphetamine. *Life Sci.*, 1985, 36, 249—254.
  15. Javitch J. A., Uhl G. R., Snyder S. H.: Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: characterization and localization of receptor binding sites in rat and human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 4591—4595.
  16. Johannessen J. N., Chiueh C. C., Burns R. S., Markey S. P.: Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.*, 1985, 36, 219—224.
  17. Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I.: Chronic parkinsonism in humans due to a product of mepiridine analog synthesis. *Science*, 1983, 219, 979—980.
  18. Langston J. W., Irwin I., Langston E. B., Forno L. S.: 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neuroscience Lett.*, 1984, 48, 87—92.
  19. Langston J. W., Irwin I., Langston E. B.: Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science*, 1984 a, 225, 1480—1482.
  20. Langston J. W.: MPTP neurotoxicity: an overview and characterization of phases of toxicity. *Life Sci.*, 1985, 36, 201—206.
  21. Lyden A., Bondesson U., Larsson R. S., Lindquist N. G.: Melanine affinity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine, an inducer of chronic parkinsonism in humans. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1983, 53, 429—432.
  22. Marsden C. D.: Neuromelanin and Parkinson's disease. *J. Neural Trans.* 1983, Supl., 19, 121—141.
  23. Markey S. P., Johannessen C. C., Chiueh C. C., Burns R. S., Kerkenham M. A.: Intraneuronal generation of a pyridinium metabolic may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*, 1984, 311, 464—467.
  24. Mytilineou C., Cohen G.: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine destroys, dopamine neurons in explants of rat embryo mesencephalon. *Science*, 1984, 225, 529—531.
  25. Parsons B., Rainbow T. C.: High-affinity binding sites for <sup>3</sup>H MPTP may correspond to monoamine oxidase. *Europ. J. Pharmacol.*, 1984, 102, 375—377.
  26. Selby G.: Parkinson's disease. W: Handbook of Clinical Neurology. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn, North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1968, 6, 173—213.
  27. Schwab S., England A. C.: Parkinson syndromes due to various specific causes.



- W: Handbook of Clinical Neurology. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn, North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1968, 6, 227—248.
28. Wallace R. A., Boldry R., Schmittgen T., Miller D., Uretsky N.: Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on monoamine neurotransmitters in mouse brain and heart. *Life Sci.*, 1984, 35, 285—291.
29. Ziering A., Berger L., Heineman S. D., Lee J.: Piperidine derivatives. Part III. 4-Arylpiperidines. *J. Organ. Chem.*, 1947, 12, 894—903.

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



ILIA VICTOROV, NATALIA SHASKOVA, ELŻBIETA KIDA,  
KRYSZYNA RENKAWEK, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

## MATURATION OF DOPAMINERGIC NEURONS IN DISSOCIATED CULTURES OF MOUSE SUBSTANTIA NIGRA

Laboratory of Nerve Tissue Culture, Brain Research Institute, Moscow, USSR  
Department of Neuropathology, Medical Research Centre of PASci, Warsaw

Organotypic and dissociated types of tissue cultures are widely used for study of the development and neurochemical differentiation of dopaminergic neurons of substantia nigra. Several recent publications have shown that embryonic neurons of substantia nigra taken from mouse embryos could successfully develop *in vitro* up to the stage of morphological and neurochemical maturity (Sclumpf et al. 1977; Prochiantz et al. 1979; Berger et al. 1982). However, at an early stage after explantation *in vitro* the substantia nigra neurons did not show fluorescence reactivity of endogenous dopamine while, at the same time catecholamine uptake was taking place. The absence of fluorescence of endogenous catecholamine did not allow to trace the dopamine content in substantia nigra in the early stage of neuron culture under the experimental conditions. In the preliminary report Victorov and Shashkova (1984) reported that dissociated cultures of substantia nigra taken from 18–19-day-old fetuses showed fluorescence of dopaminergic character from the beginning of explantation.

The purpose of the present study was to investigate the following steps of development and differentiation of dopaminergic neurons *in vitro* during 2 weeks under culture conditions.

### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on 18–19-day-old mouse embryos (C 57 Bl/6J). The explants of substantia nigra were dissected under microscopic control from the rostral mesencephalon and cut into small pieces (1 × 1 mm). The tissue fragments were transferred to 0.25% trypsin in calcium- and magnesium-free balanced salt solution (BSS)



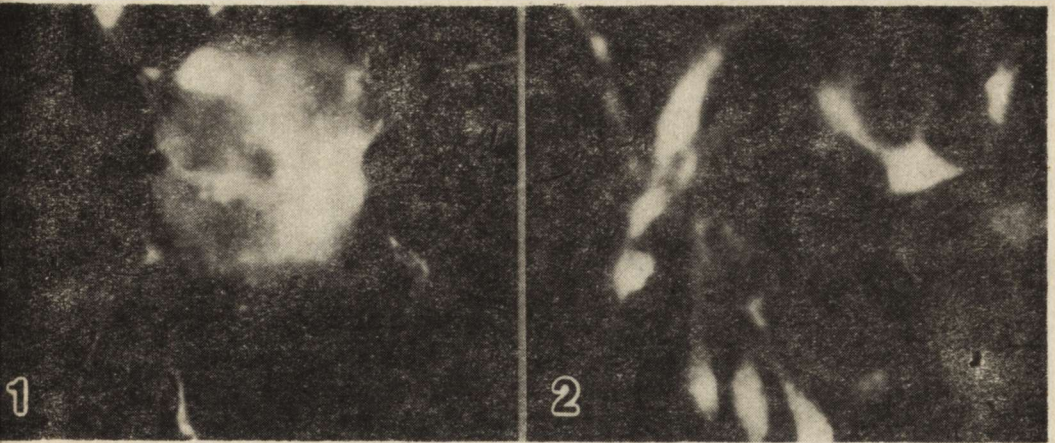
for 10 minutes at 37°C and then carefully rinsed in the following solutions: first in BSS and later in a mixture of equal parts of Simms solution, minimal essential medium (MEM) and fetal calf serum (FCS). Afterwards, the tissue fragments were mechanically dispersed in complete culture medium by brisk flushing through a fine bore pipette. The complete culture medium consisted of: 15% heat-inactivated FCS, 15% human placental serum, 50% MEM and 20% Simms solution, supplemented with 4 mM of glutamine, 600 mg% of glucose and 0.2 U/ml of insulin. The cell suspensions were centrifuged (3000 g) for 1 minute and resuspended in complete culture medium. The number of cells in the suspensions counted in a hemocytometer was  $1.5 \times 10^6$ /ml. One drop of the suspension was plated on a glass coverslip coated with collagen, placed in Maximow assembly and incubated at 36°C. The nutrient medium was changed every 3rd day. The cultures were grown for periods up to 14 days *in vitro* (DIV).

From 2 DIV part of the cultures was processed for fluorescence histochemistry. A modification of the glyoxylic acid technique was used (Victorov, Szaszkowa 1984). The culture medium was removed and replaced by medium containing pargyline chlorhydrate  $10^{-4}$  M for 15–20 minutes at 37°C. The cultures were then fixed by dipping the coverslips for 5–7 minutes at 2°C in a mixture of 2% glyoxylic acid and 1% paraformaldehyde in a solution containing (in g/l): NaCl 8.0, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.005, NaHCO<sub>3</sub> 1.0, KCl 0.2, MgCl<sub>2</sub> 5.0, sucrose 66.9, pH 6.7–6.9. After drying in a warm air stream the cultures were exposed to 80°C for 5 minutes. The coverslips were then mounted on glass slides with Entellan and observed with a UV microscope.

## RESULTS

Under the light microscope, the process of cell aggregation was initiated very early and could be observed during the first hours *in vitro*, although the aggregates were still rather small, consisting of few cells only. Gradually, the number of cells forming the aggregates increased and the process of aggregates adhesion to the collagen-coated glass coverslips proceeded. From the 2 DIV, two types of cell aggregates could be distinguished: the flat ones and the spherical ones. Both of them exhibited different patterns of neuronal process outgrowth. In the flat aggregates, the neuronal processes outgrowing ahead in a linear manner, were accompanied by a rapid and extensive glial migration and formed together with glial processes thick, intermingled bundles of fibers dividing into numerous branches at a certain distance from the aggregate margins. In the spherical type of aggregates, the neuronal processes surrounded radially the aggregates, emerging as isolated, thin fibers with



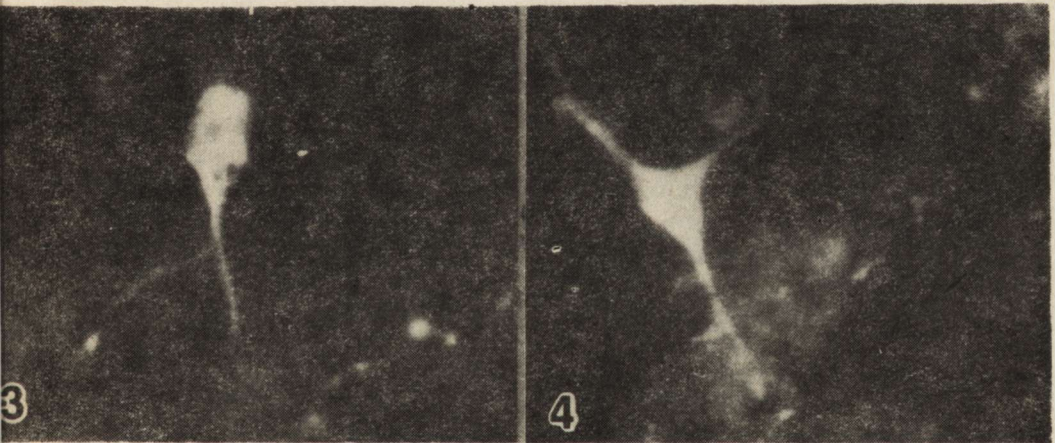


*Fig. 1.* Aggregate with single, highly fluorescent dopaminergic cell and fine, thin fibers around the edges of the aggregate. 3 DIV.  $\times$  225

*Ryc. 1.* Skupienie komórek z pojedynczym neuronem dopaminergicznym, wykazującym silną fluorescencję oraz delikatnymi, cienkimi włóknami na brzegu agregatu. 3 dni *in vitro*. Pow. 225  $\times$

*Fig. 2.* A group of dopaminergic neurons in an aggregate. 5 DIV.  $\times$  225

*Ryc. 2.* Grupa komórek dopaminergicznych zgromadzonych w pojedynczym skupieniu. 5 dni *in vitro*. Pow. 225  $\times$



*Fig. 3.* Bipolar neuron showing strong fluorescent reaction. 3 DIV.  $\times$  225

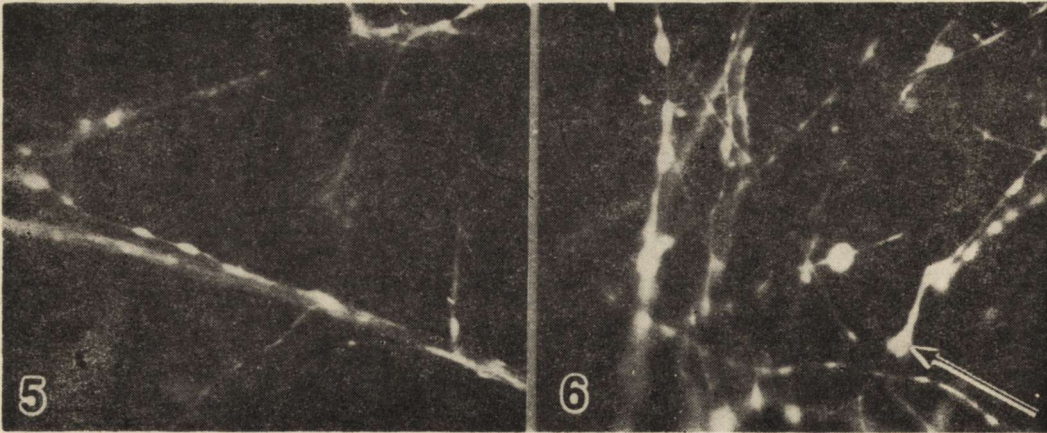
*Ryc. 3.* Dwubiegunowy neuron dopaminergiczny, wykazujący silną fluorescencję. 3 dni *in vitro*. Pow. 225  $\times$

*Fig. 4.* Multipolar neuron revealing fluorescent reaction. 5 DIV.  $\times$  225

*Ryc. 4.* Wielobiegunowy neuron dopaminergiczny z silną fluorescencją. 5 dni *in vitro*. Pow. 225  $\times$

characteristic swelling along their long axis. At the same time, delicate neuro-glial bridges appeared between the neighbouring aggregates. From the second week *in vitro* part of the neuronal processes started to de-





*Fig. 5.* Thin neuronal process with typical varicosities. 5 DIV.  $\times 225$   
*Ryc. 5.* Cienka wypustka nerwowa z paciorkowatym zarysem, 5 dni *in vitro*. Pow. 225  $\times$

*Fig. 6.* Numerous neuronal processes with varicosities along their long axis and characteristic growth cones (arrow). 5 DIV.  $\times 225$   
*Ryc. 6.* Liczne wypustki nerwowe z paciorkowatym zarysem i charakterystycznymi stożkami wzrostowymi (strzałka). 5 dni *in vitro*. Pow. 225  $\times$

generate and disrupt into small, spherical fragments. The persisting fibers were grouped into bundles and branched into delicate processes forming axon terminals. Around the flat aggregates very extensive glial migration could be seen leading to formation of a glial monolayer. Glial cells migration from the spherical aggregates was significantly less pronounced.

Fluorescence histochemistry performed on the 3, 5, 6 and 7 DIV confirmed the presence of two different patterns of aggregates outgrowth. Neurons exhibiting bright green fluorescence of the cell cytoplasm and processes seen from the 3 DIV were only sporadically present in the flat aggregates, always as single cells (Fig. 1). In the spherical aggregates they were more numerous and formed clusters of cells (Fig. 2). They were observed rarely also outside the aggregates. The neurons visible in the youngest cultures were poorly differentiated, rather small and bipolar (Fig. 3). During further observation *in vitro*, larger, multipolar, highly fluorescent cells with brightly green processes and characteristic varicosities along their axis could be recognized (Fig. 4). Two types of the cell processes could be distinguished: thinner ones with typical varicosities, probably representing axons, and shorter processes, also exhibiting distinct green fluorescence with all probability corresponding to dendrites (Fig. 5).

Fluorescence histochemistry revealed that only part of the fibers observed in the light microscope were of dopaminergic nature. Most of



them outgrew from the spherical aggregates and only few, forming neuro-glial bundles, from the flat aggregates. In older cultures some of these processes contained more complex terminals with typical growth cones revealing delicate, filopodial processes (Fig. 6). There was no difference in fluorescence properties between neuronal fibers from both types of cell aggregates.

#### DISCUSSION

It results from our observations that mouse embryos aged between 18—19 days *in utero* from which substantia nigra was taken for a dissociated type of cultures exhibited the presence of neurons positive for dopamine. This feature observed *in vitro* allowed to use the cultures both for study of dopaminergic neurons maturation as well as of their properties in experimental conditions.

Our results are different from the maturation of dopaminergic neurons previously observed by Prochiantz et al. (1979) and Berger et al. (1982). These discrepancies might be connected with the different mouse strains used for tissue culture. After our observations of substantia nigra *in vitro* we also suggest that most important for dopaminergic fluorescence of substantia nigra neurons is the age of the embryos taken for tissue culture. Our results did not confirm that dopaminergic fluorescence appears after 3 weeks of substantia nigra maintenance *in vitro*. In our cultures the neurons which were dopamine-positive showed, moreover, some typical features of catecholaminergic cells described both *in situ* (Björklund, Lindvall 1975) and *in vitro* (Berger et al. 1982). At the beginning of culture most of the positive neurons were of bipolar type. On the following days the neurons had most numerous processes, representing branching dendrites, growth cones and axons. During further morphological development and differentiation *in vitro* numerous varicosities along the axons and dendrites appeared. All these structures revealed positive fluorescence of dopaminergic nature. Similar fluorescence in these structures was observed in cultures after 3 weeks *in vitro* by other authors (Berger et al. 1982). This fluorescence is commonly observed in all kinds of nerve cells processes and does not seem to be confined to axons of dopaminergic cells as observed by Summers et al. (1983). Fluorescence was observed both in spherical and flat types of the aggregates. There were no differences in the fluorescence reaction between accumulated and dispersed cells and their processes. Most intensive fluorescence observed by Levitt et al. (1976) at the edges of the aggregates was not noted by us. To summarize our results it is expected that cultures of both one or more weeks *in vitro* can serve as a good model for the studies on neurotoxin action on the substantia nigra.



## DOJRZEWANIE DOPAMINERGICZNYCH NEURONÓW ISTOTY CZARNEJ W HODOWLI TKANKOWEJ TYPU ZDYSOCJOWANEGO

### Streszczenie

W zdysocjowanych hodowlach tkankowych istoty czarnej, pobranej z 18–19 dniowych zarodków mysich stwierdzono obecność fluorescencji swoistej dla dopaminy w licznych wypustkach komórek nerwowych. W przeciwieństwie do opisów innych autorów, występowała ona już we wczesnych stadiach hodowli i dotyczyła zarówno wypustek osiowych, jak i dendrytów. Stwierdzano ją również w perykariach neuronów zgromadzonych zarówno w płaskich, jak i kulistych skupień komórkowych. Autorzy sugerują, że obecność odczynu fluorescencyjnego, swoistego dla dopaminy, już we wczesnej fazie hodowli zależy może od odrębności szczepowej użytych do doświadczeń zwierząt. Uzyskane wyniki wskazują, iż uzyskany typ hodowli stanowić może dobry model do oceny wpływu swoistych neurotoksyn na dopaminergiczne neurony istoty czarnej.

## РОСТ ДОФАМИНЕРГИЧЕСКИХ НЕВРОНОВ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА В ДИССОЦИИРОВАННОЙ ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

### Резюме

В диссоциированных тканевых культурах чёрного вещества взятого от 18–19-дневных эмбрионов мышей была установлена во многих отросках нейронов флюоресценция, специфическая для дофамина. В противоположность данным, полученным другими авторами она появлялась уже в ранних стадиях культуры охватывая так аксоны как и дендриты. Она была заметна тоже в телах нейронов скопленных так в плоских как и в шарообразных группах тканей. Авторы предполагают что специфическая для дофамина реакция флюоресценции уже в ранних стадиях культуры может зависеть от штаммовой особенности экспериментальных животных. Результаты исследований показывают, что полученный тип культуры можно считать хорошей моделью оценки воздействия специфических невротоксин на дофаминергические нейроны чёрного вещества.

### REFERENCES

1. Berger B., Di Porzio U., Daguët M. C., Gay M., Vigny A., Glowinski J., Prochiantz A.: Long-term development of mesencephalic dopaminergic neurons of mouse embryos in dissociated primary cultures: morphological and histochemical characteristics. *Neuroscience*, 1982, 7, 193–205.
2. Björklund A., Lindvall O.: Dopamine in dendrites of substantia nigra neurons: suggestions for a role in dendritic terminals. *Brain Res.*, 1975, 83, 531–537.
3. Levitt P., Moore R. Y., Garber B. B.: Selective cell association of catecholamine neurons in brain aggregates in vitro. *Brain Res.*, 1976, 111, 311–320.
4. Prochiantz A., Di Porzio U., Kato A., Berger B., Glowinski J.: In vitro maturation of mesencephalic dopaminergic neurons from mouse embryos is enhanced in presence of their striatal target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, 76, 5387–5391.
5. Schlumpf M., Shoemaker W. J., Bloom F. E.: Explant cultures of catecholami-



ne-containing neurons from rat brain. Biochemical, histofluorescence and electron microscopic study. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, 74, 4471—4475.

6. Summers C., Phillips M. I., Raizada M. K.: Rat brain cells in primary culture: visualization and measurement of catecholamines. *Brain Res.*, 1983, 264, 267—275.
7. Victorov I. V., Shashkova N. A.: Development of dopaminergic neurons in dissociated cultures of substantia nigra of mouse embryos. *Bull. Exp. biol. med.*, (USSR) 1984, 12, 129—131.



## DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

18 stycznia 1985 r. doc. dr hab. med. Stefan Zarski, kierownik Kliniki Neurologicznej Instytutu Reumatologii w Warszawie został mianowany przez Radę Państwa profesorem nadzwyczajnym.

25 IV 1985 r. Rada Państwa nadała tytuły naukowe profesorów zwyczajnych następującym osobom:

— prof. dr. med. plk. Piotrowi Kozłowskiemu, kierownikowi Zakładu Neuro-radiologii Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie,

— prof. dr. med. Jerzemu Łebkowskiemu, kierownikowi Kliniki Neurochirurgii w Białymstoku.

28 października 1985 r. Rada Państwa nadała tytuły naukowe profesorów nadzwyczajnych następującym osobom:

— doc. dr hab. med. Annie Członkowskiej, kierownikowi II Kliniki Neurologicznej Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie,

— doc. dr. hab. med. Cezaremu Fryze, kierownikowi Kliniki Neurologicznej Pomorskiej AM w Szczecinie.

\*

Nagrodę Państwową II stopnia w zakresie nauk medycznych uzyskał prof. dr hab. Witold Karczewski z CMDiK PAN w Warszawie za cykl prac nad nerwowymi mechanizmami oddychania.

Nagrodę Państwową II stopnia w zakresie nauk biologicznych otrzymał zespół w składzie: prof. dr hab. Bogusław Żernicki, dr Małgorzata Kossut, dr Jolanta Skan-giel-Kramaska, dr Andrzej Michalski i prof. dr hab. Stella Niemierko z Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego za prace nad mechanizmami percepcji wzrokowej.

\*

14 września 1984 r. przy okazji XII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Neurologicznego w Szczecinie odbyło się Walne Zgromadzenie Delegatów PTN, na którym dokonano wyboru władz Towarzystwa na następną kadencję, w następującym składzie:

Prezes — prof. T. Domżał,

V-prezesi — prof. A. Prusiński, dr med. O. Kossowski,

Sekretarze — prof. H. Jędrzejowska, prof. H. Chmielewski,

Skarbnik — dr med. S. Horski-Horończyk,

Redaktor Naczelny „Neurologii i Neurochirurgii Polskiej” — prof. J. Kulczycki,

Przewodnicząca Komisji do Spraw Kontaktów z Zagranicą

— prof. I. Hausmanowa-Petrusewicz.

Komisja Nauki:

Przewodniczący — prof. M. Wender,

Członkowie: prof. C. Fryze, — doc. W. Kawiak, — prof. J. Kulczycki.

Członkowie Zarządu Głównego: — doc. S. Banach, — prof. J. Czochońska, — doc. M. Filipowicz, — prof. E. Jankowicz, — doc. R. Mazur, — prof. H. Nielubowiczowa.

W czasie Zjazdu została wręczona po raz pierwszy Nagroda Naukowa im. J. Babińskiego. Otrzymała ją doc. Anna Fidziańska za badania nad miogenezą oraz miopatiami wrodzonymi.

W XII Zjeździe PTN uczestniczyli 9 gości zagranicznych z ZSRR, USA, Włoch, NRD, Bułgarii i Węgier. Honorowym gościem Zjazdu był Przewodniczący Światowej Federacji Neurologicznej prof. R. L. Masland z Nowego Jorku.

Walne Zgromadzenie nadało godności członków honorowych PTN sześciu wybitnym neurologom zagranicznym. Są nimi:

cd. na s. 28



ELŻBIETA KIDA, KRYSZYNA RENKAWEK

EFFECT OF SERUM AND CEREBROSPINAL FLUID OF PATIENTS  
WITH PARKINSON'S DISEASE ON THE ULTRASTRUCTURAL  
PROPERTIES OF RAT STRIATUM *IN VITRO*

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

The etiology of Parkinson's disease remains unknown. Among many etiological hypotheses two seem to be worth attention: genetically determined predisposition to the disease and the role of viral infection (Duvoisin 1982). Neuropathological studies showed selective involvement of certain neuronal populations in the central nervous system, representing systemic degeneration of monoamine neurons (Ohama, Ikuta 1976). It may also be supposed that degeneration of neurons reflects secondary aggravation of changes occurring as part of the "normal process of aging" in relation to the cytotoxic effect of dopamine metabolism and melanin accumulation (Mann, Yates 1982).

Immunological investigations have revealed that in the sera of patients with Parkinson's disease (PD) antibodies against cells of the particular structures of the nervous system are present (Husby et al. 1977; Emile et al. 1980). These findings prompted us to examine the influence of sera from patients with PD on the structure of rat striatum *in vitro*. Tissue culture technique permit to observe the direct, primary effect of tested compounds on selected structures of the nervous system. Basing on the fact of disturbed function of the cholinergic system in Parkinson's disease (Rinne et al. 1973; Reisine et al. 1977; Ruberg et al. 1982), the activity of acetylcholinesterase was investigated.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures were prepared from newborn rat striatum (Wistar). The striatum was cut under sterile conditions into parasagittal 1—2 mm sections, explanted on collagen-coated round coverslips and maintained at 36.5°C in Maximow assemblies.



Nutrient medium, renewed twice weekly, consisted of 40% human serum, 50% Earle's solution pH 7.1—7.2, 10% embryo saline extract, glucose in a final concentration of 600 mg% and penicillin 100 units/ml medium.

Two experimental groups of cultures were examined. In the first group the human serum from healthy individuals was replaced by the same quantity of serum from patients with Parkinson's disease. Sera from 6 different patients with PD were studied separately. Control cultures were grown in standard medium.

The second group of cultures was exposed to media containing cerebrospinal fluid (CSF) from patients with PD added to the standard medium to the final concentration of 20%. Samples of CSF received from 3 different PD patients were used in experiments. Control cultures were grown in media containing, instead of CSF from PD patients, the same quantity of CSF from patients with other neurological diseases (CSF from patients with stroke and ischialgia were used).

After 7 and 14 days *in vitro* the cultures were examined under the light microscope and then for electron microscopy the tissue samples were processed by fixation in cold 1.5% glutaraldehyde for 1/2 h. The tissues were rinsed in cacodylate buffer pH 7.2 for 1 h and postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer pH 7.2. After dehydration, the cultures were embedded in Epon 812, cut on an ultramicrotome, counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEM 100B electron microscope at 80 kV.

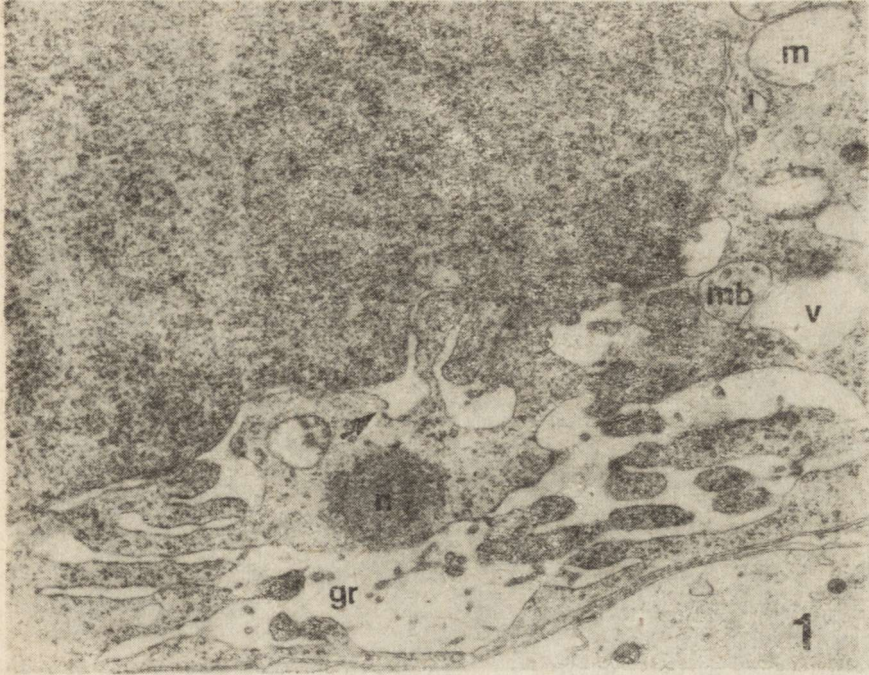
The cultures from both experimental groups of different age *in vitro* (4, 7, 9, 10 and 14 days *in vitro*) were fixed in 10% formaline for histochemical reaction of acetylcholinesterase activity according to the method of Karnowsky and Roots (1964).

## RESULTS

In the first (I) experimental group of striatum cultures treated with sera from PD patients no differences in the growth pattern sequence and cell differentiation were observed under the light microscope when compared with control cultures. Ultrastructural observation of the cultures revealed similar negative results. The neuronal population in both groups of cultures (experimental and control) after 7 DIV of treatment with sera consisted mainly of immature, poorly differentiated cells with large nucleus containing a distinct nucleolus and scanty cytoplasm rich in free ribosomes and mitochondria. In the cultures observed after 14 days *in vitro* a typical mature striatum population of neurons of large, medium and small size appeared.

Only sporadically after 14 of experiment with PD serum, in the cultures could signs of neuronal degeneration be detected. They were seen



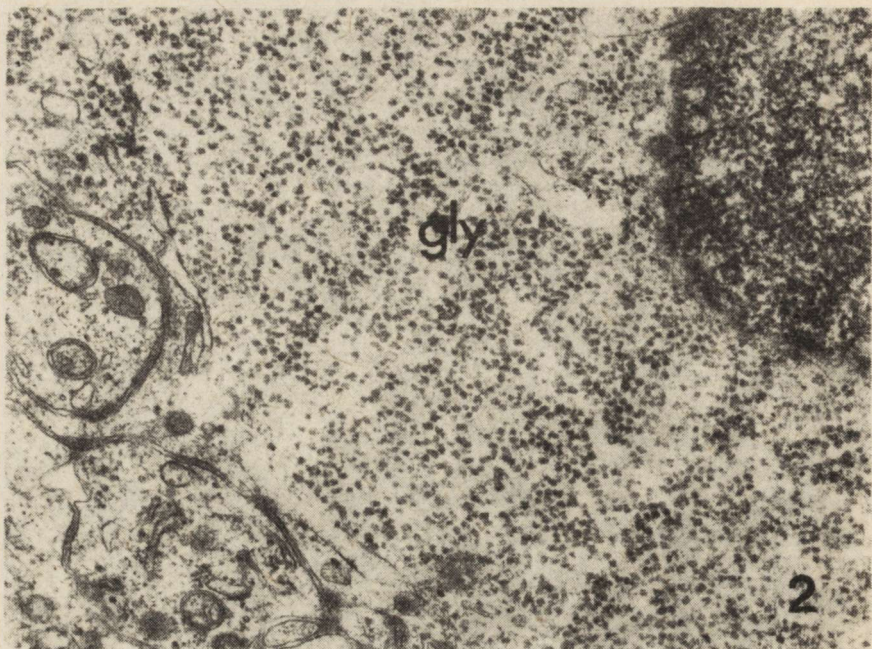


*Fig. 1.* Degenerated neuron of the large type in 14 DIV striatum. Enlarged channels of endoplasmic reticulum (gr) deprived of granules, damaged mitochondria (m), vacuoles (v), multivesicular bodies (mb), split nuclear membrane (arrow) and a nematosome (n). Experimental group I.  $\times 18\ 000$

*Ryc. 1.* Neuron wykazujący cechy zwyrodnienia. Widoczne wybitnie poszerzone kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej pozbawionej ziarnistości (gr), jasne pozbawione grzebieni mitochondria (m), wakuole (v), ciała wielopęcherzykowe (mb), rozwarstwienie otoczki jądrowej (strzałka) oraz nematosom (n). Grupa doświadczalna I, 14 dni *in vitro*. Pow.  $18\ 000 \times$

in the large-size neurons and consisted of splitting of the nuclear envelope and enlargement and degranulation of the granular endoplasmic reticulum channels, mitochondria deprived of cristae, many vacuoles and multivesicular bodies (Fig. 1). In a few cells large accumulation of glycogen particles was observed. In some cells a large amount of glycogen particles filled entirely the cell cytoplasm, displacing the cellular organelles. In some cells a large amount of glycogen particles were also present in the cell processes (Fig. 3). In the experimental as well as in control groups of cultures a dense network of neuronal and glial processes was seen among the cell bodies of neurons and glia. In cultures younger than 7 DIV immature synaptic contacts were seen. The synapses most often observed in the cultured striatum were of symmetrical type, containing clear, round vesicles sometimes clumping near the presynaptic membrane (Fig. 4). All observed synapses did not show any structural changes. However, some of the neuronal processes revealed enhanced edematous changes (Fig. 5), rarely single dense core vesicles were present. The glial cells showed no abnormalities.





*Fig. 2.* Glycogen particles (gly) filling the cell cytoplasm. Few channels of granular endoplasmic reticulum visible at the periphery of the cytoplasm. Experimental group I, 7 DIV.  $\times 18\ 000$

*Ryc. 2.* Obfite nagromadzenie ziaren glikogenu (gly) w cytoplazmie komórki. Na obrzeżu cytoplazmy widoczne pojedyncze kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Grupa doświadczalna I, 7 dni *in vitro*. Pow. 18 000  $\times$

In the second (II) experimental group of cultures treated with CSF from patients with PD structural changes in the neurons and glial cells were found. Some of the changes, however, were also present in control cultures grown in medium containing CSF from non-parkinsonian individuals. A commonly observed abnormality was an increased amount of dense bodies visible in the cell cytoplasm and in the processes of neuronal and glial cells (Fig. 6). Other morphological changes confined to single neurons were observed mainly in the experimental group of cultures. They consisted of distended granular endoplasmic reticulum channels filled with electron-dense, floccular material. In those cells enlarged mitochondria with an electron-transparent matrix, damaged cristae and vacuoles were found. Pronounced indentations and discrete splitting of the nuclear envelope was also noted (Fig. 7). Some of the neurons underwent edematous changes. They were characterized by an electron-lucent abundant cytoplasm, few mitochondria, enlarged cisternae of the Golgi apparatus and vacuoles. In the vicinity of the Golgi complex of many neurons single dense core vesicles were present. In the cultures after 14 DIV astroglia cells exhibited an increased amount of glial filaments, but



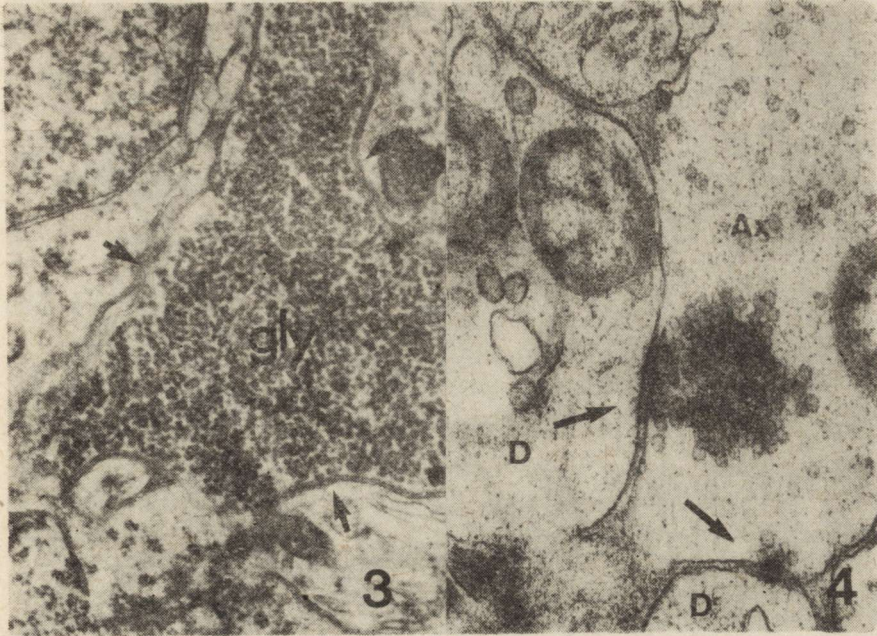


Fig. 3. Glycogen particles (gly) in the cell process (arrows). Experimental group I, 7 DIV.  $\times 18\ 000$

Ryc. 3. Ziarna glikogenu (gly) wypełniające całą wypustkę cytoplazmatyczną (strzałki). Grupa doświadczalna I, 7 dni *in vitro*. Pow.  $18\ 000 \times$

Fig. 4. Axo-dendritic synapses with clear, round vesicles (arrows). Ax — axon, D — dendrite. Experimental group I, 14 DIV.  $\times 36\ 000$

Ryc. 4. Dwie synapsy akso-dendrytyczne zawierające okrągłe jasne pęcherzyki (strzałki). Ax — akson, D — dendryt. Grupa doświadczalna I, 14 dni *in vitro*. Pow.  $36\ 000 \times$

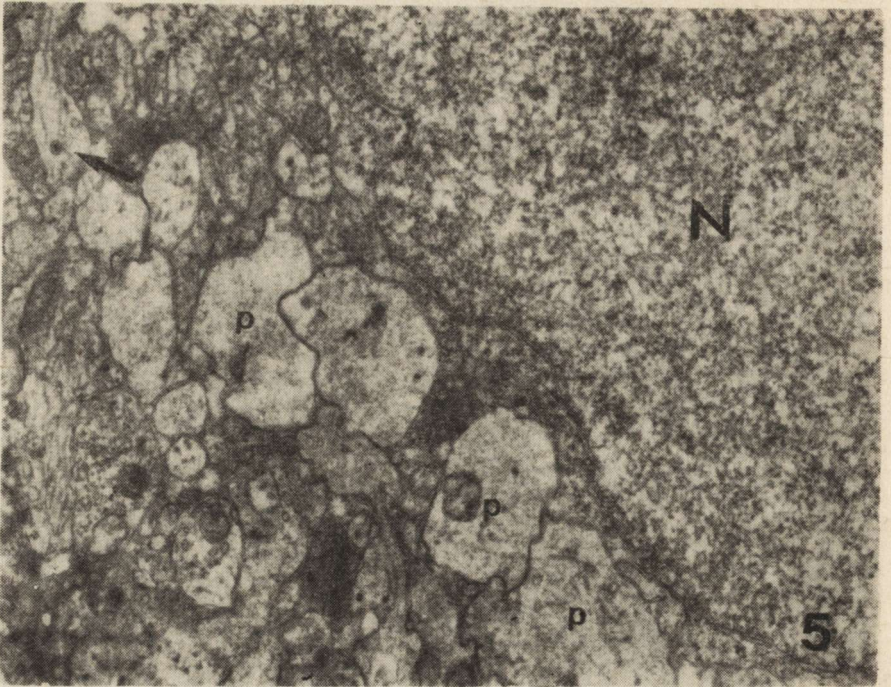
not exceeding significantly that seen in the control group. Some of the astrocytes exhibited an increased number of mitochondria, lysosomes and vacuoles.

The activity of acetylcholinesterase in both experimental groups of cultures disclosed no significant differences as compared with the control cultures. The reaction product was present in the cell body as well as in the processes of medium-size neurons (Figs 8—11).

#### DISCUSSION

In the experimental groups of organotypic cultures of rat striatum no distinct features of cell damage were observed as compared with the control cultures growing in routinely used medium. The changes of the cell structure, both of the glia and neurons, consisted in unspecific degeneration commonly observed. They resulted from the tissue culture





*Fig. 5.* Immature neuron. Edematous changes in the processes (p). Single dense core vesicle in the neuronal process (arrow). N — nucleus. Experimental group I, 7 DIV.  $\times 18\ 000$

*Ryc. 5.* Niedojrzała komórka nerwowa prądkowia. Widoczne obrzmienie niektórych wypustek komórkowych (p). Pojedynczy pęcherzyk gęsty w wypustce nerwowej (strzałka). N — jądro. Grupa doświadczalna I, 7 dni *in vitro*. Pow.  $18\ 000 \times$

method. Moreover, the number of cells undergoing degeneration was similar in experimental and control groups.

Glycogen accumulation, both in the glial cells and neurons represented metabolic changes of obscure origin. In experimental studies on animals the appearance of glycogen in the central nervous tissue reflected profound disturbances of glucose metabolism, due to the lack or deficiency of oxygen (Long et al. 1972). However, in tissue culture of the cerebellum exposed to anoxia glycogen accumulation was rarely observed (Kraśnicka et al. 1976; Renkawek, Herbaczyńska-Cedro 1985). In cultures of the rat striatum growing in standard conditions glycogen particles were usually not present (Matyja 1982). On the other hand, they were found in large amount both in neurons and glial cells in other pathological conditions like hyperthermia induced *in vitro* (Renkawek, Majkowska-Wierzbicka 1985). This implicates an unspecific character of this metabolic abnormality.

Cultures exposed to CSF from Parkinson's disease patients disclosed



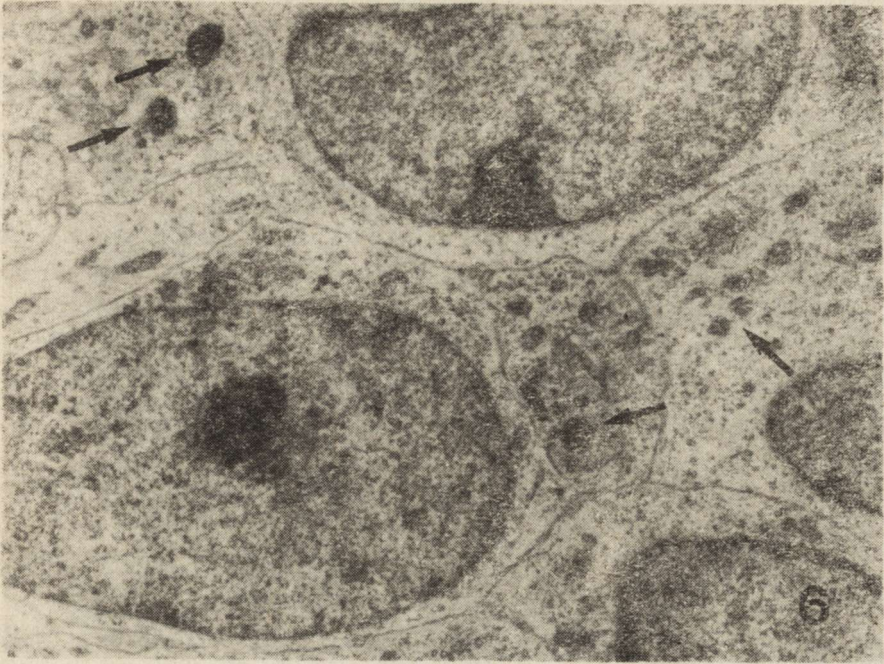


Fig. 6. Numerous dense bodies (arrows) in the cytoplasm and the processes of neurons. Experimental group II, 7 DIV.  $\times 9\ 000$

Ryc. 6. Liczne ciała gęste (strzałki) w cytoplazmie i wypustkach komórek nerwowych. Grupa doświadczalna II, 7 dni *in vitro*. Pow.  $9\ 000 \times$

more advanced morphological changes than after PD patients sera. But, these changes also showed an unspecific ultrastructural appearance. They may have been provoked in tissue culture by a protein and water imbalance in the nutrient medium and they were also visible in the control cultures growing in media with CSF from non-parkinsonian individuals. It is well known, that culture media deficient in protein may influence the morphological properties of cells and their metabolism (Waymouth 1977).

In the described experiment all types of synapses, generally observed in tissue culture of striatum were noted (Panula et al. 1979; Renkawek, Kida 1985). In both experimental groups the synapses were not damaged.

The lack of effect of both the sera and CSF from PD patients on cell morphology could be evidence that both sera and CSF did not contain any putative "toxic substance" damaging the cells of the striatum *in vitro*. The striatum, however, is not a "target" structure to be affected in Parkinson's disease in contrast to the largely damaged substantia nigra, and other pigmented nuclei in the brain stem (Mann, Yates 1983). Different results are also obtained in cytometric studies, negating (Bött-





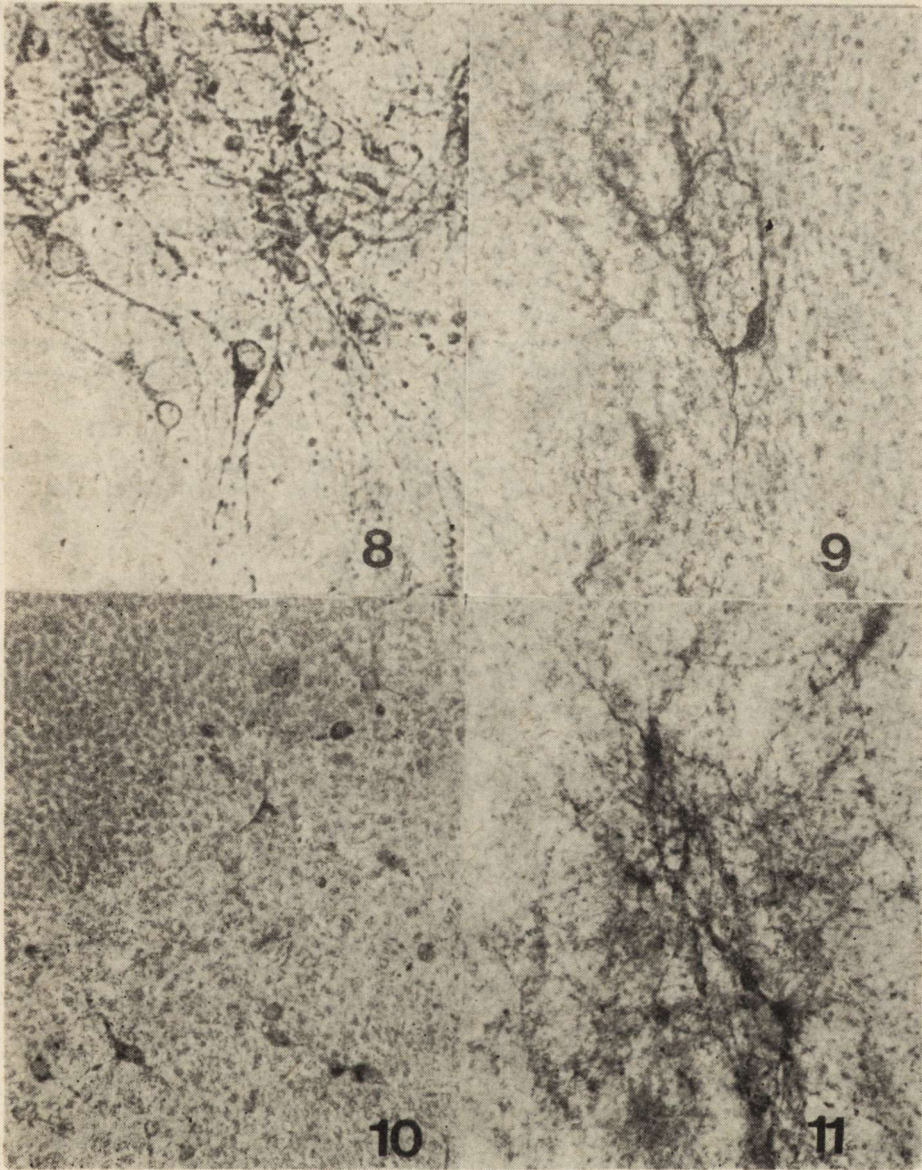
*Fig. 7.* Medium size neuron. Distended channels of the granular endoplasmic reticulum filled with floccular material (arrows), swollen mitochondria (m) with damaged cristae. Experimental group II, 7 DIV.  $\times 27\ 000$

*Ryc. 7.* Poszerzone kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej wypełnione kłaczkowatym materiałem (strzałki) oraz obrzmiałe mitochondria z uszkodzonymi grzebieniami (m) w komórce nerwowej prądkowia. Grupa doświadczalna II, 7 dni *in vitro*. Pow. 27 000  $\times$

cher 1975) or confirming (Bugiani et al. 1980) damage of the striatum in Parkinson's disease. Electron microscopical studies performed on *post mortem* material of striatum in PD patients did not show any evident and statistically important cell or synapse changes (Forno, Norville 1979).

The role of presumptive disturbances due to immunological, metabolic or cytotoxic factors in the pathogenesis of Parkinson's disease is generally investigated. Recently, Elizan et al. (1983) demonstrated a different reactivity of sera from PD patients to the spinal cord sections and cultures. Goldman et al. (1983) reported the reactivity of the Lewy body, an inclusion typically observed in PD with antisera against neurofilaments, suggesting an abnormal organization of the neuronal cytoskeleton as an important pathological feature in Parkinson's disease. We suppose that further studies with sera of CSF from PD patients on substantia nigra *in vitro* may bring more information about the specificity of the some agents which could be important in the pathogenicity of Parkinson's disease.





**Fig. 8.** Activity of AChE in the cytoplasm and neuronal processes. Control culture, 7 DIV.  $\times 200$

**Ryc. 8.** Aktywność acetylocholinesterazy w cytoplazmie i wypustkach neuronów prążkowie. Hodowla kontrolna, 7 dni *in vitro*. Pow.  $200 \times$

**Fig. 9.** Activity of AChE. Experimental group I, 7 DIV.  $\times 200$

**Ryc. 9.** Aktywność acetylocholinesterazy. Grupa doświadczalna I, 7 dni *in vitro*. Pow.  $200 \times$

**Fig. 10.** Activity of AChE. Control culture (medium with CSF), 9 DIV.  $\times 100$

**Ryc. 10.** Aktywność acetylocholinesterazy. Hodowla kontrolna (medium wzrostowe z płynem mózgowo-rdzeniowym), 7 dni *in vitro*. Pow.  $100 \times$

**Fig. 11.** Activity of AChE. Experimental group II, 9 DIV.  $\times 200$

**Ryc. 11.** Aktywność acetylocholinesterazy. Grupa doświadczalna II, 9 dni *in vitro*. Pow.  $200 \times$



WPLYW SUROWICY I PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO OD PACJENTÓW  
Z CHOROBA PАРKINSONA NA OBRAZ ULTRASTRUKTURALNY PRAŻKOWIA  
IN VITRO

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki badań ultrastruktury prążkowie noworodków szczura w organotypowej hodowli tkankowej poddawanej działaniu surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego, uzyskanych od pacjentów z chorobą Parkinsona. W obu grupach doświadczalnych nie stwierdzono istotnych zmian morfologicznych komórek prążkowie. Brak swoistych zmian strukturalnych w badanej tkance nie wyklucza obecności czynników patogennych w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym mogących uszkadzać inne niż prążkowie struktury centralnego układu nerwowego.

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ ОТ ПАЦИЕНТОВ  
С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ КАРТИНУ  
STRIATUM IN VITRO

Резюме

Представлены результаты исследований свойств ультраструктуры striatum новорождённых крыс в органотипной культуре тканей, подвергаемой воздействию сыворотки и спинномозговой жидкости, полученных от пациентов с болезнью Паркинсона.

Ни в одной из обеих экспериментальных групп не были установлены существенные морфологические изменения клеток. Отсутствие своеобразных структурных изменений в исследуемой ткани не исключает наличия патогенных факторов в сыворотке и спинномозговой жидкости, способных повреждать другие чем striatum структуры центральной нервной системы.

REFERENCES

1. Böttcher J.: Morphology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Acta neurol. scand.* 1975, 52, suppl. 62.
2. Bugiani O., Perdelli F., Salvarini S., Leonardi A., Mancardi G. L.: Loss of striatal neurons in Parkinson's disease: cytometric study. *Eur. Neurol.*, 1980, 19, 339—344.
3. Duvoisin R. C.: The cause of Parkinson's disease. In: *Movement Disorders*. Eds: C. D. Marsden, S. Fahn. Butterworth Scientific, 1982, 8—24.
4. Elizan T. S., Casala J., Yahr M. D.: Antineurofilament antibodies in Postencephalitic and Idiopathic Parkinson's disease. *J. neurol. Sci.*, 1983, 59, 341—347.
5. Emile J., Populard A., Van Nieuwenhuysse C. B., Bernat-Viallet C.: Maladie de Parkinson, dysautonomie et auto-anticorps dirigés contre les neurones sympathiques. *Rev. neurol.*, 1980, 126, 221—233.
6. Forno L. S., Norville R. L.: Ultrastructure of the neostriatum in Huntington's and Parkinson's disease. *Adv. Neurol.*, 1979, vol. 23, 123—135. Eds. T. N. Chase et al. Raven Press, New York.
7. Husby G., Li L., Davies L. E., Wedge E., Kokmen E., Williams R. C.: Antibodies to human caudate nucleus neurons in Huntington's chorea. *J. Clin. Invest.*, 1977, 59, 922—932.



8. Goldman J. E., Yen S-H., Chiu F-C., Peress N. S.: Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilaments antigens. *Science*, 1983, 221, 1082—1084.
9. Karnowsky M. J., Roots L.: A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, 12, 219—221.
10. Kraśnicka Z., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Effect of short-lasting anoxia on *in vitro* culture of cerebellum. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 11—12.
11. Long M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath.*, 1972, 20, 335—347.
12. Mann D. M. A., Yates P. O.: Pathogenesis of Parkinson's disease. *Arch. Neurol.*, 1982, 39, 545—549.
13. Mann D. M. A., Yates P. O.: Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropath. Appl. Neurobiol*, 1983, 9, 3—19.
14. Matyja E.: Obraz ultrastrukturalny komórek nerwowych prądkowia w hodowli organotypowej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 457—469.
15. Ohama E. Ikuta F.: Parkinson's disease: distribution of Lewy bodies and monoamine neuron system. *Acta Neuropath.*, 1976, 34, 311—319.
16. Panula P., Recharđt L., Hervonen H.: Ultrastructure of cultured rat neostriatum. *Neuroscience* 1979, 4, 1441—1452.
17. Reisine T. D., Fields J. Z., Yamamura H. I. Bird E., Spokes E., Schreiner P., Enna S. J.: Neurotransmitter receptor alterations in Parkinson's disease. *Life Sci*. 1977, 21, 335—344.
18. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K.: Ultrastructural and enzymatic properties of glial cells *in vitro* after anoxia and prostacyclin pretreatment. *Acta neurol. scand.* 1985, (in press).
19. Renkawek K., Kida E.: Ultrastructural alterations in rat striatum *in vitro* induced by sera of Huntington's disease patients. 1985, (in preparation).
20. Renkawek K., Majkowska-Wierzbicka J.: The effect of hyperthermia on structural and enzymatic properties of rat cerebellum cultured *in vitro*. *Acta Pathol.* 1985, (in press).
21. Rinne U. K., Riekkinen P. Sonninen V., Laaksonen H.: Brain acetylcholinesterase in Parkinson's disease. *Acta neurol. scand.*, 1973, 49, 215—226.
22. Ruberg M., Ploska A., Javoy-Agid F., Agid Y.: Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res.*, 1982, 232, 129—139.
23. Waymouth C.: Nutritional requirements of cells in culture, with special reference to neural cells. In: *Cell Tissue and Organ Cultures in Neurobiology*. Eds. S. Fedoroff, L. Hertz, Academic Press, New York, 1977, 631—648.

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



cd. ze s. 16

- prof. E. Csanda, dyrektor Kliniki Neurologicznej Uniwersytetu im. Semmelweissa w Budapeszcie,
- prof. F. Gerstenbrand, dyrektor Kliniki Neurologicznej Uniwersytetu w Innsbrucku,
- prof. K. Karbowski, Naczelny Lekarz Kliniki Neurologicznej Uniwersytetu w Bernie,
- prof. R. L. Masland, Przewodniczący Światowej Federacji Neurologów,
- prof. G. Servatrice, dyrektor Kliniki Neurologicznej w Marsylii,
- prof. H. A. P. Schulze, dyrektor Kliniki Psychiatrycznej i Neurologicznej Uniwersytetu im. Humboldta w Berlinie.

\*

16 września 1985 r. odbyło się w Białymstoku Walne Zebranie Sekcji Neurologii Rozwojowej Polskiego Towarzystwa Neurologicznego wraz ze współpracującą z nią Sekcją Neurologii, Neurofizjologii i Elektrofizjologii Rozwojowej Polskiego Towarzystwa Pediatrycznego.

Wybrano nowy Zarząd Sekcji w składzie:  
przewodniczący — prof. dr hab. Mieczysław Krauze (Katowice),  
wiceprzewodniczący — dr med. Janusz Wendorf (Łódź),  
sekretarz — dr med. Alicja Filipowicz (Zabrze).

Zarząd dookoptował do współpracy dr med. Romana Ignatowicza (Warszawa) i dr med. Tadeusza Ciesielskiego (Olsztyn).

\*

W dniu 30 listopada 1983 r. Rada Wydziału Lekarskiego Śl. AM w Katowicach nadała stopień doktora nauk medycznych następującym osobom:

— kol. Annie Dragon na podstawie pracy pt. „Próba oceny wzajemnych zależności pomiędzy stanem psychicznym i neurologicznym u chorych na stwardnienie rozsiane”.

Promotorem była doc. dr hab. Barbara Grudzińska.

— kol. Marii Szeliga-Cetnarskiej na podstawie pracy pt. „Badania elektroencefalograficzne i elektromiograficzne u pracowników przewlekle narażonych na działanie manganu”.

Promotorem był doc. dr hab. Adam Miesiewicz.

Rada Wydziału Lekarskiego AM w Białymstoku nadała stopień doktora nauk medycznych następującym kolegom:

— Wiesławowi Drozdowskiemu na podstawie pracy pt. „Odruch H i fala F we wczesnej diagnostyce zmian obwodowego układu nerwowego”.

Promotorem pracy była prof. dr hab. med. Eleonora Jankowicz. Obrona odbyła się 7 III 1984 r.

— Barbarze Pawlak-Tumiel na podstawie pracy pt. „Badanie reoencefalograficzne i elektroencefalograficzne reaktywności krążenia mózgowego po podaniu aminofiliny, u chorych z ostrymi zespołami niedokrwiennymi mózgu”.

Promotorem pracy była prof. dr hab. med. Eleonora Jankowicz. Obrona odbyła się 20 III 1985.

— Witoldowi Świdierskiemu (zatrudnionemu w Zakładzie Ochrony Układu Nerwowego Centralnego Ośrodka Badawczego Kolejowej Służby Zdrowia w Warszawie) na podstawie pracy pt. „Zróżnicowanie morfologiczne jądra siatkowatego wzgórza u szczura”.

Promotorem pracy była doc. dr hab. med. Irena Gałasińska-Pomykoł. Obrona odbyła się 19 VI 1985 r.

Rada I Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie nadała stopień doktora nauk biologicznych mgr Oldze Kwast (zatrudnionej w Zespole Neurologii Dziecięcej Cen-

cd. na s. 78



JERZY DYMECKI, MACIEJ PÓLTORAK, DANUTA MARKIEWICZ,  
MIROŚLAWA HAUPTMAN, WOJCIECH DZIEDZIAK, WOJCIECH KOSTOWSKI

EFFECTS OF INTRACEREBRAL TRANSPLANTATION  
OF THE ADRENAL MEDULLA IN RATS WITH EXPERIMENTAL  
PARKINSON'S DISEASE

Department of Neuropathology, Department of Biochemistry and Department of  
Pharmacology and Physiology of the Nervous System, Psychoneurological Institute,  
Warsaw

It has been demonstrated in a series of investigations performed in recent years (Dymecki et al. 1985b,c) that fragments of the ventral part of the mesencephalon of newborn rats containing the compact part of the substantia nigra (SN), when implanted into the region of the striatum to adult rats of the same strain, survive, develop and integrate with the host tissue.

Such transplantations were performed in animals in which SN was previously destroyed unilaterally by stereotaxic injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA), a neurotoxin causing selective degeneration of catecholaminergic neurons Ungerstedt (1968). Characteristic for unilateral SN lesion was behaviour of the animals, manifested in asymmetric posture and performance of rotatory movements. After transplantation these symptoms diminished. Histofluorescence studies demonstrated that the transplanted cells appeared identical in colour and intensity to the substantia nigra neurones. Biochemical evaluation of dopamine (DA) content in the isolated striatum showed on the damaged side a statistically significant decrease after SN lesion, whereas after transplantation its content increased not only on the side of the transplant, but to a still higher degree on the contralateral side.

The results of the above mentioned studies suggest that transplantation of immature substantia nigra neurons into the region of the striatum leads to a partial reconstruction of function of the damaged nigro-striatal system. Similar results were previously obtained by Björklund and Stenevi (1979).

---

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



This method seems to be very interesting in the aspect of possible therapeutic effects in substitution treatment of Parkinson's disease.

The obtaining of suitable material, however, for transplants to patients, proved extremely difficult. This influenced the American-Swedish group of investigators (Olson et al. 1980; Freed et al. 1981) to substitute the substantia nigra neurons by other DA-producing cells, namely, those of the adrenal medulla. DA is known to be one of the steps in noradrenalin synthesis occurring in the adrenals.

After several years of experiments, in 1983 the first trial of transplantation of the adrenal medulla to a patient with severe form of Parkinson's disease was attempted in Karolinska Institute in Stockholm. The material for transplantation was from the patient's own adrenal. No therapeutic effect was, however, achieved. Although there were no side effects, farther trials were discontinued for fear of mutilating the patient by depriving him of a part of his adrenals, a damage probably greater than the advantages of the transplantation. Freed (1983) continued farther studies on the effect of implantation of fragments of adrenals to rats, concentrating mainly on behavioural tests indicating the possibility of reconstruction of the chemically injured nigrostriatal system.

The immediate aim of the present studies was to evaluate whether disturbances of the function of the nigrostriatal system provoked by SN destruction can be compensated by intracerebral implantation of the adrenal medulla cells.

#### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on 105 Albino Wistar rats aged 2 months, weighing 180—200 g. Stereotaxic right side lesion of the compact part of the substantia nigra was performed by means of 6-OHDA according to the technique described earlier (Dymecki et al. 1985a). Material for implantation was taken from 2-month-old individuals of the same strain. Under ether anesthesia the adrenals were extracted and immersed in Ringer solution on a Petri dish. Then they were dissected with a razor blade transversely into sections about 1 mm thick and the cortex was carefully separated from the medulla. Sections of the adrenal medulla of dimensions up to 1 mm<sup>2</sup> were implanted into the right striatum region to rats with two weeks earlier stereotaxically destroyed SN on this side. The procedure of transplantation was analogous as when immature SN was introduced into the brain (Dymecki et al. 1985 b). In view of the well established fact that the younger the donor the more readily the transplant is accepted and develops, an additional series of transplants was performed, with the adrenal medulla taken from younger, 2-week-old individuals.



The effects of transplantation were examined by means of many methods. *In vivo*, in all animals the rotatory behaviour typical for unilateral SN lesion was evaluated with Ungerstedt's test (1973). Rotation around their own axis in rats was activated by subcutaneous injection of 2 mg/kg apomorphine and the rotations were counted for 30 min. The first test was performed two weeks after SN damage, the second two weeks after the transplant, the third four weeks later.

The animals with transplants taken from 2-month-old rats were divided into three groups. The first group of 47 animals served for histopathological examination. The animals were decapitated and tissue obtained 2, 4 and 6 weeks after transplantation. Besides the routine techniques of staining by the HE and Klüver-Barrera methods, the method of Sevki consisting of fixation of the brain in potassium dichromate and staining with diluted Giemsa solution was also applied. This method allowed detection of chromaffin granules, typical for the adrenal medulla, which stain greenish-yellow and stand out against the blue background. The method proved very useful for evaluation of the survival and development of the transplant.

The second group of 12 rats was examined by the histofluorescence method after Bloom and Battenberg (1976). This method based chemically on the condensation of biogenic amines with paraformaldehyde and glyoxylic acid revealed fluorescence of cells containing catecholamines, and enabled to distinguish cells of the transplant from the surrounding tissue and to ascertain its survival.

The third group of 46 animals was used for biochemical evaluation of DA content in the isolated right and left striatum separately. The experimental group consisted of two subgroups of 14 animals each. In one, the transplants were taken from 2-month-old rats, in the other one, from animals aged two weeks. The investigations were performed according to the method of Heubrich and Denzer (1973), two weeks after transplantation.

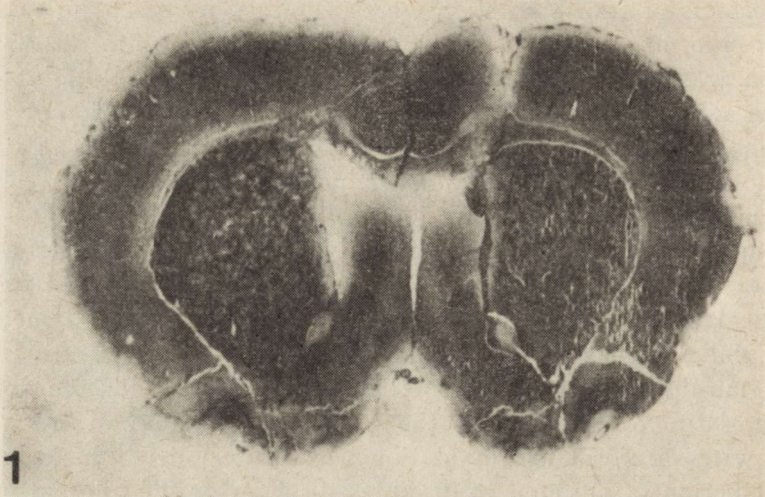
Nine additional animals served as a comparative group in which DA content was determined two weeks after SN destruction, without any transplantation. The other control group consisted of nine rats after sham transplantation, which was the puncture of the needle without introduction of transplant.

## RESULTS

### *Behavioural examination*

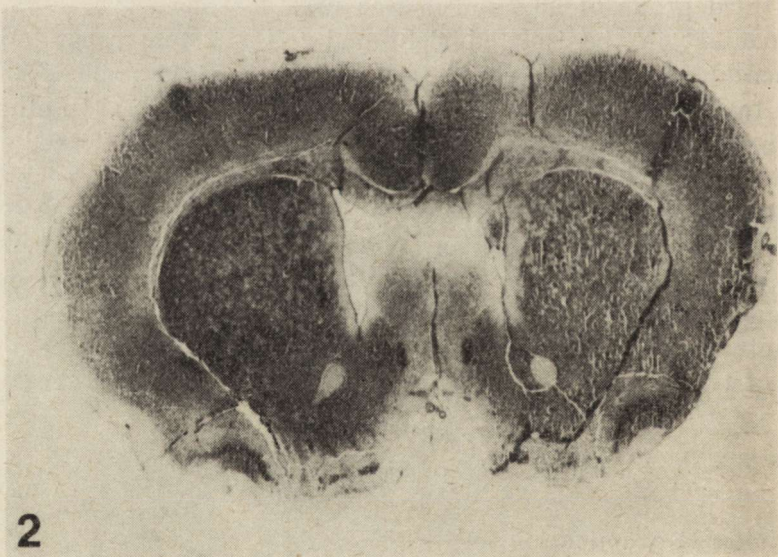
Ungerstedt's test (1973) did not reveal any statistically significant decrease in the number of rotations of rats, neither two nor four weeks after introduction of the transplant into the brain.





*Fig. 1.* Transplant placed at the boundary between the striatum and corpus callosum on the right side. It differs from the surrounding tissue. Above the transplant a fragment of the needle pathway is visible through which the transplant was introduced. H—E Magn. glass

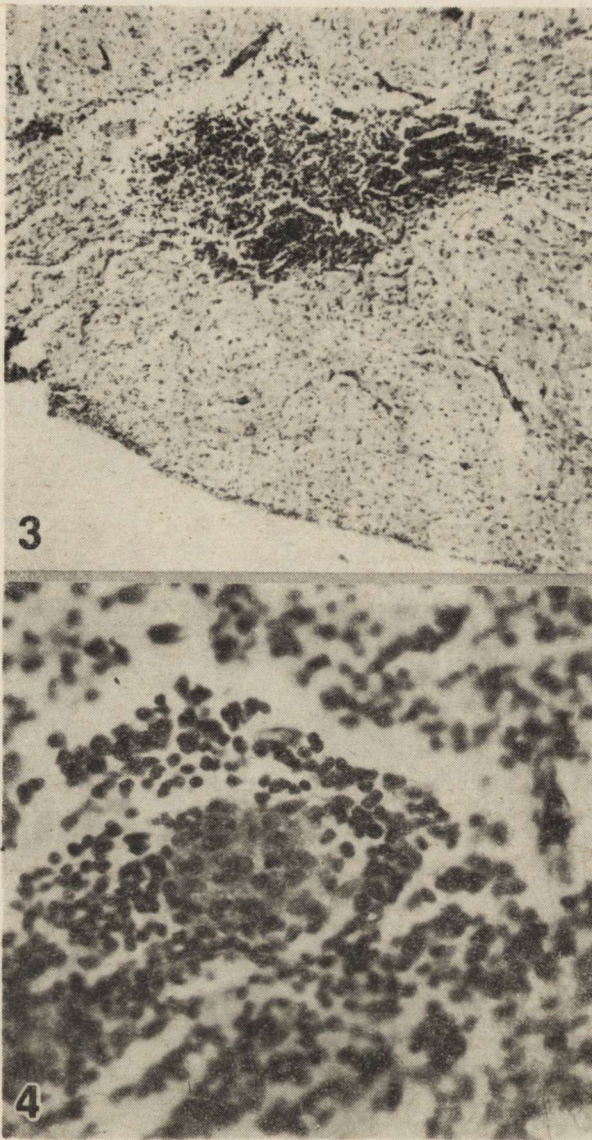
*Ryc. 1.* Przeszczep umieszczony na pograniczu prążkownia i ciała modzelowego po stronie prawej, wyróżnia się od tkanki otaczającej. Ponad przeszczepem widoczny fragment kanału wkłucia igły, którą wprowadzono przeszczep. H—E. Pow. lupowe



*Fig. 2.* Transplant located in the lateral corner of the right ventricle. Klüver—Barraera. Magn. glass

*Ryc. 2.* Przeszczep umiejscowiony w rogu bocznym prawej komory Klüver—Barraera. Pow. lupowe





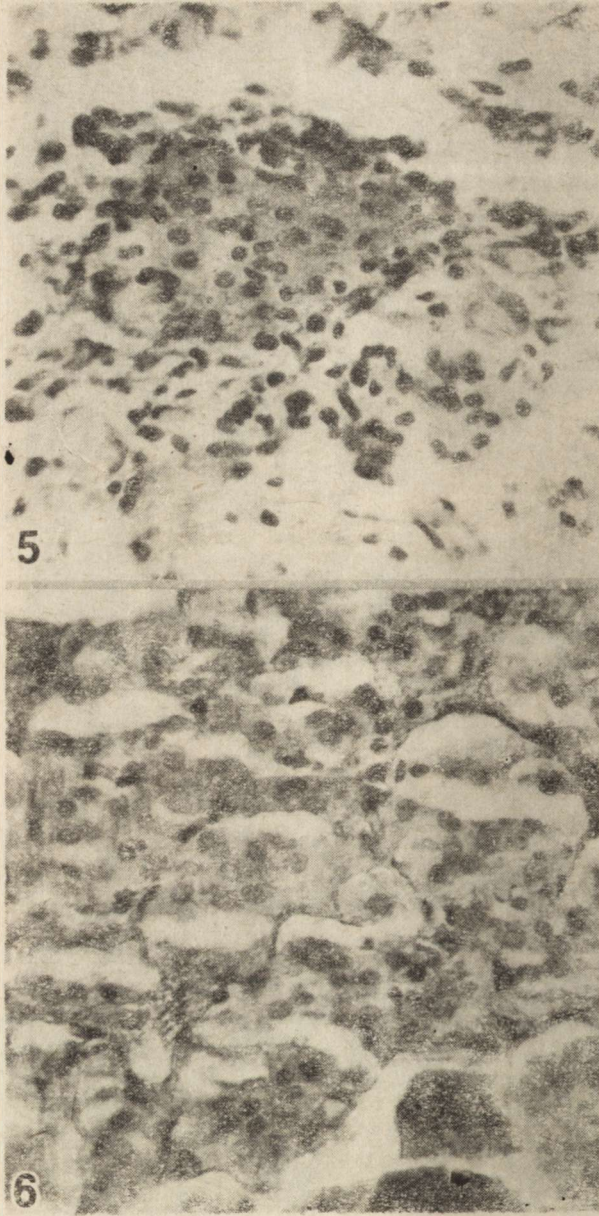
*Fig. 3.* Transplant in the lateral corner of the right ventricle shows features of integration with striatum. Savki's method.  $\times 60$

*Ryc. 3.* Przeszczep w rogu bocznym prawej komory wykazuje cechy zespolenia z prążkowiem. Met. Savki. Pow.  $60 \times$

*Fig. 4.* An islet of the adrenal medulla cells within transplant located at the boundary of the striatum, surrounded by profuse glial-mesodermal reaction. Savki's method.  $\times 200$

*Ryc. 4.* Wyspa komórek nadnercza w obrębie przeszczepu, umiejscowionego na pograniczu prążkowie, otoczona bogatym odczynem glejowo-mezodermalnym. Met. Savki. Pow.  $200 \times$





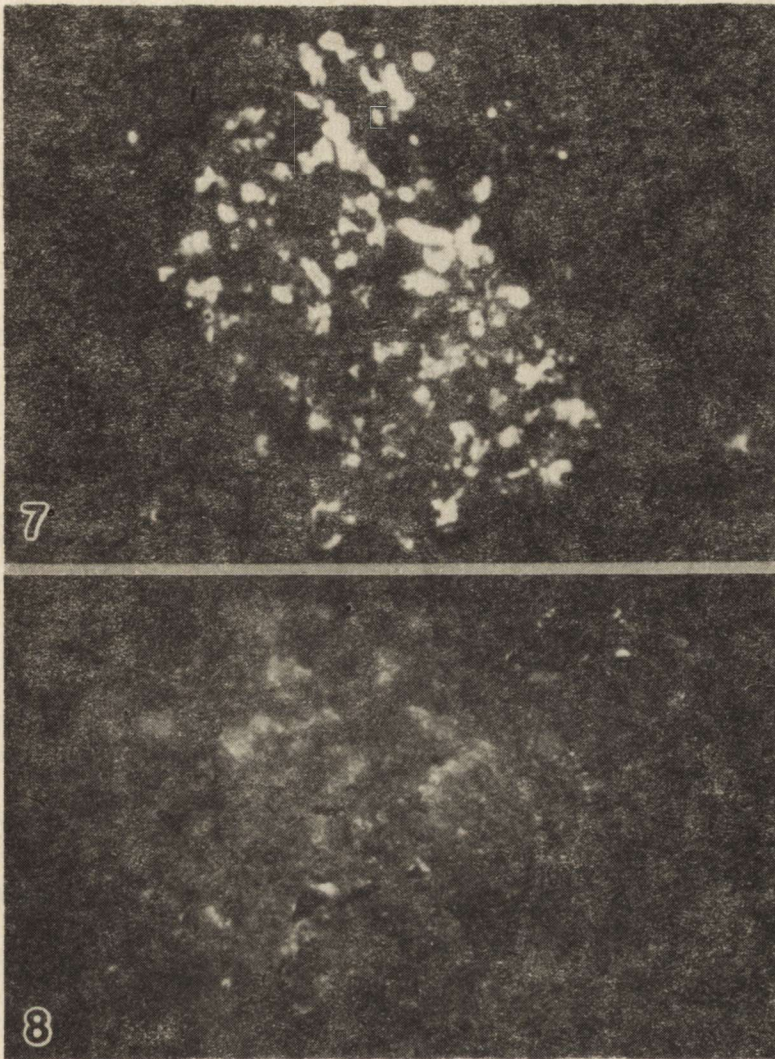
*Fig. 5.* Cells of the graft with numerous regular nuclei and structure typical for the adrenal medulla cells. Savki's method.  $\times 400$

*Ryc. 5.* Komórki nadnercza z licznymi, regularnymi jądrami o strukturze typowej dla komórek istoty rdzennej nadnerczy. Met. Savki. Pow.  $400 \times$

*Fig. 6.* Fragment of the adrenal medulla — comparative slide. Savki's method.  $\times 400$

*Ryc. 6.* Fragment rdzenia nadnercza — preparat porównawczy. Met. Savki. Pow.  $400 \times$





7

8

*Fig. 7.* Section of the adrenal medulla shows cell fluorescence typical for the presence of catecholamine. Histofluorescence method.  $\times 100$

*Ryc. 7.* Skrawek istoty rdzennej nadnerczy wykazuje świecenie komórek, typowe dla obecności w nich katecholamin. Metoda histofluorescencyjna. Pow.  $100 \times$

*Fig. 8.* Transplant in the brain containing cells with fluorescence typical for catecholamines. Histofluorescence method.  $\times 100$

*Ryc. 8.* Transplantat mózgowy zawierający komórki, wykazujące świecenie typowe dla katecholamin. Metoda histofluorescencyjna. Pow.  $100 \times$

#### *Histological examination*

Under low magnification, the tissue of the transplant introduced into the boundary between the striatum and the corpus callosum differed from the surroundings (Fig. 1). Sometimes, the transplant was localized within the lateral ventricle (Figs 2, 3). The islets of the adrenal medulla



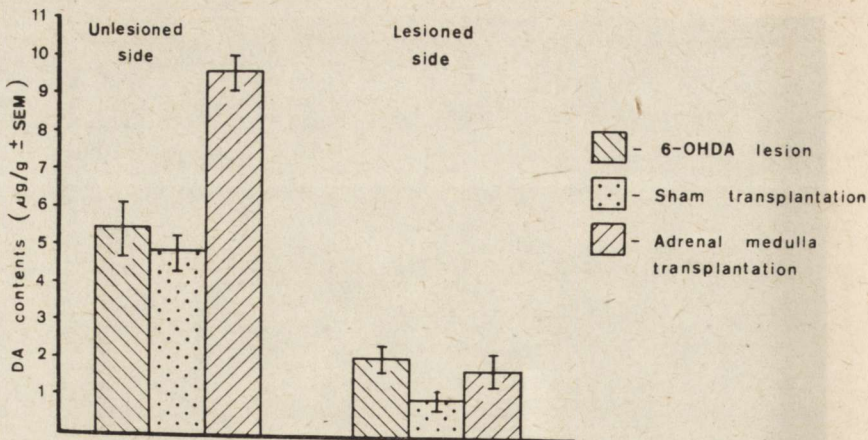


Fig. 9. DA contents in isolated striatum after transplantation of adrenal medulla from rats aged 2 months and after sham transplantation

Ryc. 9. Zawartość DA w izolowanym prążkowie po przeszczepie istoty rdzennej nadnercza, pobranej od szczurów w wieku 2 miesięcy oraz po transplantacji rzekomej

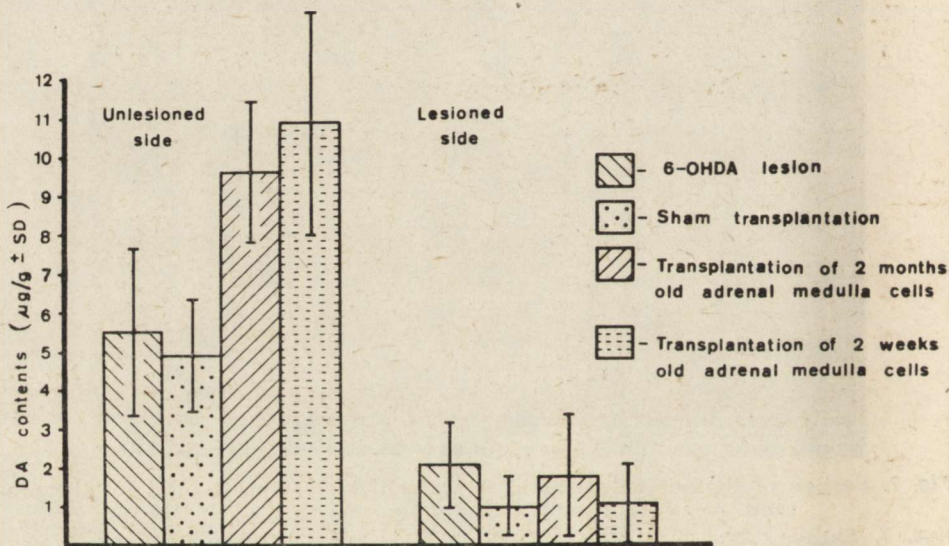


Fig. 10. Comparison of DA contents in striatum after transplantations of adrenal medulla from older (2-month-old) and younger (2-week-old) rats

Ryc. 10. Porównanie zawartości DA w prążkowie po przeszczepach istoty rdzennej nadnerczy, pobranych od starszych (2-miesięcznych) i młodszych (2-tygodniowych) szczurów

cells characterized by numerous round nuclei were frequently surrounded by reactive glial-mesodermal tissue (Fig. 4). Under high magnification, a distinct structural similarity between the transplant cells (Fig. 5) and those of the adrenal medulla was visible (Fig. 6).



### Histofluorescence examination

First sections of the adrenals were studied to establish the histofluorescence features of the adrenal medulla cells (Fig. 7). After ascertaining the colour and intensity of fluorescence of chromaffin cells, the brain sections with transplants were examined. Cell agglomerations were noted within the transplant, showing fluorescence of the colour and intensity comparable to that of the adrenal medulla cells (Fig. 8).

### Biochemical analysis

It was found in the previous investigations that after destruction of SN, the content of DA in the isolated striatum fell on the side of the lesion and that this decrease was statistically significant. Implantation of immature SN neurons increased the DA level on the side of the transplant. This result was statistically significant in reference to the sham transplant. An increase of DA content was also observed on the contralateral side.

After transplantation of the adrenal medulla cells from 2-month-old rats, an increase of DA content in the striatum on the side of the implantation was expected, as possibly suggested by the results of histological and histofluorescence examination which showed survival of the transplant. It appeared, however, that on the side of the transplant DA content did not markedly increase, while on the contralateral side a statistically significant rise of its level was noted. Sham transplant pro-

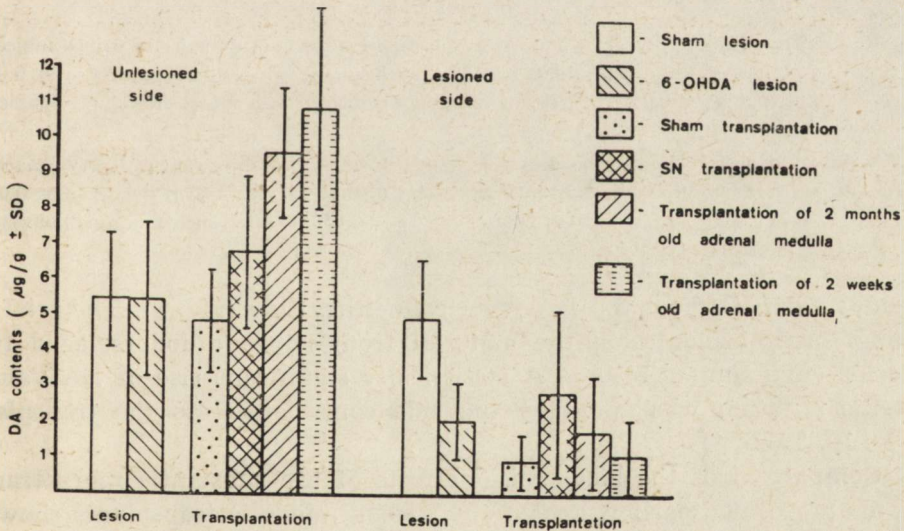


Fig. 11. Comparison of DA contents in striatum after different transplants performed in successive stages of the investigations

Ryc. 11. Porównanie zawartości DA w prążkowiu po wszczepieniu wszystkich rodzajów transplantatów, zastosowanych w kolejnych etapach badań



Table 1. Dopamine contents in the striatum after SN lesion and after the transplantation of the adrenal medulla cells

Tabela 1. Zawartość dopaminy w prążkowaniu po uszkodzeniu istoty czarnej i po transplantacji komórek istoty rdzennej nadnerczy

Group of animals Grupa zwierząt	n	Dopamine content nmoles/g Zawartość dopaminy nmole/g		L-R L-P
		left striatum unlesioned SN prążkowie lewe nieuszkodzona istota czarna	right striatum lesioned SN prążkowie prawe uszkodzona istota czarna	
Sham SN lesion Rzekome uszkodzenie istoty czarnej	7	35.7 ± 12.1	32.0 ± 10.7 <sup>b</sup>	3.7 ± 19.4 <sup>de</sup>
Chemical SN lesion 6-OHDA Chemiczne uszkodzenie istoty czarnej 6-OHDA	9	35.6 ± 14.1	13.3 ± 7.1 <sup>bc</sup>	22.3 ± 12.9 <sup>d</sup>
Sham transplantation Transplantacja rzekoma	9	31.5 ± 9.3 <sup>ag</sup>	6.3 ± 4.9 <sup>c</sup>	25.2 ± 12.6 <sup>efh</sup>
Transplantation of 2-month-old adrenal medulla cells Transplantacja istoty rdzennej nadnercza pobranej od zwie- rząt w wieku 2 miesiące	14	62.3 ± 11.7 <sup>a</sup>	11.4 ± 10.4	50.9 ± 15.8 <sup>f</sup>
Transplantation of 2-week-old adrenal medulla cells Transplantacja istoty rdzennej nadnercza pobranej od zwierząt w wieku 2 tygodni	14	70.6 ± 18.8 <sup>g</sup>	6.8 ± 6.8	64.6 ± 19.3 <sup>h</sup>

Results are means ± SD, n — number of animals. Letters indicate pairs of values subjected to statistical evaluation with the t-Student test. The p values were: g — < 0.001; a, b, f — < 0.005; h — < 0.01; c, d, e — < 0.05. The pairs of values not described with letters showed no significant differences

Wyniki podano jako średnie ± odchylenie standardowe, n — liczba zwierząt. Litery oznaczają pary wartości poddanych ocenie statystycznej testem t-Studenta. Wartość p dla g — < 0.001; dla a, b, f — < 0.005; dla h — < 0,01; dla c, d, e — < 0,05. Wartości nie oznaczone literami są statystycznie nieznamienne

cedure did not affect the DA level on neither side (Fig. 9). The trial of using for transplantation the material from younger donors, aged two weeks, gave similar results. A statistically significant rise of DA values in the striatum was noted on the side contralateral to the transplant (Fig. 10, Table 1).

Comparison of the biochemical effects of the substantia nigra transplants performed earlier, and of the adrenal medulla transplants showed similar correlation. An increase in DA content was higher on the opposite side than on the side of the transplant. This increase was statistically significant as compared with the result of sham transplantation, but in



Table 2. The comparison of dopamine contents in the striatum after the transplantation of SN and the adrenal medulla cells

Tabela 2. Porównanie zawartości dopaminy w prążkowie po transplantacji komórek istoty czarnej i rdzenia nadnercza

Graft Przeszczep	n	Dopamine content (nmoles/g) Zawartość dopaminy (nmole/g)		
		left striatum (unlesioned SN) prążkowie lewe (nieuszkodzona istota czarna)	right striatum (lesioned SN) prążkowie prawe (uszkodzona istota czarna)	$\Delta$ (L-R) $\Delta$ (L-P)
Sham transplantation Transplantacja rzekoma	9	31.5 $\pm$ 9.3 <sup>b</sup>	6.3 $\pm$ 4.9 <sup>c</sup>	25.2 $\pm$ 12.6 <sup>d</sup>
Immature SN neurons Niedojrzałe neurony istoty czarnej	16	44.2 $\pm$ 14.2 <sup>ab</sup>	18.5 $\pm$ 15.2 <sup>c</sup>	25.7 $\pm$ 21.5
Adrenal medulla cells Komórki istoty rdzennej nadnerczy	14	62.3 $\pm$ 11.7 <sup>a</sup>	11.4 $\pm$ 10.4	50.9 $\pm$ 15.8 <sup>d</sup>

Results are means  $\pm$  SD, n — number of animals. Letters indicate pairs of values subjected to statistical evaluation with t-Student test. The p values were: a, d —  $< 0.005$ ; b, c —  $< 0.05$ . The pairs of values not described with letters showed no significant differences

Wyniki podano jako średnie  $\pm$  odchylenie standardowe, n — liczba zwierząt. Litery oznaczają pary wartości, poddanych ocenie statystycznej testem t-Studenta. Wartość p dla a, d —  $< 0,005$ , dla b, c —  $< 0,05$ . Wartości nie oznaczone literami są statystycznie nieznamienne

reference to transplantation of SN cells a statistically significant increase was also observed on the side of the transplant as compared with the sham operation (Tab. 2).

Comparison of the effects of different kinds of transplantations performed up-to-date is given in Figure 11. In different types of transplantations a rise of the DA level occurred on the opposite side. It was most pronounced after transplantation of adrenal medulla from two-weeks old rats.

## DISCUSSION

The interpretation of the above presented effects of intracerebral implantation of the adrenal medulla cells in rats with unilateral SN damage is very difficult. Histological and histofluorescence examinations indicate that the transplants are not rejected by the host tissue and that the cells survive for six weeks. The question arises why they do not compensate the functions of the injured nigrostriatal system and do not exert a normalizing influence on the behaviour of animals. It is probably caused by paradoxical biochemical effect in form of increased



DA content not in the striatum where the adrenal medulla cells were implanted, but in the opposite hemisphere. This enhances the dominance of this striatum manifested by the rotational behaviour of the animals.

The second question refers to the rise of DA level not in the hemisphere where the DA-producing cells were implanted, but in the opposite one. The simplest explanation would seem to be the compensating increase of DA production by the nigrostriatal system opposite to the side where SN was destroyed. However, such compensation should also appear without transplantation, but it is not observed before introduction of the adrenal medulla cells into the brain.

A more feasible explanation seems to be that the damaged nigrostriatal system, in spite of the transplant, is unable to utilize the DA produced by the latter, because receptor neurons underwent degeneration and are lacking in the striatum. The striatum on the intact side, on the other hand, captures the DA produced by the transplant and that is why its content rises in the striatum of the opposite side. The age of animal-donor of the adrenal material for transplantation does not play any major role here.

The last problem arising in relation to the performed research series concerns the usefulness of the adrenals as material for the possible substitution treatment of Parkinson's disease in humans. The fact is essential here that the transplant of the adrenal medulla causes a rise of the cerebral DA level. Its greater or smaller amount appearing in one or the other hemisphere is of no major importance since in the possible clinical application of transplantation of the adrenal it could be done bilaterally. Considering, that the differences in biochemical effects of transplantation of the adrenals depending on the age of the donor are only slight it could be theoretically expected that an autograft taken from the patient's own adrenals and, owing to this fact not rejected, should fulfill its role not worse than a transplant taken from a younger donor. This therapeutic concept, however, threatens the patient with mutilation as the consequence of partial removal of the adrenals. In this situation it is rational to continue search for adequate transplant material which could be used for patients with Parkinson's disease.

#### CONCLUSIONS

1. Histopathological and histofluorescence examinations indicate that fragments of adrenal medulla implanted into the region of the striatum survive and are not rejected.

2. Behaviour tests with animals show no improvement after transplantation. Thus, transplantation of adrenal medulla does not contribute to the reconstruction of the function of the injured nigrostriatal system.



3. Biochemical evaluation of the DA content in isolated striatum on the side of the implant and on the opposite side shows a significant rise of the dopamine level on the opposite side. This is probably due to the inability of utilization of the DA produced by the transplant, due to degeneration of the striatal cells on the side of the transplant resulting from destruction of SN neurons. On the other hand, the DA released by the transplant is captured by the intact neurons of the striatum on the opposite side, causing an increase of the DA content in the opposite brain hemisphere.

#### EFEKTY DOMÓZGOWYCH PRZESZCZEPÓW ISTOTY RDZENNEJ NADNERCZY U SZCZURÓW Z DOŚWIADCZALNĄ CHOROBA PARKINSONA

##### Streszczenie

Badania przeprowadzono na 105 szczurach Wistar w wieku 2 miesięcy. Doświadczalny parkinsonizm wywoływano przez jednostronne stereotaktyczne wprowadzenie 6-hydroksydopaminy do istoty czarnej. Powodowało to spadek zawartości dopaminy w prążkowie po stronie uszkodzenia. Skuteczność uszkodzenia istoty czarnej oceniano przy pomocy testów zachowania się rotacyjnego zwierząt. W dwa tygodnie po zabiegu wszczepiano w okolicę prążkowiego fragmentu istoty rdzennej nadnercza pobranego od szczurów tego samego szczepu, w wieku 2 tygodni lub 2 miesięcy. Grupę kontrolną stanowiły szczury z przeszczepami rzekomymi oraz z przeszczepami fragmentów nerwu kulszowego.

Badania zachowania się rotacyjnego zwierząt po przeszczepie nie wykazały statystycznie znamiennej poprawy zaburzeń wywołanych uszkodzeniem istoty czarnej. W badaniach histopatologicznych i histofluorescencyjnych ustalono, że przeszczepy przeżywają, nie zostają odrzucone przez tkankę gospodarza i produkują dopaminę. Badania biochemiczne wykazały tylko nieznaczne podwyższenie stężenia dopaminy po stronie przeszczepu, natomiast bardzo znaczny jej wzrost po stronie przeciwnej, niezależnie od wieku dawcy.

Przyczyna tego zjawiska jest niejasna. Wydaje się, że neurony prążkowiego po stronie uszkodzonego układu nigrostriatalnego nie są w stanie wykorzystać syntetyzowanej przez przeszczep dopaminy, którą wychwytuje prawdopodobnie prążkowie po stronie nieuszkodzonej. Może to prowadzić do pogłębienia dominacji półkuli nieuszkodzonej i braku normalizacji zachowania się rotacyjnego zwierząt pomimo przyjęcia się komórek przeszczepu i podjęcia przez nie produkcji dopaminy.

#### ЭФФЕКТЫ ВНУТРИМОЗГОВЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ МОЗГОВОГО СЛОЯ НАДПОЧЕЧНИКА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

##### Резюме

Проводились исследования 105 крыс Вистар в возрасте 2 месяцев. Экспериментальный паркинсонизм вызывался путём одностороннего стереотактического введения 6-гидрокси-дофамина в чёрное вещество. Это привело к понижению содержания дофамина в striatum по стороне повреждения. Эффективность повреждения чёрного вещества определялась при помощи тестов ротационного поведения животных. Две недели после вмешательства в периферический участок striatum по стороне повреждения имплантировался фрагмент мозгового слоя надпочечника, взятого от крысы того же штамма, в возрасте 2 недель или 2 месяцев. Контрольную группу составляли крысы с псевдотрансплантатами, а также с трансплантатами фрагментов седлишнего нерва.

Исследования ротационного поведения животных после трансплантата статистически



не показали существенного уменьшения расстройства, вызванного повреждением чёрного вещества. Результаты гистопатологических и гистофлюоресцентных исследований показывали что трансплантаты выживают, не отбрасываются тканью хозяина и синтезируют дофамин. Биохимические исследования показали лишь незначительное повышение концентрации дофамина по стороне трансплантата и значительный его рост по противоположной стороне, независимо от возраста донора.

Причина этого явления неясна. Предполагается что нейроны striatum по стороне повреждённой nigrostriальной системы не в состоянии использовать дофамин синтезированный трансплантатом, перехватываемый по неповреждённой стороне. Это может приводить к углублению доминанции неповреждённого полушария и отсутствия нормализации ротационного поведения животных на приём клеток трансплантата и производство ими дофамина.

#### REFERENCES

1. Björklund A., Stenevi U.: Reconstruction of the nigro-striatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.*, 1979, 177, 555—560.
2. Bloom F. F., Battenberg E. L. F.: A rapid, simple and more sensitive method for the demonstration of central catecholamine-containing neurons and axons by glyoxylic acid induced fluorescence. II. A detailed description of methodology. *J. Histochem. Cytochem.*, 1976, 24, 561—571.
3. Dymecki J., Markiewicz D., Póltorak M., Puciłowski O., Kostowski W., Budziński A.: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. I. Comparative evaluation of two models of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic lesion of the substantia nigra with electrocoagulation and with 6-hydroxydopamine. *Neuropat. Pol.*, 1985 a, 23, 167—179.
4. Dymecki J., Póltorak M., Puciłowski O., Markiewicz D., Kostowski W.: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. II. Results of histopathological and histofluorescent studies. *Neuropat. Pol.*, 1985b, 23, 181—189.
5. Dymecki J., Puciłowski O., Dyr W., Markiewicz D., Póltorak M., Kostowski W., Hauptmann M., Lipińska B.: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. III. Results of behavioural and biochemical investigations. *Neuropat. Pol.* 1985 c, 23, 287—295.
6. Freed W. J., Morihisa J. M., Spoor H. E., Hoffer B. J., Olson L., Seiger A., Wyatt R. F.: Transplanted adrenal chromaffin cells in rat brain to reduce lesion induced rotational behavior. *Nature*, 1981, 292, 351—352.
7. Freed W. J.: Functional brain tissue transplantation: reversal of lesion induced rotation by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts with a note on intracranial retinal grafts. *Biol. Psychiat.*, 1983, 18, 1205—1267.
8. Haubrich D. R., Denzer J. G.: Simultaneous extraction and fluorimetric measurement of brain serotonin, catecholamines, 5-hydroxyindole acetic acid and homovanilic acid. *Anal. Biochem.*, 1973, 55, 306—318.
9. Olson L., Seiger A., Freedman R., Hoffer B.: Chromaffine cells can innervate brain tissue: Evidence from intraocular double grafts. *Exp. Neurol.*, 1980, 70, 414—426.
10. Ungerstedt U.: 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons: *Europ. J. Pharmacol.*, 1968, 5, 107—110.
11. Ungerstedt U., Averno A., Averno E., Ljunbert T., Ranje C.: Animal model of Parkinsonism. *Advances in Neurology*, Raven Press, New York 1973, 3, 257—271.

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



MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,  
JANINA STANISŁAWSKA, BARBARA KNITTER, DANUTA TALKOWSKA,  
JADWIGA PANKRAC

INFLUENCE OF CYANIDE INTOXICATION ON THE COMPOSITION  
OF MYELIN LIPIDS IN RATS FED DURING DEVELOPMENT  
ON A DIET CONTAINING VARIOUS AMOUNTS OF LIPIDS \*

Department of Neurology, Academy of Medicine, Poznań, Poland

Hypoxemia leading to the clinical syndrome of cerebral hypoxia provokes various changes in the brain tissues, one of which is myelin lesion. The most pronounced syndrome of that kind is known in human pathology under the term of delayed hypoxic encephalopathy (Plum et al. 1962). In these cases only slight neuronal changes and large and massive demyelination are visible. The pathological picture is characterized by diffuse and bilateral destruction of myelin in both hemispheres with preservation of subcortical fibers and pathways in the cerebral trunk (Raine, Schaumburg 1977). A similar diffuse demyelination may be found in fatal cases after cardiac arrest or after cyanide intoxication. In some cases the myelin deterioration may be more focal with lesions of various intensity in the particular cerebral lobes.

The changes in the cerebral lipids in demyelination after CO intoxication (Wender 1963) and in the syndrom of myelinopathy after cardiac arrest (Wender et al. 1964) do not show any significant differences from those typical for the primary demyelinating processes. The exact biochemical mechanism of myelin lesion in hypoxic encephalopathy is not known.

The experimental model used for elucidation of the pathomechanism of hypoxic demyelination is cyanate intoxication. Demyelination may be produced either by injections of minimal increasing doses of potassium cyanide (Bass 1968), or by the action of hydrogen cyanide vapour (Levine, Stypulkowski 1959).

---

\* Investigations supported by the Research Grant No. 10.4.06.3.2. from the Polish Academy of Sciences.



Corpus callosum and the remaining commissural systems are particularly sensitive, and changes in these structures are already visible shortly after intoxication. Demyelination after cyanide intoxication was considered by several authors as resulting from the primary toxic disturbance of myelin metabolism (Bass 1968; Hirano et al. 1967 and others). However, Hirano et al. (1967) found in their ultrastructural studies, that cyanide intoxication produces not only demyelination, but also axonal lesions, and thus, myelin destruction may be secondary.

For solution of the problem, whether cyanide intoxication produces a primary myelin lesion, it seems reasonable to study myelin in animals exposed to the action of this toxic compound at an intensity not leading to myelin destruction, that is in the predemyelinating phase of the experimental disease.

The studies were performed in animals fed during their development on a normal diet or with an improper content of fatty acids. The latter experimental approach seems valuable in the light of our previous studies demonstrating a distinct effect of improper diet during development on the susceptibility of animals to the action of the encephalitogenic antigen (Wender et al. 1985).

#### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white Wistar rats, weighing 200—250 g, exposed to the action of HCN according to the slightly modified method of Levine and Stypulkowski (1959). The animals were placed in a glass chamber, into which a gaseous mixture of air and hydrogen cyanide was introduced. A glass receptacle containing a solution of 10% potassium cyanide, through which air was circulated at a rate of 7 litres/min., was placed between the chamber and a cylinder with compressed air. Under these conditions, after about 10 min., the animals lost their motoric ability, with the exception of an irregular respiratory function. The rats were kept in this state from 15 to 30 minutes according to their clinical symptoms, and then resuscitated by means of pure oxygen.

The above presented experiments were performed: in animals maintained on normal, lipid-deficient and lipid-enriched diets. Pregnant females were divided into three groups, one group was fed an artificially composed diet containing 0.12% of rape seed oil (fat-deficient diet), the second group received the same diet supplemented with 20% of rape seed oil (fat-enriched diet), and the third one, serving as control was fed a diet containing 2% of rape seed oil. The exact formula of the experimental diets is presented in Table 1. The experimental diets were fed to all groups of pregnant rats starting 6 days before the expected delivery and then continued as the only source of food for both the nurs-



Table 1. Formula of the experimental diets

Tabela 1. Zestawienie diet

	Control Dieta kontrolna	Fatty acid deficient diet Dieta z niedoborem kwasów tłuszczowych	Fatty acid enriched diet Dieta wzbogacona w kwasy tłuszczowe
Sucrose Sacharoza	200 g	200 g	200 g
Wheat flower Mąka pszenna	580 g	604 g	400 g
Casine Kazeina	100 g	95 g	150 g
Rape seed oil Olej rzepakowy	20 g	1.2 g	150 g
Potato starch Skrobia ziemniaczana	40 g	40 g	40 g
Sodium chloride Chlorek sodowy	20 g	20 g	20 g
Choline chloride Chlorek choliny	10 g	10 g	10 g
Vitamins (Biovit) Mieszanka witaminowa (Biovit)	30 g	30 g	30 g
kcal/kg	3414	3309	4150

ing mothers and their offsprings, over the whole postnatal period. The nourishing mixture as well as drinking water were available *ad libitum*.

Chemical methods. The chemical studies were performed in groups of animals (6 rats each), sacrificed after 4 hours, 18 hours and 14 days from HCN intoxication.

The myelin fraction was isolated by means of differential centrifugation of the cerebral homogenate in a discontinuous sucrose gradient (0.32 and 0.85 M, pH 7.0) essentially according to Norton and Poduslo (1973). The isolated myelin fraction was washed three times with distilled water, each washing procedure being followed by centrifugation at 75 000 g for 15 min. The final sediment was then lyophilized.

Total lipids of the myelin fraction were extracted by means of the procedure described by Folch-Pi et al. (1957) and then further separated by means of a combined column and thin layer chromatography. Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated with the method described by Svennerholm (1964), and phospholipids with the techniques of Singh et al. (1971). There after, cholesterol was quantitated using the



Table 2. Influence of HCN intoxication on composition of myelin lipids in the rats fed during development diets containing various amounts of lipids in nmol/100 g of dry tissue

Tabela 2. Wpływ zatrucia HCN na obraz lipidów mieliny mózgu szczurów karmionych w czasie rozwoju dietą z różną zawartością lipidów w nmol/100 g suchej tkanki

Lipids Lipidy	Control Norma	4 hours after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN			18 hours after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN			14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN		
		control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów
Cholesterol	31.7±1.1	36.6±1.7	34.5±0.9	39.3±3.4	29.6±1.7	25.0±0.7	22.8±1.7	35.9±3.3	30.6±1.1	30.5±2.4
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.2±0.02	0.9±0.2	1.2±0.2	1.5±0.2	0.3±0.04	0.4±0.06	0.6±0.1	0.4±0.06	0.6±0.06	0.4±0.06
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	25.8±1.2	19.1±0.9	26.4±0.9	27.1±0.9	16.8±0.8	19.8±0.5	20.5±1.3	14.7±0.8	20.3±0.2	26.1±0.6
Cerebrosides Cerebrozydy	22.0±1.2	16.2±0.9	23.1±0.9	23.7±0.9	13.9±0.7	17.3±1.3	27.3±1.2	12.3±0.1	17.3±0.3	23.7±0.6
Sulfatides Sulfatydy	3.8±0.1	2.9±0.2	3.3±1.1	3.4±0.1	2.9±0.2	2.5±0.3	3.2±0.2	2.3±0.2	3.1±0.2	2.4±0.2



Total phospholipids Całkowite fosfolipidy	25.3±3.0	25.2±1.1	25.4±1.1	25.0±1.6	27.8±2.3	32.2±2.8	31.0±1.8	<u>19.6±2.2</u>	25.9±1.2	23.1±1.2
Sphingomyelins Sfingomieliny	2.4±0.1	3.8±0.6	2.4±0.1	2.0±0.2	2.1±0.3	<u>3.9±0.4</u>	2.8±0.2	1.9±0.3	2.2±0.2	1.5±0.2
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	7.5±0.3	7.3±0.7	7.2±0.2	8.1±0.8	<u>3.8±0.6</u>	7.9±0.7	8.6±0.5	<u>5.3±0.4</u>	7.2±0.3	7.3±0.6
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	0.7±0.09	1.1±0.1	<u>2.7±0.6</u>	1.2±0.2	1.7±0.2	1.8±0.5	<u>2.8±0.4</u>	1.5±0.2	0.9±0.4	0.6±0.2
Phosphatidylserine + phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	2.5±0.4	1.8±0.2	<u>0.7±0.2</u>	2.0±0.2	2.2±0.4	<u>4.9±0.6</u>	2.8±0.3	1.8±0.4	2.4±0.5	2.6±0.2
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	3.6±0.3	3.5±0.4	4.0±0.4	3.3±0.5	2.2±0.6	4.2±0.6	4.5±0.8	2.9±0.4	4.3±0.6	3.2±0.8
Plasmalogen Plazmalogen	8.6±0.6	7.6±0.6	8.3±0.7	8.3±0.5	9.8±0.6	<u>3.5±0.4</u>	9.5±0.3	6.3±0.2	8.8±0.4	7.9±0.5

Significant differences underlined

Różnice istotne podkreślono

Mean ± SE

Średnia ± SE

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6



Table 3. Influence of HCN intoxication on composition of myelin lipids in the rats fed during development diets containing various amounts of lipids in % of total lipids

Tabela 3. Wpływ zatrucia HCN na obraz lipidów mieliny mózgu szczurów karmionych dietą z różną zawartością lipidów w % ogólnej zawartości lipidów

Lipids Lipidy	Control Norma	4 hours after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN			18 hours after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN			14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN		
		control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów
Cholesterol Cholesterol	38.2±1.9	44.8±1.7	39.5±0.8	42.3±1.6	39.3±3.3	32.3±1.4	30.4±1.3	50.8±3.5	39.5±4.4	38.1±1.8
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.3±0.1	1.1±0.2	1.3±0.2	1.6±0.5	0.4±0.1	0.5±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	0.8±0.2	0.5±0.1
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	31.1±2.0	23.4±1.3	30.2±0.9	29.2±5.6	22.4±2.5	25.5±1.0	27.4±0.9	20.9±0.6	26.3±3.7	32.6±1.0
Cerebrosides Cerebrozydy	26.5±1.9	19.9±1.0	26.5±1.0	26.5±4.7	18.5±2.2	22.3±0.8	23.0±0.9	17.7±1.2	22.3±3.0	29.6±0.9
Sulfatides Sulfatydy	4.6±0.3	3.5±0.3	3.7±0.1	3.7±0.8	3.9±0.3	3.2±0.4	4.4±0.3	3.2±0.2	4.0±0.8	3.0±0.3
Total phospholipids Całkowite fosfolipidy	30.4±3.1	30.8±2.8	28.9±0.8	26.9±3.6	37.9±5.8	41.8±1.8	41.1±1.8	27.7±2.5	33.4±4.6	28.8±1.8



Sphingomyelins	2.8±0.2	<u>4.7±0.5</u>	2.9±0.2	2.2±0.3	2.8±0.2	<u>5.1±0.4</u>	3.8±0.3	2.7±0.8	2.9±0.4	1.9±0.2
Sfingomieliny										
Phosphatidylcholine	9.1±0.3	8.9±0.7	8.2±0.4	8.7±2.6	12.7±0.7	10.3±0.5	11.5±0.7	7.4±0.6	9.3±1.7	9.1±0.4
Fosfatydylocholina										
Lysophosphatidylcholine	0.9±0.1	1.4±0.2	<u>3.0±0.6</u>	1.3±0.4	<u>2.3±0.3</u>	<u>2.4±0.5</u>	<u>3.8±0.3</u>	<u>2.1±0.3</u>	1.2±0.2	0.7±0.3
Lizofosfatydylocholina										
Phosphatidylserine										
+ phosphatidylinositide	3.0±0.6	2.2±0.2	<u>0.8±0.3</u>	2.2±0.3	3.0±0.3	6.3±0.7	3.7±0.4	2.5±0.6	3.0±1.3	3.3±0.4
Fosfatydyloseryna										
+ fosfoinozytol										
Phosphatidylethanolamine	4.4±0.4	4.3±0.5	4.6±0.5	3.6±0.4	4.2±0.8	5.4±0.8	6.0±0.7	4.1±0.7	5.6±0.7	4.0±0.8
Fosfatydyloetanolamina										
Plasmalogen	10.2±0.6	9.3±0.4	9.4±0.4	8.3±1.5	12.9±0.5	12.3±0.8	12.6±1.8	8.9±0.6	11.4±1.8	9.8±0.8
Plazmalogen										

Significant differences underlined

Różnice istotne podkreślono

Mean ± SE

Średnia ± SE

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6



Table 4. Influence of HCN intoxication on composition of myelin phospholipids in the rats fed during development diets containing various amounts of lipids in % of total phospholipids

Tabela 4. Wpływ zatrucia HCN na obraz fosfolipidów mieliny mózgu szczurów karmionych dietą z różną zawartością lipidów w % ogólnej zawartości fosfolipidów

Phospholipids Fosfolipidy	Control Norma	4 hours after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN			18 hours after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN			14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN		
		control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów
Sphingomyelins Sfingomieliny	9.3±0.7	<u>15.2±1.8</u>	10.1±0.8	8.1±0.4	7.3±2.9	12.1±1.0	9.1±1.1	9.7±1.7	8.7±0.7	6.6±0.6
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	29.8±7.2	29.0±1.0	28.2±1.1	32.5±1.9	33.4±2.1	24.6±2.9	27.8±2.4	26.7±3.1	27.0±2.5	31.6±2.0
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	2.9±1.0	4.6±1.1	<u>10.5±1.1</u>	5.1±1.2	6.0±1.2	5.7±1.0	<u>9.1±0.7</u>	7.6±0.6	3.4±1.3	2.4±0.9
Phosphatidylserine + phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	9.9±1.4	7.1±0.7	2.8±0.8	8.1±1.1	7.9±1.8	15.1±1.6	9.0±0.8	9.0±0.8	9.4±1.8	11.5±1.8
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	14.4±1.6	13.9±2.5	16.8±2.0	13.3±1.2	11.2±1.1	12.9±2.3	14.5±1.5	14.8±1.7	16.7±2.0	13.9±2.7
Plasmalogen Plazmalogen	33.7±1.2	30.2±4.9	32.4±2.2	33.0±2.7	34.2±1.9	29.6±3.4	30.5±2.0	32.2±7.7	34.0±4.3	34.0±1.8

Significant differences underlined

Różnice istotne podkreślono

Mean ± SE

Średnia ± SE

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6



method of Sperry and Webb (1950), cerebrosides and sulfatides were estimated with the techniques of Radin et al. (1965). The phosphor content was determined by the method of Bartlett (1959).

Results were evaluated by statistical methods with the use of Student's t-test.

Histological methods. Morphological evaluation of the experimental disease was based on paraffine embedded slides stained with hematoxyline-eosine, Nissl or Klüver-Barrera methods.

## RESULTS

The clinical observations did not reveal any differences between the experimental groups of animals in the course of exposure to the action of HCN as well as in the following period. The morphological picture did not demonstrate any changes in the commissural systems, characteristic for cyanide encephalopathy in any of the studied groups. The only changes were some rarefactions and degenerative changes of neurocytes in the cerebral and cerebellar cortex. However, no differences were noticed between the particular experimental groups.

Studies of myelin lipids in the group of rats maintained on a normal diet have shown the appearance of cholesterol esters in the early phase after intoxication (4 hours) as the only deviation visible in this experimental phase. The amount of cholesterol esters returned to normal values in the further period after intoxication, concomitantly with the decrease of the total galactolipid content, depending on the decrease of cerebrosides. The decrease was still noticeable in the later period (14 days after intoxication). The changes in the phospholipid pattern were smaller and were found only in the later stage after intoxication (14 days), in which the total phospholipid content decreased, and in the particular phospholipid classes only the phosphatidylcholine content was reduced. The detailed results are presented in Table 1 (in absolute values), in Table 2 (relative percentage to total lipid content), and in Table 3 (relative percentage of the particular phospholipid classes to total phospholipids).

Comparison of the effect of exposure to cyanide intoxication on the myelin lipid pattern between the groups maintained of fat-deficient or fat-enriched diet, over a period ranging from the last week of intrauterine life to their sacrifice, with the control group demonstrates insignificant differences only. Some tendency may be noted in animals developing on a qualitatively improper diet to smaller changes than in those fed normally, however, the differences are too small to be conclusive. The results are presented in Tables 2—4.



## DISCUSSION

The pathomechanism of action of cyanide intoxication on the central nervous system is a very complex one. Cyanide produces not only inactivation of cytochrome oxidase, but it also inhibits markedly active transport of various substances through the biological membranes. Smith and Benjamins in their monograph published in 1977 stressed the significant drop of DNA and ganglioside content in the brain as the result of HCN intoxication, depending in a decisive manner on lesions in the neuroglia membranes. Basing on these studies it would be possible to assume that myelin destruction localized particularly in the commissural system is a secondary effect of alterations in the oligodendroglia function. This hypothesis is not in accord with results of histochemical studies, published by Ibrahim et al. (1963), who observed enzymatic hyperactivity, particularly of several oxidoreductases in the neuroglia in the course of the prodromal period of cyanide encephalopathy. However, it should be added, that the latter findings were not fully confirmed in our studies (Wender et al. 1972a) in which we did not find any correlation between the activity of several hydrolases and oxidoreductases in the neuroglia and the regions where demyelination developed.

In the nervous tissue, in the course of cyanide encephalopathy connected with demyelination, several biochemical alterations have been observed. However, up till now it has not been possible to explain fully the sequence of biochemical events leading to cyanide-provoked demyelination. Demyelination is not preceded by brain edema, connected with penetration of serum proteins to the nervous tissue (Wender et al. 1972b, c). Another important finding was the drop of  $^{14}\text{C}$ -leucine incorporation into brain proteins, with two peaks in the white matter, whereas the second peak was connected with the appearance of demyelination (Wender et al. 1974). The decrease of protein synthesis seems to be related, at least partially, to the inhibitory effect of cyanide on the activity of RNA aminoacyl synthetases in the brain (Wender et al. 1975b).

In our previous investigations of cerebral lipids in experimental cyanide intoxication (Wender et al. 1973) we noticed in the white matter a significant decrease of the content of sphingomyelins, sulfatides, cholesterol and some phospholipids, as well as an increased cholesterol esterification without correlation with the reaction of macrophages. Basing on these results we have assumed that in this experimental disease there occur enzymatic changes associated with cholesterol metabolism in the nervous tissue. The above hypothesis was confirmed by our studies of the fatty acid pattern of cerebral lipids in the white matter (Wender et al. 1975a). That is why we concluded that cholesterol esterification in the myelin is at least one of the primary events in the mechanism of cyanide-induced demyelination. Our actual studies concerning the pre-



demyelinating stage of cyanide intoxication, in which the only lipid alteration in the early period was cholesterol esterification, are in full agreement with the previous investigations. These data confirmed once more our hypothesis, presented already some years ago, that enhanced cholesterol esterification plays a significant, if not a crucial role in the whole mechanism of demyelination. Modifications of the activity of enzymes catalyzing hydrolysis of cholesterol esters and esterification of free cholesterol, as well as changes in the concentration and composition of substrates may provoke enhanced esterification in the myelin sheath, and weaken its structure. This process seems to be independent of the later cholesterol esterification connected with the action of lipomacrophages.

The problem of the influence of the changes in the composition of myelin lipids evoked by an improper diet on the course of demyelinating processes in the central nervous system is hardly known. It has been shown that in multiple sclerosis there exist changes in the relative proportion of saturated and unsaturated fatty acids in the brain lipids, and also that there is a lowered level of linoleate in the serum, platelets, and in red blood cells. However, it has not been established yet, whether the disturbances of fatty acid metabolism in multiple sclerosis might be caused by nutritional factors, by a defect in the metabolic pathways or by an inborn defect of fatty acid metabolism, evoked by dietary factors (Belin et al. 1971; Thompson 1971). Based on these studies therapeutic trials were performed in multiple sclerosis patients with linoleic acid, but they did not lead to any positive results (Dworkin et al. 1984). In the animal model of the neuroallergic disease, experimental allergic encephalomyelitis (EAE), a highly protective action of the diet supplemented with large amounts of linoleate was established by Selivonchick and Johnston (1975). In our studies (Wender et al. 1985) we have found that changes in the fatty acid content in the diet decrease significantly the incidence rate of EAE induced by sensitization with rat cerebral white matter in complete Freund's adjuvant. We assumed, that the changed lipid composition of myelin induced by the improper (undue or overdue) content of fatty acids in the diet decreases the immunological reactivity of animals to the encephalitogenic antigen.

The influence of dietary changes in the course of pathological processes in the brain, provoked by hypoxia is unknown so far. From our observations made in this study, it appears that, in contrast to the very distinct dietary effect on the susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis, the influence on the reaction of central myelin to cyanide intoxication is only insignificant. The myelin lipid spectrum showed only a slight tendency to smaller changes in the experimental conditions of fat deficiency or fat excess during brain maturation, and thus we are not entitled to draw conclusions regarding the dietary effect on the susceptibility of brain myelin to cyanide intoxication.



## CONCLUSIONS

1. In the early period of cyanide intoxication, the only deviation in the myelin lipid spectrum is enhanced cholesterol esterification, confirming the hypothesis of the importance of this phenomenon in the mechanism of structural lesions of myelin membranes.

2. In the later period of cyanide intoxication there occurred some shifts in the proportion of lipidic components of myelin in the form of a decrease in cerebroside content and minor changes in the content of the particular phospholipid classes.

3. Changes in the content of fatty acids in the diet during brain maturation influence only insignificantly the reaction of the myelin lipids to cyanide intoxication.

WPLYW ZATRUCIA CYJANOWODOREM NA OBRAZ LIPIDÓW MIELINY  
MÓZGU SZCZURÓW ŻYWIONYCH W OKRESIE ROZWOJU DIETĄ Z RÓŻNĄ  
ZAWARTOŚCIĄ KWASÓW TŁUSZCZOWYCH

## Streszczenie

Przeprowadzono badania lipidów mieliny po zatruciu cyjanowodorem w grupach szczurów rasy Wistar, żywionych w czasie rozwoju dietą normalną, z niedoborem oraz nadmiarem lipidów.

Badania doprowadziły do następujących wniosków:

1. We wczesnym okresie zatrucia cyjanowodorem jedyną zmianą w lipidach mieliny jest nasiloną estryfikacja cholesterolu, co potwierdza hipotezę o doniosłej roli tego zjawiska w uszkodzeniu struktur błon mieliny.

2. W późnej fazie zatrucia cyjanowodorem dochodzi do zmian we wzajemnym stosunku składników lipidowych mieliny w postaci spadku zawartości cerebrozydów oraz nieznacznych odchyień w zakresie frakcji fosfolipidowych.

3. Zmiany w zawartości kwasów tłuszczowych w diecie w toku rozwoju nie wywierają poważniejszego wpływu na reakcję mieliny na zatrucie cyjanowodorem.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНТОКСИКАЦИИ ЦИАНИСТОЙ КИСЛОТЫ НА СОСТАВ  
ЛИПИДОВ МИЕЛИНА МОЗГА У КРЫС ПИТАЕМЫХ В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ  
ДИЕТОЙ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

## Резюме

Проводились исследования липидов миеллина после интоксикации цианистой кислотой у крыс Вистар, питаемых в период развития обычной диетой с повышенным и пониженным содержанием липидов. Исследования привели к следующим выводам:

1. В ранний период интоксикации цианистой кислотой изменения в липидах миеллина сводятся лишь только к усиленной этерификации холестерина, что подтверждает гипотезу о значительной роли этого явления в процессе повреждения структуры оболочек миеллина.

2. В поздней стадии интоксикации цианистой кислотой приходит к изменениям взаимоотношения липидных составных миеллина в виде понижения содержания cerebroзидов, а также незначительных отклонений на уровне фосфолипидных фракций.

3. Изменения содержания жирных кислот в диете в ходе развития не влияют существенным образом на реакцию миеллина на интоксикацию цианистой кислотой.



## REFERENCES

1. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466—468.
2. Bass N.: Pathogenesis of myelin lesions in experimental cyanide encephalopathy. *Neurology*, 1968, 18, 167—177.
3. Belin J., Pettet N., Smith A., Thompson R., Zilkha K.: Linoleate metabolism in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1971, 34, 25—29.
4. Dworkin R., Bates D., Millar J., Paty D., Show D.: Dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids in acute remitting multiple sclerosis. In: Immunological and clinical aspects of multiple sclerosis. Eds. R. Gonsette, P. Delmotte. MTP Press Limited, Lancaster, Boston 1984, pp. 176—194.
5. Folch-Pi J., Less M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—511.
6. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy. Electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, 1967, 26, 200—213.
7. Ibrahim M., Briscoe Ph. Jr., Bayliss Jr., Adams C.: The relationship between enzyme activity and neuroglia in the prodromal and demyelinating stages of cyanide encephalopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1963, 26, 479—486.
8. Levine S., Stypulkowski W.: Experimental cyanide encephalopathy. *A. M. A. Arch. Pathol.*, 1959, 67, 306—323.
9. Norton N., Poduslo S.: Myelination in rat brains: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—757.
10. Plum F., Posner J., Hein R.: Delayed neurological deterioration after anoxia. *Arch. Intern. Med.*, 1962, 110, 18—25.
11. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determination of cerebroside. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789—796.
12. Raine C., Schaumburg H.: The neuropathology of myelin diseases. In: Myelin Ed. P. Morell. Plenum Press. New York and London, 1977, pp. 271—324.
13. Selivenchick D., Johnston P.: Fat deficiency in rats during development of the central nervous system and susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *J. Nutr.*, 1975, 105, 288—300.
14. Singh H., Spitz M., Geyer B.: Studies of brain myelin in the "quaking mouse". *J. Lipid Res.*, 1971, 12, 473—483.
15. Smith M., Benjamins J.: Model systems for study of perturbations of myelin metabolism. In: Myelin Ed. P. Morell. Plenum Press, New York and London 1977, pp. 447—488.
16. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97—106.
17. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 839—859.
18. Thompson R.: Fatty acid metabolism in multiple sclerosis. *Biochem. Soc. Symp.*, 1972, 35, 103—111.
19. Wender M.: Studies of cerebral lipids in a relapsing case of carbon monoxide poisoning. *Acta Neuropathol.*, 1963, 2, 371—377.
20. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z.: Fatty acid pattern of cerebral lipids in cyanide encephalopathy. *Exp. Pathol.*, 1975a, 41, 233—238.
21. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Goncerzewicz A.: The influence of improper diet during development on the susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 229—244.



22. Wender M., Adamczewska Z., Wajgt A.: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 417—425.
23. Wender M., Jurczyk W., Stengert K.: Cerebral lipids in myelinopathy caused by cardiac arrest. *Acta Neuropath.*, 1964, 4, 238—244.
24. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Histoenzymology of experimental cyanide encephalopathy. *Acta histochem.*, 1972a, 43, 361—371.
25. Wender M., Piechowski A., Wajgt A.: Soluble cerebral proteins in experimental demyelinating processes. *Exp. Path.*, 1972b, 7, 290—297.
26. Wender M., Piechowski A., Wajgt A.: Cerebral proteins in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1972c, 10, 519—527.
27. Wender M., Zgorzalewicz B., Wajgt A.: Protein synthesis in vitro by the rat brain in course of experimental cyanide encephalopathy. *Exp. Path.*, 1974, 9, 140—143.
28. Wender M., Zgorzalewicz B., Wajgt A.: Activity of sRNA-amino acyl synthetases in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1975b, 13, 405—413.

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



EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO

OBRAZ MORFOLOGICZNY MÓZDŻKU  
W PRZEBIEGU PRZEWLEKŁEGO ALKOHOLIZMU \*

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

W dyskusjach nad toksycznym wpływem alkoholu i/lub jego produktów przemiany na rozwój zmian zwyrodnieniowych w ośrodkowym układzie nerwowym autorzy podkreślają zazwyczaj szczególną podatność robaka mózdzku, stwierdzaną zarówno w materiale autopsyjnym, jak i w badaniach doświadczalnych (Okhuma 1930; Courville 1955; Neubürger 1957; Seitelberger, Gross 1962; Meyer 1963; Colmant 1965; Fracp 1974). Wydawało się więc celowe prześledzenie czy przewlekłe nadużywanie alkoholu ogranicza się w mózdzku do uszkodzenia robaka oraz czy i jaki wpływ wywiera ono na inne struktury mózdzku. Istotne wydaje się również pytanie, czy długi czas trwania nałogu przyspiesza proces inwolucyjny w mózdzku. Zadaniem pracy była więc szczegółowa ocena struktury i topografii zmian w mózdzku w przypadkach przewlekłego alkoholizmu w różnych przedziałach wieku.

MATERIAŁ I METODY

Materiał pochodzi ze zbiorów Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego i obejmuje 50 przypadków sekcyjnych chorych nadużywających przewlekłe alkoholu, zmarłych w oddziałach psychiatrycznych. Z badań wyłączono przypadki powikłane cukrzycą, mocznicą oraz przypadki, w których w badaniu mikroskopowym stwierdzono obecność nowotworu.

Do badania histopatologicznego pobrano w płaszczyźnie czołowej półkule mózdzku z robakiem oraz wycinki mózgowe ze wszystkich reprezentatywnych okolic\*\*. Materiał zatapiano w parafinie. Skrawki barwiono

\* Praca wykonana w ramach Problemu Międzyresortowego Nr VII.01.

\*\* Zmiany patologiczne mózgu w większości badanych przypadków zostały omówione szczegółowo w pracy autorki na temat „Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowego w przewlekłym alkoholizmie” (1978).



fioletem krezyłu, H—E, według metody van Gieson, Spielmeyera, Bielschowskiego i Kanzler—Arendta.

W grupie 50 przebadanych przypadków było 45 mężczyzn i 5 kobiet, zmarłych w wieku od 25 do 75 lat. Zgodnie z założeniem pracy i z danymi z piśmiennictwa dotyczącymi nasilenia zmian inwolucyjnych, materiał podzielono na 2 grupy, według kryterium wieku.

Grupa I obejmowała 29 chorych w wieku od 25 do 60 lat; średnia wieku wynosiła 43 lata. U 16 chorych okres nadużywania alkoholu wynosił średnio 15 lat. U pozostałych chorych czas trwania nałogu był nie do ustalenia. Najczęściej w wywiadzie powtarzało się określenie „długo”. W przebiegu nałogu u 17 chorych występowało ostre majaczenie alkoholowe, a u 3 chorych przewlekła halucynozja alkoholowa. Badaniem psychiatrycznym u wszystkich chorych stwierdzono zespół psychoorganiczny o różnym nasileniu, prowadzący w 4 przypadkach do ciężkiego otępienia. U 20 chorych stwierdzono charakteropatię alkoholową. W stanie neurologicznym dominowały w 14 przypadkach rozsiane objawy uszkodzenia oun, w 6 przypadkach z zaburzeniami chodu typu ataktycznego.

Przyczyną zgonu w 17 przypadkach było ostre majaczenie alkoholowe, w 4 — krwotok podtwardówkowy, a w pozostałych 8 — zapalenie płuc. Badaniem sekcyjnym w 18 przypadkach stwierdzono marskość wątroby ze stłuszczeniem, w 8 — uszkodzenie mięszu nerek, w 16 — zmiany zwyrodnieniowe mięśnia sercowego oraz w 9 przypadkach owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy.

Grupa II obejmowała 21 chorych w wieku od 61 do 75 lat; średnia wieku wynosiła 66 lat. U 9 chorych nadużywanie alkoholu trwało średnio 32 lata. U pozostałych chorych trwało również kilkadziesiąt lat. Ilość jednorazowo spożywanego alkoholu, jak i częstość jego nadużywania była, podobnie jak w grupie I, nie do ustalenia. W przebiegu nałogu u 10 chorych występowało ostre majaczenie alkoholowe. Przewlekłą psychozę alkoholową miało 7 chorych. W 21 przypadkach stwierdzono zespół psychoorganiczny, u 16 chorych ze znacznym otępieniem, a u 12 chorych — charakteropatię alkoholową. W stanie neurologicznym dominowały (19 przyp.) rozsiane objawy uszkodzenia oun, w 6 przypadkach zaburzenia mózdkowe głównie ataktyczne chodu i dysartria. Przyczyną zgonu u 7 chorych było ostre majaczenie alkoholowe, u 5 — krwotok podtwardówkowy, u 7 — zapalenie płuc, w 2 przypadkach — skaza krwotoczna w przebiegu marskości wątroby. Badaniem sekcyjnym stwierdzono marskość wątroby ze stłuszczeniem w 20 przypadkach, zwyrodnienie mięśnia sercowego w 9 przypadkach, uszkodzenie mięszu nerek w 13, owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy w 10 przypadkach.

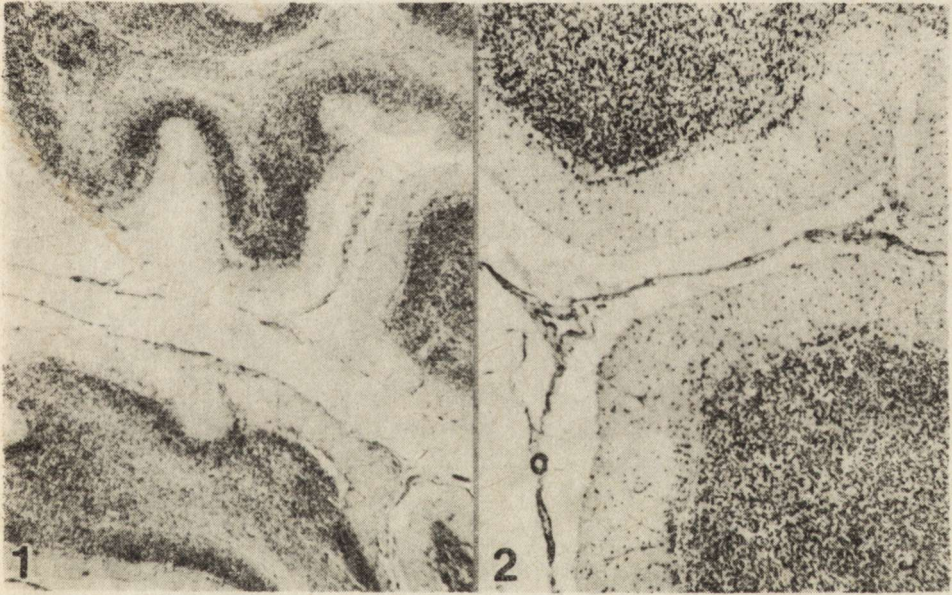


## WYNIKI

## Grupa I

Badanie makroskopowe mózgu wykazało w 18 przypadkach zmiany zanikowe. W 14 przypadkach obecny był obrzęk mózgu. Miażdżycę w naczyńach podstawy stwierdzono w 6 przypadkach. W 2 przypadkach stwierdzono zmniejszenie objętości mózdzku ze skróceniem i zwężeniem jego listeczków, głównie w obrębie grzbietowej części robaka.

Badanie mikroskopowe mózdzku wykazało w obrębie dna rowków znaczne zwężenie zarówno warstwy drobinowej, jak i warstwy ziarnistej. W dalszym otoczeniu rowków i na wypukłości listeczków zwężenie tych warstw występowało w sposób rozsiany w 23 przypadkach. Na wypukłości listeczków, zwłaszcza płacików obwodowych, warstwa ziarnista dość często była poszerzona, a komórki uległy rozsunięciu. We wszystkich przypadkach stwierdzono zanik komórek Purkiniego, przy czym największe ubytki obserwowano w otoczeniu rowków. W powiększeniu lupowym widoczne były tylko pojedyncze zachowane komórki Purkiniego,



*Ryc. 1.* Rozlane ubytki komórek Purkiniego, przerost i rozplem gleju Bergmanna, miejscami widoczne krzaczki glejowe, rozsiane przerzedzenia i plackowate ubytki warstwy ziarnistej. Fiolet krezyłu. Pow. 25 ×

*Fig. 1.* Diffuse loss of Purkinje cells, proliferation and hypertrophy of Bergmann's glia, glial shrunken areas in the molecular layer, disseminate rarefactions and patchy loss of nerve cells in the granular layer. Cresyl violet. × 25

*Ryc. 2.* Rozlane ubytki komórek Purkiniego, przerzedzenie komórek nerwowych w warstwie ziarnistej, wielorzędowy rozplem gleju Bergmanna. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×

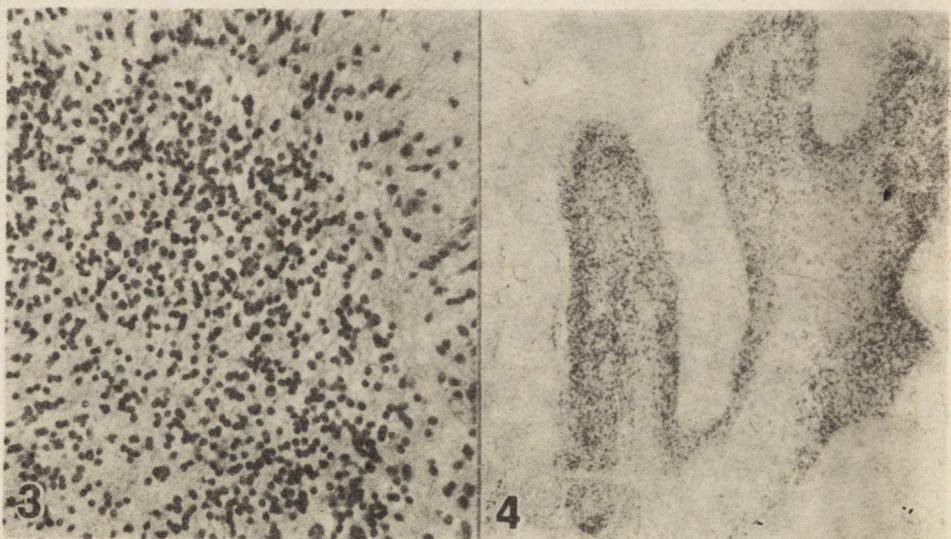
*Fig. 2.* Diffuse atrophy of Purkinje cells, cellular rarefaction in the granular layer, remarkable hypertrophy of Bergmann's glia layer. Cresyl violet. × 60



a w płacikach głęboko położonych całe listeczki były na ogół pozbawione tych komórek (ryc. 1).

W migdałkach mózdzku, na pograniczu robaka i półkul mózdzku oraz w otoczeniu bruzdy horyzontalnej na pograniczu unaczynienia tętnicy mózdzku górnej i tętnic mózdzku dolnych, ubytki komórek Purkiniego przechodziły w 6 przypadkach również na płaciki obwodowe. Ubytkom komórek Purkiniego towarzyszyło z reguły przerzedzenie komórek nerwowych warstwy ziarnistej o różnym nasileniu. Przestrzenie między komórkami były równomiernie poszerzone (ryc. 2), bądź też obserwowano plackowate wyłysienia lub zgąbczenia (ryc. 1). Niekiedy całe listeczki wykazywały znaczne przerzedzenie komórek nerwowych (ryc. 3), a warstwę drobinową oddzielał od warstwy ziarnistej, przy braku komórek Purkiniego, wał bujającego gleju gwiaździstego Bergmanna (ryc. 4). W zwężonej warstwie drobinowej obserwowano zagęszczenie komórek nerwowych i jąder komórek glejowych.

Zachowane komórki Purkiniego ulegały zaokrągleniu, miały zazwyczaj skrócone i poszerzone wypustki (ryc. 5), były zmienione homogenizacyjnie (26 przyp.), bądź przewlekle (23 przyp.) (ryc. 6), najrzadziej



Ryc. 3. Rozsiane ubytki w warstwie ziarnistej o rozluźnionej strukturze podłoża, zanik komórek Purkiniego, pobudzenie gleju Bergmanna. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 3. Disseminate loss of cells in the granular layer which exhibits loosening of the background, atrophy of Purkinje cells and proliferation of Bergmann's gliosis. Cresyl violet. × 200

Ryc. 4. Zwężenie warstwy drobinowej i warstwy ziarnistej, rozlane ubytki komórek Purkiniego, rozrost gleju Bergmanna, znaczne ubytki komórek warstwy ziarnistej. Fiolet krezyłu. Pow. 25 ×

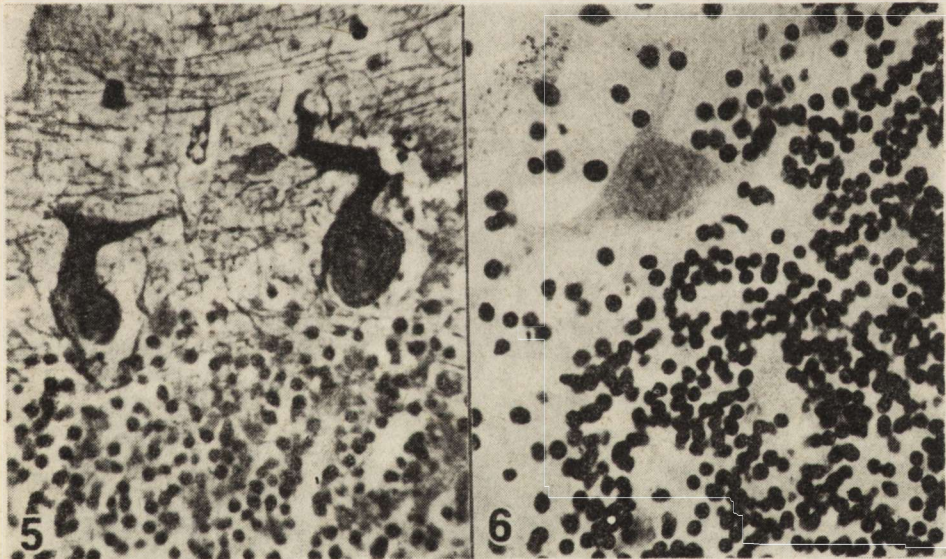
Fig. 4. Reduction of molecular and granular layers, Purkinje cells atrophy and proliferation of Bergmann's gliosis, marked loss of cells in the granular layer. Cresyl violet. × 25



uległy stłuszczeniu (4 przyp.). Czasami (6 przyp.) obserwowano przesunięcie pojedynczych komórek Purkiniego do warstwy drobinowej. Komórki nerwowe warstwy ziarnistej zazwyczaj wybarwiały się ciemno, były obkurczone, miały nierówne obrysy (ryc. 7). Część komórek tej warstwy barwiła się blado fioletem krezyłu, a w impregnacji według metody Bielschowskiego nie ujawniała się w ogóle. Zmiany te zazwyczaj obserwowano na wypukłości listeczków, zwłaszcza obwodowych w obrębie poszerzonej i ogniskowo zgąbczałej warstwy ziarnistej (5 przyp.).

Nasilenie ubytków komórkowych było w 6 przypadkach większe w robaku niż w półkulach mózdzku. W części grzbietowej półkul było większe, z wyjątkiem dwóch przypadków, w których były one bardziej nasilone w częściach brzusznych. Ubytki komórkowe zwiększały się w kierunku listeczków i płacików głęboko położonych, natomiast sklerotyzację płacików najczęściej spostrzegano w obszarach narażonych na wgłobienie lub w obszarach pogranicza unaczynienia.

W jądrach mózdzku, zwłaszcza w jądrze zębatym spostrzegano przedrudzenie neuronów, zwłaszcza ugrupowania wielkokomórkowego oraz znaczne złogi lipofuscyny w zachowanych komórkach. Spłowienie i uszkodzenie osłonek mielinowych obserwowano w osiach zawojów oraz w



Ryc. 5. Komórki Purkiniego z poszerzonymi dendrytami, nierównomierna impregnacja uszkodzonych komórek nerwowych warstwy ziarnistej. Bielschowsky. Pow. 400  $\times$

Fig. 5. Purkinje cells with dilated dendrites, uneven impregnation of damaged nerve cells in the granular layer. Bielschowsky.  $\times 400$

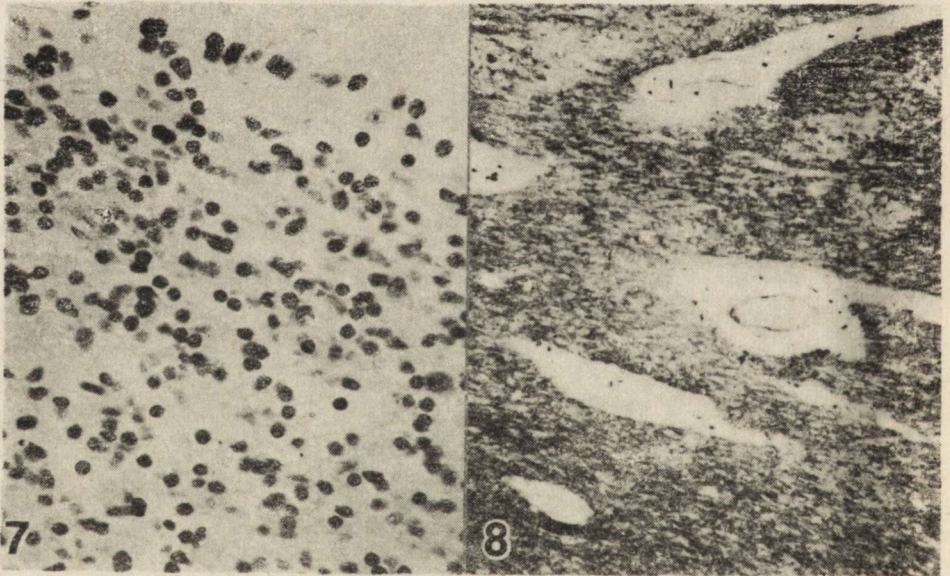
Ryc. 6. Zmiany homogenizacyjne komórki Purkiniego, warstwa ziarnista zachowana. Fiolet krezyłu. Pow. 400  $\times$

Fig. 6. Homogenous changes of Purkinje cell, granular layer preserved. Cresyl violet.  $\times 400$



listeczkach głęboko położonych. Czasami zblednięcie mieliny przechodziło na istotę białą półkul. Zgąbczeniom okołonaczyniowym odpowiadała demielinizacja (ryc. 8). Zanikom i schorzeniom komórek Purkiniego towarzyszył znaczny rozplem i przerost gleju gwiaździstego Bergmanna. Tworzył on wielorzędowe pasma oddzielające warstwę drobinową od warstwy ziarnistej (ryc. 1, 4), rzadko natomiast obserwowano w warstwie drobinowej krzaczkę glejowe. W jądrze zębatym również widoczne było zagęszczenie i przerost komórek glejowych, natomiast w istocie białej półkul mózdzku, zazwyczaj u nasady płacików spostrzegano zagęszczenie jąder komórek glejowych i ich postaci przerostowe oraz pojedyncze grudki glejowe. Glejoza włóknista była wzmożona w centralnych partiach istoty białej. Ze zmian wstecznych gleju tylko w 6 przypadkach obserwowano „nagie jądra”.

Naczynia śródmiąższowe mózdzku, włócniczki, tętniczki i małe tętnice w 17 przypadkach były zwłókniałe rzadziej zeszkliwiałe (8 przyp.). Tkanina otaczająca naczynia była w tych przypadkach rozluźniona, zgąbczała, a w 10 przypadkach obserwowano niewielkie jamki okołonaczyniowe w istocie białej. Obecność kłębków naczyniowych stwierdzono w 10 przypadkach.



Ryc. 7. Nierównomiernie wybarwione komórki warstwy ziarnistej w robaku. Obok okrągłych neuronów widoczne komórki o nieregularnych obrysach lub blade i rozpadające się. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×

Fig. 7. Unevenly stained cells in the granular layer of cerebellar vermis. Alongside with normal round neurons, cells of irregular shape or pale and disintegrating are visible. Cresyl violet. × 400

Ryc. 8. Demielinizacja wokół naczyń istoty białej mózdzku. Spielmeyer. Pow. 60 ×

Fig. 8. Perivascular demyelination in cerebellar white matter. Spielmeyer. × 60



*Grupa II*

Badanie makroskopowe mózgu wykazało we wszystkich przypadkach zmiany zanikowe, najczęściej uogólnione. Obrzęk mózgu stwierdzono w 12 przypadkach. Zmiany miażdżycowe obecne były w 16 przypadkach. Prawie we wszystkich przypadkach (w 18 na 21 przebadanych) obserwowano zmniejszenie objętości móźdźku ze skróceniem płacików. W 5 przypadkach zmiany były bardziej nasilone w robaku niż w półkulach móźdźku.

W badaniu mikroskopowym struktura i topografia zmian patologicznych w półkulach móźdźku na ogół nie różniła się od obserwowanych w grupie I. Natomiast nasilenie tych zmian było większe, zwłaszcza w robaku móźdźku. Częściej niż w grupie I obserwowano w robaku móźdźku obrzęk warstwy ziarnistej lub jej zgąbczenie i znaczne przerzedzenie komórek nerwowych (7 przyp.). Większe też było nasilenie ubytków komórek Purkinjego w robaku, w którym liczne płaciki były ich zupełnie pozbawione. Częściej też obserwowano w grupie II stłuszczenie komórek Purkinjego (6 przyp.), a we wszystkich przypadkach wybitne nagromadzenie lipofuscyny w komórkach nerwowych jądra zębatego. Glejoza włóknista brzeźna oraz w osi zwojów była wzmożona.

We wszystkich przypadkach naczynia śródmiażdżowe: włosniczki, tętniczki i małe tętnice były zwłókniałe, rzadziej zeszkliwiałe (9 przyp.). Prawie we wszystkich przypadkach (19) stwierdzono zgąbczenia lub jamki okołonaczyniowe w istocie białej półkul móźdźku. Kłębki naczyniowe obserwowano w 12 przypadkach.

Płytek starczych nie zaobserwowano w móźdźku w żadnym z przebadanych przypadków tak I, jak i II grupy.

## OMÓWIENIE

W przebadanym materiale, obejmującym 50 przypadków sekcyjnych przewlekłego alkoholizmu, struktura i topografia obserwowanych zmian patologicznych sugeruje zróżnicowany patomechanizm rozwoju uszkodzeń strukturalnych móźdźku.

Do klasycznego obrazu uszkodzenia móźdźku w przebiegu alkoholizmu zaliczamy i my za innymi autorami (Victor i wsp. 1959; Pentschew 1958; Stark 1967; Torvik i wsp. 1982) uszkodzenie robaka, a zwłaszcza jego górnej części. Przebiegało ono pod postacią zwężenia płacików, rozległych ubytków komórek nerwowych warstwy ziarnistej i/lub komórek Purkinjego z równoczesnym wielorzędownym rozrostem gleju gwiaździstego Bergmanna. Uszkodzenie robaka stwierdzono w obu grupach z tym, że częściej i bardziej nasilone było ono w przypadkach wieku podeszłego, powyżej 60 roku życia (grupa II), gdzie występowało w 1/3 liczby przypadków, natomiast w grupie I obejmującej przypadki poniżej 60 ro-



ku życia w 1/5 liczby przypadków. W obu grupach rozwijało się ono prawie zawsze na tle uogólnionego procesu zanikowego mózdzku, uchwytne go już makroskopowo prawie we wszystkich przypadkach grupy II.

Wykładnikami mikroskopowymi zmian inwolucyjnych w mózdzku były zwyrodnienie tłuszczowe i schorzenie przewlekłe neuronów, ubytki komórek nerwowych, obecność kłębków naczyniowych oraz wzmożona glejoza graniczna.

Wiadomo, że w przewlekłym alkoholizmie robak mózdzku stanowi *locus minoris resistentiae*, jednakże patogeneza jego uszkodzenia podobnie jak innych struktur mózgu czy mózdzku nie jest jasna. Nadal otwartym pozostaje zagadnienie, czy alkohol doprowadza do wybiórczego nasilenia zmian tej struktury bezpośrednio zaburzając metabolizm komórek nerwowych (działanie toksyczne), czy też pośrednio, powodując u alkoholików niedobory składników odżywczych (Victor i wsp. 1959; Seitelberger, Gross 1962; Stark 1967; Dreyfus 1974).

Drugim czynnikiem potęgującym wybiórcze nasilenie uszkodzeń struktur mózdzku były znaczne zmiany stwardnieniowe, a zwłaszcza zwłóknienie ścian włóściczek, tętniczek i małych tętnic śródmiaższowych, zewężających nierzadko światło tych naczyń. Przekraczało ono nasileniem obserwowany zazwyczaj nawet w wieku podeszłym II° zmian stwardnieniowych według klasyfikacji Światowej Federacji Neurologii (1959) (Tarnowska-Dziduszko 1973).

Często obserwowany w przebadanym materiale zastój krwi w mózdzku, wzmożona przepuszczalność ścian naczyniowych, jeziorka włóknika, niewielkie krwinkotoki, zgębczenia okołonaczyniowe i jamki wskazują na przewlekłe zakłócenie w funkcjonowaniu bariery krew-mózg. Podobne zmiany obserwowano u alkoholików w strukturach mózgu (Tarnowska-Dziduszko i wsp. 1978). Rozkład ubytków komórek Purkinjego i warstwy ziarnistej, demielinizacja osłonek mielinowych w osi zawojów mózdzku oraz w pobliżu naczyń sugerują, że podłożem obserwowanych zmian jest niedokrwienie mózdzku. Specyfika unaczynienia mózdzku oraz odmienna wrażliwość elementów strukturalnych kory mózdzku na niedotlenienie, może wyjaśnić wybiórczość tej topografii.

Jak wynika z badań Scholza (1949) najbardziej wrażliwa na niedotlenienie jest warstwa komórek Purkinjego. Ona też, nie posiadając własnej siateczki włóściczek (Uchimura 1929; Jansen, Brodal 1958) jest szczególnie wrażliwa na zakłócenia w krążeniu krwi w głównych pniach tętniczych lub żylnych. Uszkodzenie komórek nerwowych tej warstwy w przebiegu niedokrwienia wyraża się obrzękiem wypustek, schorzeniem homogenizacyjnym czy przewlekłym, a z czasem zanikiem zwłaszcza w obrębie listeczków w centralnie położonych płacikach. W warstwie ziarnistej natomiast w przebiegu niedokrwienia rozwija się beztlenowa glikoliza (Friede 1963), która doprowadza do obrzęku, a z czasem do dalszego uszkodzenia neuronów, ich zaniku i zgębczenia tkanki. Rozkład topograficzny



obrzęku, zgańczenia czy zaniku warstwy komórek Purkiniego występujący w naszym materiale w sposób rozszany w okolicach szczególnie narażonych na niedokrwienie (na pograniczu rejonów unaczynienia, w migdałkach móźdźku, na krawędzi robaka, w centralnie położonych płacikach) w świetle przytoczonych danych nie budzi wątpliwości co do ischemicznego patomechanizmu ich powstawania.

Na podstawie naszych obserwacji wydaje się, że nadużywanie alkoholu nasila zmiany zwyrodnieniowe w ścianie naczyń śródmiaższowych móźdźku, podobnie jak w półkulach i pniu móźgu, co uprzednio stwierdzono w przypadkach w przedziale wieku do 55 lat, (Tarnowska-Dziduszek i wsp. 1978). Zwłóknienie ścian naczyń wyrażnie dominuje nad ich zeszkliwieniem. Patogeneza nasilenia zmian stwardnieniowych w ścianach naczyń śródmiaższowych móźgu czy móźdźku w przewlekłym alkoholizmie nie jest łatwa do wyjaśnienia. Podkreślano bądź pierwotne uszkodzenie śródbłónka naczyń (Scholz 1938, Löken 1971) ze zwiększoną tendencją do odczynu włóknotwórczego komórek ściany naczyniowej, bądź też przytaczano w przewlekłym alkoholizmie wypadanie sterującej funkcji jąder wegetatywnych wzgórze i podwzgórze, szczególnie wrażliwych na niedobór tiaminy (Pentschew 1958, Meyer 1963). Zmiany zwyrodnieniowe miąższu nerek i wątroby obserwowane m. in. w poszczególnych przypadkach mogły również przyczynić się do zwiększenia uszkodzeń ścian naczyń w oun. Tak więc nasilenie zmian stwardnieniowych w naczyniach śródmiaższowych móźdźku, przy całym złożonym patomechanizmie powstawania zmian strukturalnych w móźdźku w przebiegu niedokrwienia, modyfikuje obraz morfologicznych uszkodzeń związanych bezpośrednio lub pośrednio z przewlekłą intoksykacją alkoholową. Robak móźdźku, jakkolwiek w wielu przypadkach znacznie uszkodzony, nie był jedyną zmienioną strukturą.

Istotnym zagadnieniem jest uboga manifestacja objawów klinicznych w badanym materiale, w którym stosunkowo rzadko obserwowano zespoły móźdźkowe. Nie zawsze jednak można było u chorych ze znacznie nasilonym zespołem otępiennym przeprowadzić dokładną ocenę odchyłeń neurologicznych. Poza tym, tak jak w innych schorzeniach zwyrodnieniowych móźdźku, wolno narastające uszkodzenia są długo kompensowane.

#### WNIOSKI

1) Struktura i topografia zmian patomorfologicznych występujących w móźdźku w przewlekłym alkoholizmie wskazują na zróżnicowany patomechanizm ich rozwoju.

2) Przewlekły alkoholizm powoduje:

a) przyspieszenie lub nasilenie występowania zmian inwolucyjnych w móźdźku,



b) zmiany zwyrodnieniowe w mózdzku szczególnie w obrębie robaka, a zwłaszcza w jego części grzbietowej,

c) zmiany zwyrodnieniowe w naczyniach, a zwłaszcza zwłóknienie ściany włosniczek, tętniczek i małych tętnic śródmiąższowych mózdzku nierzadko ze zwiększeniem ich światła.

3) Zmiany w tkance otaczającej naczynia śródmiąższowe mózdzku wskazują na przewlekłe zaburzenia w funkcjonowaniu bariery krew-mózg.

4) Rozkład topograficzny ubytków komórek Purkiniego oraz obrzęku, zgałczenia i zaniku warstwy ziarnistej wskazuje na niedokrwienny patomechanizm ich powstawania.

### МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА МОЗЖЕЧКА В ХОДЕ ХРОНИЧЕСКОГО АЛКОГОЛИЗМА

#### Резюме

Исследованию подвергались характер и топография изменения в мозжечке в 50 случаях хронического алкоголизма. Было предположено, что хронический алкоголизм вызывает не только повреждение червячка но охватывает тоже другие структуры мозжечка. Исследования проводились в двух группах. Первая состояла из 29 больных в возрасте 25 — 60 лет; время употребления алкоголя — в среднем 15 лет. Вторая группа состояла из 21 больного в возрасте 60—75 лет; время употребления алкоголя у 9 больных — в среднем 32 года, у всех остальных — несколько десятков лет.

Дегенеративные изменения червячка, особенно его верхней части, были обнаружены в обеих группах, с тем что чаще и сильнее они проявлялись во второй группе. Почти всегда они развивались на фоне обобщенного атрофического процесса, который макроскопически наблюдался почти во всех случаях II группы. Микроскопными показателями инволюционных изменений были: липидная дегенерация, хронические изменения и убыль нейронов, а также наличие сосудистых клубков и усиленный глиоз. Кроме того было установлено усиление артериосклеротических изменений, особенно фиброза капилляров, артериол и мелких интерстициальных артерий, с сопровождающим сужением их просвета. Они превышали даже склеротические изменения в интерстициальных сосудах мозжечка, свойственные для пожилого возраста. Изменения в ткани, окружающей интерстициальные сосуды показывали хроническое расстройство барьера кровь-мозг. Самые большие убыли клеток Пуркинье, а также отёк, спонгёз и атрофия зернистого слоя выступали рассеянным образом в районах, подверженных местному малокровью: на границе районов васкуляризации, в миндалинах мозжечка, на краю червячка а также в центрально расположенных дольках.

Обсуждается сложный патомеханизм развития структурных изменений мозжечка, связанных так с прямым или посредственным токсическим влиянием алкоголя как и со спецификой васкуляризации мозжечка а также с особой чувствительностью элементов коры мозжечка к недостатку кислорода.

### PATHOMORPHOLOGY OF THE CEREBELLUM IN THE COURSE OF CHRONIC ALCOHOLISM

#### Summary

The character and topography of morphological changes in the cerebellum of 50 autopsy cases with chronic alcoholism were evaluated to establish if chronic alcohol abuse causes damage only to the vermis or also involves the other cerebellar structures.



Studies were performed on material divided into two groups: group I comprised 29 cases aged 25—60 years. The average period of alcohol abuse was 15 years. Group II comprised 21 cases aged 61—78 years. The average period of alcohol abuse lasted 32 years in 9 patients, in the remaining persons even longer.

Degenerative changes in the cerebellar vermis especially in its upper part, were discovered in both of the investigated groups, being of greater intensity and more frequently present in the older group. These changes developed in both groups investigated almost always against a background of diffuse cerebellar atrophy, macroscopically detected in nearly all cases of the older group.

Microscopic exponent of the involutive process were sudanophylic degeneration and chronic changes of nerve cells, neuronal loss, the presence of vascular glomeruli and increased physiological gliosis. Sclerotic changes of intracerebellar blood vessels, especially fibrosis of capillaries, arterioles and small arteries, were more advanced than normally observed in the brains of patients of older age. Perivascular tissue changes indicated chronic disturbances of the blood-brain barrier permeability.

The most remarkable loss of Purkinje cells, edema, sponginess and atrophy of the granular layer were found at the border zones of the vascularization regions (in the cerebellar tonsillae, the vermis edge and centrally located lobuli).

The complex pathomechanism of the development of structural abnormalities was discussed. These are on the one hand directly or indirectly resulted from the toxic alcohol's action on nerve cell metabolism and on the other hand were conditioned by the specific vascularization of the cerebellum and the particular vulnerability of the cerebellar cortex to hypoxia.

#### PIŚMIENICTWO

1. Colmant J. J.: Encephalopathien bei chronischem Alkoholismus. Forum der Psychiatrie. F. Enke, Stuttgart 1965, 1—92.
2. Courville C. B.: Effects of alcohol on the nervous system of man. San Lucas Press, Los Angeles 1955.
3. Dreyfus P. M., Diseases of the nervous system in alcoholics. W: The biology of alcoholism. Red. B. Kirsin, H. Begleiter. Plenum Press, New York-London 1974, vol. 3, 265—290.
4. Fracp M. P.: Alcohol and the nervous system. New Zeal. Med. J., 1974, 79, 602—607.
5. Friede R. L.: Cerebellar edema. A metabolic and cell statistical analysis. Arch. Neurol., 1963, 8, 67—81.
6. Jansen J., Brodal A.: Das Kleinhirn. Hdb. der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer, Berlin 1958, vol. IV/B, 93—164 i 278—280.
7. Löken A. Ch.: Ethylalcohol. W: Pathology of the nervous system. Red. J. Minckler, Mc Graw-Hill Inc., New York 1971, vol. 2, 1671—1678.
8. Meyer A.: Nutritional deficiencies and disorders. W: Greenfield's neuropathology. Red. W. Blackwood, W. H. McMenemey, A. Meyer, R. M. Norman, D. S. Russel. Arnold, London 1963, 288—323.
9. Neubürger K. T.: The changing neuropathologic picture of chronic alcoholism. A.M.A. Arch. Path., 1957, 63, 1—6.
10. Okhuma T.: Zur pathologischen Anatomie des chronischen Alkoholismus. Z. ges. Neurol. Psychiat., 1930, 12, 94—128.
11. Oppenheimer D. R.: Diseases of the basal ganglia, cerebellum and motor neuron. W: Greenfield's neuropathology. Red. W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. Arnold, London 1976, 608—651.



12. Pentschew A.: Äthylalkoholvergiftung. W: Hdb. der spez. pathol. Anatomie und Histologie. Red.: O. Lubarsch, F. Henke, R. Rössle. Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg 1958, vol. 13/2B, 2214—2261.
13. Scholz W.: Studien zur Pathologie der Hirngefäße. Z. Neurol. Psychiat., 1938, 162, 694—715.
14. Scholz W.: Histologische und topische Veränderungen und Vulnerabilitätsverhältnisse im menschlichen Gehirn bei Sauerstoff-mangel, Ödem und plasmatischen Infiltrationen. Arch. Psychiat. Z. Neurol., 1949, 181, 621—650.
15. Seitelberger F., Grross H.: Zur Neuropathologie des Alkoholismus. W: Arbeitstagung über Alkoholismus. Wien, 1—3 October, 1962, 12—30.
16. Stark J.: Kleinhirnwurmatrophie und chronischer Alkoholismus. Schweiz. Arch. Neurol., 1967, 99, 40—82.
17. Tarnowska-Dziduszko E.: Obraz morfologiczny mózdzku w procesie starzenia się. Neuropat. Pol., 1973, 11, 199—208.
18. Tarnowska-Dziduszko E.: Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowatego w przewlekłym alkoholizmie. Neuropat. Pol., 1978, 16, 587—597.
19. Tarnowska-Dziduszko E., Markiewicz D., Szemis L.: Morfologia śródmiaższowych naczyń krwionośnych mózgu w przewlekłym alkoholizmie. Neuropat. Pol., 1978, 16, 399—412.
20. Torvik A., Lindbac Ch. F., Rodge S.: Brain lesions in alcoholics. J. Neurol. Sci., 1982, 56, 233—248.
21. Uchimura Y.: Über die Blutversorgung der Kleinhirnrinde und ihre Bedeutung für die Pathologie des Kleinhirns. Z. ges. Neurol. Psychiat., 1929, 120, 774—782.
22. Victor M., Adams R. D., Mancall E. L.: A restricted form of cerebellar cortical degeneration occurring in alcoholic patients. Arch. Neurol. (Chic.), 1959, 1, 579—588.

Adres autorki: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Al. Sobieskiego 1/9, 02—957 Warszawa.



IRENA BORKOWSKA, DANUTA JESIONEK,  
JANUSZ SOLSKI\*, BARBARA WÓJCICKA \*\*

## POZIOM AMIN KATECHOLOWYCH W MÓZGU KRÓLIKA PT

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej Akademia Medyczna, Lublin

W Ośrodku Doświadczalnym Neurologii Porównawczej CMDiK PAN w Mińsku Mazowieckim od wielu lat prowadzone są badania ośrodkowego układu nerwowego u królika z dziedziczną drżączką porażną (*paralytic tremor*, symbol genetyczny pt). Wyniki dotychczasowych prac stanowią obszerną dokumentację kliniczno-morfologiczną, która pozwala na syntetyczną charakterystykę obrazu choroby. Z badań tych wynika, że królik pt jest mutantem, u którego występuje zaburzenie procesu mielinogenezy, współistniejące z rozszanym uszkodzeniem neuronów, głównie struktur podkorowych i pnia mózgu (Taraszewska, Zelman 1981; Zelman, Taraszewska 1984). Kierunek badań biochemicznych na modelu mutantu pt zapoczątkowały prace Walda i wsp. (1976) oraz Czartoryskiej i wsp. (1976). Wymienieni autorzy na podstawie oznaczeń ceruloplazminy, cholesterolu, lipidów i kwasu moczowego w surowicy krwi królików pt wykluczyli wstępne hipotezy patogenetyczne w interpretacji objawów klinicznych i morfologicznych u królika pt.

Zespół pt klinicznie charakteryzuje się przede wszystkim zaburzeniami ruchowymi w postaci drżeń, które wyprzedzają rozwijające się później niedowłady lub bezwłady spastyczne. Występowanie drżeń różnego typu stanowi charakterystyczną cechę obrazu klinicznego u wszystkich mutantów z hipomielinizacją i jest czasowo zbieżne z okresem intensywnego rozwoju osłonek mielinowych. Ponieważ drżenia u królika pt są zrytmizowane, podobnie jak u ludzi z parkinsonizmem, któremu towarzyszą zmiany w poziomie dopaminy, podjęto badania dotyczące metabolizmu amin katecholowych u królika pt.

---

\* Klinika Nefrologii AM w Lublinie.

\*\* Członek Koła Naukowego przy Katedrze Chemii Fizjologicznej AM w Lublinie.



Celem niniejszego doniesienia jest wykazanie różnic w poziomie dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny w mózgu królika pt i królika zdrowego.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na objawowych królikach pt w wieku 6 tygodni, pochodzących z hodowli Ośrodka Doświadczalnego Neurologii Porównawczej CMDiK PAN w Mińsku Mazowieckim, oraz na 8 tygodniowych zdrowych królikach pochodzących z poza stada królików pt. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację, pobierano duże skrawki tkanki z pnia mózgu wraz z obszarem jąder podkorowych, oraz z mózdzku. Poszczególne skrawki ważono i zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Do oznaczeń amin katecholowych przygotowywano homogenat tkanki w 0,1 N kwasie nadchlorowym z dodatkiem 5 mM zredukowanego glutationu w proporcji 10 ml roztworu na 1 g tkanki, stosując homogenizator szklany. Uzyskaną zawiesinę wirowano przez 20 minut przy 10 tys. obrotów/min. Klarowny supernatant doprowadzano do pH 7,4 za pomocą 4 M  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . Całość ponownie wirowano celem pozbycia się osadu  $\text{KClO}_4$ . Przed wykonaniem właściwych badań płyn z nad osadu rozcieńczano 20-krotnie  $\text{H}_2\text{O}$  redest.

Dopaminę, noradrenalinę i adrenalinę oznaczano metodą radioenzymatyczną (Peuler, Johnson 1977) stosując gotowe zestawy odczynników firmy Upjohn diagnostics: Catecholamines radioenzymatic assay kit ( $^3\text{H}$ ) oraz technikę podaną przez producenta w przepisie do oznaczeń.

Metoda polega na:

a) przekształceniu amin katecholowych w ich  $^3\text{H}$ -metoksypochodne w obecności katecholo-O-metylotransferazy (COMT) i znakowanej  $^3\text{H}$ -S-adenozylometioniny ( $^3\text{H}$ -SAM);

b) ekstrakcji i rozdziale radioaktywnych metabolitów przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej oraz

c) pomiarze radioaktywności  $^3\text{H}$ -normetanefryny,  $^3\text{H}$ -metanefryny, (po ich utlenieniu nadjodanem do  $^3\text{H}$ -waniliny) i pomiarze  $^3\text{H}$ -metoksytyraminy.

Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na płytkach szklanych pokrytych żelazem krzemionkowym GF 254 (Merck), w układzie chloroform:metanol:etylamina 8:2:1 stosowanym przez Da Prada i Zurcher (1976). Pomiary radioaktywności przeprowadzono w liczniku scyntylicyjnym typu SL Intertechnique.

Przy analizowaniu wyników badań zastosowano następujące charakterystyki statystyczne: liczbę badanych homogenatów tkanki (n), średnią arytmetyczną ( $\bar{x}$ ), wariancję  $S^2$  i odchylenia standardowe (SD). Ponieważ wyliczone wartości wariancji były różne, sprawdzano istotność różnic P przy pomocy testu c-Cochrana i Coxa (Octaba 1980).



## WYNIKI

Ogółem objęto badaniem 13 królików pt oraz 5 królików zdrowych, pochodzących spoza stada pt. Stężenie amin katecholowych oznaczono w przeszło 60 homogenatach tkanki mózgu królików chorych oraz w 15 próbach grupy kontrolnej. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach 1—4.

Badania stężenia dopaminy przeprowadzone w skrawkach pobranych z mózgow królików pt wykazały, że w strukturach podkorowych półkul mózgowych dominują wartości w granicach 0,65 pmol/mg mokrej tkanki, a w mózdzku wartość średnia wynosi 0,29 pmol/mg tkanki. Stężenia dopaminy w mózgu królika zdrowego przewyższało czterokrotnie wartości uzyskane u królików pt, z wyjątkiem obszaru mózdzku (tab. 1). Należy

Tabela 1. Stężenie dopaminy w mózgu królika pt i królika zdrowego

Table 1. Dopamine concentration in pt and healthy rabbits brain

Obszar mózgu Brain area	Królik Rabbit	n	pmol/mg tkanki pmol/mg tissue $\bar{x} \pm SD$	Porównanie grup Groups comparison	
				wartość funkcji testowej value of test's function	p
pień + obszar jąder podko- rowych brain stem + area of subcorti- cal nuclei	pt	57	0,75 ± 0,59	$C_0 = 8,19$	< 0,001
	zdrowy	20	2,80 ± 1,03		
mózdzek cerebellum	pt	7	0,29 ± 0,20	$C_0 = 0,44$	nieistotne insignificant
	zdrowy	5	0,33 ± 0,05		
	healthy				

n — liczba oznaczeń  
number of estimations

zaznaczyć, że spośród badanych królików pt tylko u jednego stwierdzono trzy wyniki odpowiadające stężeniom dopaminy w mózgu zwierząt kontrolnych. Wartości te wynosiły od 1,90 do 3,82 pmol/mg tkanki. Mimo tych trzech wysokich wartości, różnica w stężeniu dopaminy pomiędzy porównywanymi grupami zwierząt była statystycznie istotna ( $P < 0,001$ ).

Wyniki oznaczeń noradrenaliny przedstawia tabela 2. Niezależnie od badanego obszaru mózgu, uzyskano wyższe wartości stężeń u królików pt aniżeli u królików kontrolnych. W strukturach podkorowych i pniu mózgu zwierząt chorych stężenie noradrenaliny wahało się w szerokich granicach, przy czym wartość średnia wyniosła 1,41 pmol/mg tkanki, u kró-



lików zdrowych zaś 1,01 pmol/mg tkanki. W mózdzku stężenia wynosiły odpowiednio 0,51 pmol/mg tkanki w grupie zwierząt chorych i 0,29 pmol/mg tkanki w grupie kontrolnej.

Jak wynika z rezultatów uzyskanych z oznaczeń adrenaliny (tab. 3), wyższe stężenie występuje w mózgu królików zdrowych, przy czym różnicę statystycznie istotną stwierdzono tylko w obszarze struktur podko-

Tabela 2. Stężenie noradrenaliny w mózgu królika pt i królika zdrowego  
Table 2. Norepinephrine concentration in pt and healthy rabbits brain

Obszar mózgu Brain area	Królik Rabbit	n	pmol/mg tkanki pmol/mg tissue $\bar{x} \pm SD$	Porównanie grup Groups comparison	
				wartość funkcji testowej value of test's function	p
pień + obszar jąder podko- rowych brain stem + area of sub- cortical nuclei	pt	61	1,41±0,89	C = 2,54	< 0,01
	zdrowy healthy	20	1,01±0,45		
mózdzek cerebellum	pt	8	0,51±0,16	C = 2,88	< 0,05
	zdrowy healthy	7	0,29±0,12		

n — liczba oznaczeń  
number of estimations

Tabela 3. Stężenie adrenaliny w mózgu królika pt i królika zdrowego  
Table 3. Epinephrine concentration in pt and healthy rabbits brain

Obszar mózgu Brain area	Królik Rabbit	n	pmol/mg tkanki pmol/mg tissue $\bar{x} \pm SD$	Porównanie grup Groups comparison	
				wartość funkcji testowej value of test's function	p
pień + obszar jąder podkoro- wych brain+stem area of sub- cortical nuclei	pt	60	0,18±0,13	C <sub>0</sub> = 7,88	< 0,001
	zdrowy healthy	20	0,43±0,11		
mózdzek cerebellum	pt	8	0,09±0,08	C <sub>0</sub> = 0,82	nieistotne insignificant
	zdrowy healthy	6	0,12±0,05		

n — liczba oznaczeń  
number of estimations



rowych i pnia mózgu ( $P < 0,001$ ). Wartość średnia stężenia adrenaliny wynosiła 0,18 pmol/mg tkanki u królików pt, a u królików zdrowych 0,43 pmol/mg tkanki.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki obliczeń stosunku stężenia dopaminy do stężenia noradrenaliny w badanych strukturach centralnego układu nerwowego. Otrzymane wartości wskazują na wyraźną różnicę pomiędzy grupą zwierząt kontrolnych i chorych. O ile bowiem stosunek DA/NA kształtował się w obszarze pnia mózgu wraz z okolicą jąder podkorowych królików zdrowych w granicach 2,76, a w mózdzku 1,14, to u królików pt wynosił on zawsze poniżej jedności, niezależnie od badanego obszaru mózgu.

Tabela 4. Stosunek stężenia dopaminy do noradrenaliny (DA/NA) w mózgu królika pt i królika zdrowego

Table 4. Ratio of concentration of dopamine to norepinephrine (DA/NA) in pt and healthy rabbits brain

Obszar mózgu Brain area	Królik Rabbit	DA/NA
pień + obszar jąder podkorowych brain stem + area of subcortical nuclei	pt zdrowy healthy	0,53 2,76
mózdzek cerebellum	pt zdrowy healthy	0,56 1,14

Na podstawie wartości odchyłeń standardowych można stwierdzić, że rozrzut wyników oznaczeń amin katecholowych u zwierząt chorych był znacznie większy niż w grupie kontrolnej. Wydaje się, że zasadniczą przyczyną tkwi w pobieraniu skrawków tkanki z niejednakowych miejsc danego obszaru mózgowia oraz duże różnice indywidualne w nasileniu objawów klinicznych i zmian morfologicznych u królików pt.

#### OMÓWIENIE

Niniejsze doniesienie stanowi pierwszy etap naszych badań z zakresu amin katecholowych u królika z dziedziczną drżączką porażną. Celem tego etapu było porównanie poziomu dopaminy, noradrenaliny i adrenaliny w mózgu królika pt i królika zdrowego. Z licznych prac doświadczalnych wiadomo, że stężenie amin katecholowych w mózgu ulega zmianom począwszy od rozwoju embrionalnego (Coyle, Henry 1973), następnie po urodzeniu wraz z wiekiem (Agrawal i wsp. 1966) oraz w okresie starczym (Ponzio i wsp. 1978). Do badań dobieraliśmy więc zwierzęta w jednakowym wieku (6—8 tygodniowe).

Istnieje wiele metod badania amin katecholowych. Przeprowadza się



oznaczenia fluorymetryczne po odpowiedniej ekstrakcji tych związków z materiału biologicznego (Spano, Neff 1971), a także po rozdziale metodą chromatografii bibulowej lub cienkowarstwowej (Samejima i wsp. 1971). Znana jest technika histofluorescencyjna (Tennyson i wsp. 1972), przy czym mikroskrawki do badań przygotowuje się najczęściej metodą podaną przez Głowińskiego i Iversona (1966). Wprowadzenie metody radioenzymatycznej pozwoliło na rozszerzenie zakresu badań amin katecholowych, szczególnie w płynach ustrojowych (Passon, Peuler 1973; de Prada, Zürcher 1976; Peuler, Johnson 1977). W naszych doświadczeniach posłużyliśmy się techniką radioenzymatyczną przy użyciu gotowych odczynników firmy Upjohn Company.

Oznaczenia poziomu katecholamin przeprowadziliśmy w różnych obszarach mózgu, ponieważ u królika pt zmiany morfologiczne w strukturach szarych są wyraźnie rozsiane. Z prac Osetowskiej i wsp. (1975) oraz Taraszewskiej i Osetowskiej (1975) wynika, że uszkodzone neurony spotyka się zarówno w prążkowie, śródmózgowiu, mózdzku i głębokich warstwach kory. Do badań pobieraliśmy zatem duże skrawki tkanki (100—200 mg) przede wszystkim z pnia mózgu wraz z obszarem jąder podkorowych oraz z mózdzku. Przeciętnie preparowano po 5 skrawków z każdego mózgu i po ekstrakcji katecholamin oznaczano ich stężenie.

Uzyskane wyniki wykazały jednoznacznie, że poziom amin katecholowych w mózgu królika pt odbiega w sposób wyraźny od poziomu stwierdzonego u królika zdrowego (z wyjątkiem obszaru mózdzku). Dotyczy to przede wszystkim dopaminy, której stężenie było znacznie niższe w mózgu królika pt i osiągało wartości w granicach 0,39—1,24 pmol/mg świeżej tkanki, a u królików zdrowych zawsze powyżej 1,96 pmol/mg tkanki. Niskie stężenie dopaminy u królika pt można by tłumaczyć jako neurochemiczną konsekwencję uszkodzenia neuronów dopaminergicznych. Za tą koncepcją przemawiają zmiany zwyrodnieniowe neuronów, wykazane u królików pt przez Taraszewską i wsp. (1976) w badaniach mikroskopowo-elektronowych.

Obniżenie stężenia dopaminy w zwojach podstawy mózgu występuje również u ludzi dotkniętych parkinsonizmem, przy czym według Hornykiewicza (1970) stopień niedoboru zależy od nasilenia uszkodzeń w istocie czarnej, natomiast nie zależy od etiologii parkinsonizmu. W doniesieniach ostatnich lat wykazano, że obniżenie poziomu dopaminy wraz z objawami typu parkinsonoidalnego można wywołać doświadczalnie przez dożylnie podanie określonych substancji chemicznych, które w sposób wybiórczy niszczą neurony dopaminergiczne (Burns i wsp. 1983).

Jest rzeczą znaną, że obniżenie stężenia amin katecholowych może wystąpić nie tylko z powodu zniszczenia neuronów istoty czarnej, jako miejsca syntezy dopaminy, lecz także z powodu braku lub zmniejszenia aktywności enzymów uczestniczących w biosyntezie dopaminy. Chodzi mianowicie o hydroksylazę tyrozynową oraz dekarboksylazę DOPA. Na



podstawie naszych dotychczasowych badań nie można wykluczyć, że u królika pt przyczyna spadku stężenia dopaminy nie tkwi również w zmianie aktywności enzymów.

Analizując wyniki uzyskane z oznaczeń noradrenaliny można ogólnie stwierdzić, że w obszarze noradrenergicznym, a więc w pniu mózgowym, stężenie noradrenaliny jest wyższe u królików pt aniżeli u królików zdrowych. Stan ten może być spowodowany wzmożoną aktywnością beta-hydroksylazy biorącej udział w przekształcaniu dopaminy w noradrenalinę. Stosunek dopaminy do noradrenaliny (DA/NA) jest zatem diametralnie różny w obu badanych grupach zwierząt (u królików zdrowych wynosi on około 2,76, a u królików pt zaledwie 0,5).

Wiadomo, że stosunek DA/NA kształtuje się różnie w poszczególnych obszarach mózgu. Coyle i Henry (1973) wykazali, że w całym mózgu dorosłego szczura stosunek ten wynosi 1,5, natomiast w prążkowie wzrasta on nawet do 30, a w podwzgórzu wynosi zaledwie 0,3. Z doświadczeń Heftiego i Lichtensteigera (1978) wynika, że w homogenacie istoty czarnej mózgu stosunek DA/NA mieści się w granicach 1—2,0. Wartości uzyskane w naszych badaniach nie można odnieść do jednej dokładnie wyodrębnionej struktury, lecz raczej do mózgu jako całości, ponieważ skrawki pochodziły zarówno z obszarów dopaminergicznych jak i noradrenergicznych.

Jak wynika z powyższych danych, wyniki uzyskane w niniejszej pracy pozwoliły jedynie na wykazanie różnic w poziomie amin katecholowych, bez doświadczalnego wyjaśnienia przyczyny ich powstawania. Obecnie podejmujemy badania dotyczące metabolizmu amin katecholowych w mózgu królika pt, które pozwolą na poszerzenie interpretacji dotychczasowych wyników.

#### УРОВЕНЬ КАТЕХОЛАМИН В МОЗГЕ КРОЛИКА „pt”

##### Резюме

При помощи радиоэнзиматического метода с применением готовых составов реактивов (Upjohn Diagnostics Assay Kit-<sup>3</sup>H) было исследовано содержание дофамина в мозгах 13 кроликов с наследственным дрожательным параличом.

Независимо от исследуемого района мозга, концентрация дофамина и адреналина в мозге кролика „pt” была значительно ниже чем в мозгах здоровых кроликов. Концентрация норадреналина в мозге кролика „pt” была выше чем в мозгах контрольных животных. Две исследуемые группы животных различались существенным образом величиной отношения дофамина к норадреналину.



## CATECHOLAMINES LEVELS IN "PT" RABBIT BRAIN

## Summary

Thirteen rabbits with hereditary paralytic tremor ("pt") were investigated with a view to determine the concentrations of dopamine, norepinephrine and epinephrine in the brain. The radioenzymatic method using the Upjohn diagnostics assay kit ( $^3\text{H}$ ) was employed.

Apart from the investigated brain region, the values of dopamine and epinephrine were significantly lower as comparing with values obtained from healthy rabbits. Contrary to those results the concentration of norepinephrine was higher in the brain of the "pt" rabbit than in the brain of the control group.

The ratio of dopamine to norepinephrine showed the most significant differences between the two examined groups of animals.

## PIŚMIENNICTWO

1. Agrawal H. C., Glisson S. N., Himwich W. A.: Changes in monoamines of rat brain during ontogeny. *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 130, 511—513.
2. Burns R. S., Chiueh Ch. C., Markey S. P., Ebert M. H., Jacobowitz D. M., Kopin I. J.: A primate model of parkinsonism — Selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4 phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Nat. Acad. Sci., USA* 1983, 80, 4546—4550.
3. Coyle J. T., Henry D.: Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 61—67.
4. Czartoryska B., Wald I., Taraszewska A.: Lipidy mózgu królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 265—272.
5. Da Prada M., Zürcher G.: Simultaneous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the femtomole range. *Life Sci.*, 1976, 19, 1161—1174.
6. Glowinski J., Iversson L. L.: Regional studies of catecholamines in the brain. The disposition of  $^3\text{H}$ -norepinephrine,  $^3\text{H}$ -dopamine,  $^3\text{H}$ -DOPA in various region of the brain. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 655—659.
7. Hefti F., Lichtensteiger W.: Subcellular distribution of dopamine in substantia nigra of the rat brain: effects of gamma-butyrolactone and destruction of noradrenergic afferents suggest formation of particles from dendrites. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 1217—1230.
8. Hornykiewicz O. D.: Physiologic, biochemical and pathological backgrounds of levedopa and possibilities for the future. *Neurology*, 1970, 20, 1—5.
9. Oktaba W.: Elementy statystyki matematycznej i metodyka doświadczalnictwa. PWN, Warszawa 1980, 132—133.
10. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 71—85.
11. Passon P. G., Peuler J. D.: A simplified radiometric assay for plasma norepinephrine and epinephrine. *Anal. Biochem.*, 1973, 51, 618—631.
12. Peuler J. D., Johnson G. A.: Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci.*, 1977, 21, 625—636.
13. Ponzio F., Brunello N., Algeri S.: Catecholamine synthesis in brain of ageing rat. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 1617—1620.
14. Samejima K., Dairman W., Stone J., Underfriend S.: Condensation of ninhydrin



- with aldehydes and primary amines to yield highly fluorescent terrary products. *Anal. Biochem.*, 1971, 42, 237—247.
15. Spano P. F., Neff N. H.: Procedure for the simultaneous determination of dopamine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid, and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in brain. *Anal. Biochem.*, 1971, 42, 113—118.
  16. Taraszewska A., Osetowska E.: Zmiany w mózgu królika pt w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 283—290.
  17. Taraszewska A., Osetowska E., Krucke W.: Elektronenmikroskopischen Untersuchung der intrazerebralen Verkalkungen bei dem erblichen paralytischen Tremor der pt-Kaninchen. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 331—336.
  18. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441—459.
  19. Tennyson V. M., Barret R. E., Cohen G., Gôté L., Heikkila R., Mytilineou C.: The developing neostriatum of the rabbit-corelation of fluorescence histochemistry, electron microscopy, endogenous dopamine levels, and <sup>3</sup>H-dopamine uptake. *Brain Res.*, 1972, 46, 251—285.
  20. Wald I., Wehr H., Harmak E., Albert K., Sawicki J.: Niektóre wskaźniki biochemiczne w surowicy królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 97—103.
  21. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205—218.

Adres autorów: Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, ul. Lubartowska 85, 20—123 Lublin



trum Zdrowia Dziecka) na podstawie pracy pt. „Elektromiograficzna ocena poziomu i stopnia uszkodzenia oraz regeneracji włókien ruchowych nerwów obwodowych u dzieci z okołoporodowym uszkodzeniem splotu ramiennego”.

Promotorem pracy był prof. dr hab. med. Roman Michałowicz. Obrona odbyła się 3 VI 1985 r.

30 X 1985 r. Rada Naukowa Instytutu Psychoneurologicznego nadała kol. Piotrowi Adamczakowi stopień doktora nauk medycznych na podstawie pracy pt. „Urazy ośrodkowego układu nerwowego u ludności rejonu zespołu opieki zdrowotnej Starachowice w okresie 1 VII 1977 do 30 VI 1980”.

Promotorem pracy był prof. dr hab. med. Jerzy Kulczycki.

RADA Naukowa CMDiK PAN nadała w dniu 25 I 1985 r. stopień naukowy doktora nauk medycznych kol. Teresie Wierzba-Bobrowicz na podstawie pracy pt. „Wpływ hipoglikemii na rozwój zmian strukturalnych w mózgu człowieka i zwierząt doświadczalnych”.

Promotorem pracy był prof. dr hab. M. J. Mossakowski.

\*

Doroczne nagrody naukowe Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich za 1984 r. otrzymali następujący koledzy:

I nagroda — kol. Andrzej Loesch z CMDiK PAN w Warszawie za pracę pt. „ZIO-impregnowane kolbki synaptyczne w neuropilu jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura pozbawionego wody do picia” (Neuropatologia Polska, 1984, 22, 1, 39—62).

II i III nagroda (równorzędne) — kol. Stefan Kasperek z II Kliniki Neurologicznej Śl. AM w Zabrze za doniesienie przedstawione na Polsko-Niemieckim Sympozjum Neuropatologicznym w Krakowie 4 maja 1984 r. pt. „A case of postirradiation myelopathy”.

Kol. Piotr Olejniczak z Kliniki Neurologicznej AM we Wrocławiu za doniesienie przedstawione na Konferencji Naukowej z okazji XX rocznicy śmierci prof. Adama Opalskiego w Warszawie 14 stycznia 1984 r. pt. „Charakterystyka miażdżycy tętnic podstawy mózgu u chorych z cukrzycą”.

Jerzy Dymecki



PAWEŁ P. LIBERSKI

## DEGENERATIVE NEURITES IN EXPERIMENTAL SCRAPIE \*

Department of Neurology, Medical Academy, Łódź

The development of neuritic plaques is only partly understood (Wiśniewski et al. 1983). Two major elements constitute the plaque: dystrophic (degenerating) neurites, mostly axonal terminals or preterminals (Fig. 1), and amyloid material (Wiśniewski, Terry 1973; Wiśniewski et al. 1981, 1983a,b). Dystrophic neurites have been found not only in Alzheimer disease (AD) or senile dementia of Alzheimer type (SDAT), but also in aged Rhesus monkeys (Wiśniewski et al. 1973), dogs (Wiśniewski, Terry 1973) and rats (Vaughan, Peters 1981). Dystrophic neurites participate also in the formation of amyloid plaques in experimental scrapie (Bruce, Fraser 1975), Creutzfeldt-Jakob disease — CJD (Tateishi et al. 1984) or in human cases with Gerstmann-Straüssler syndrome (Boellard, Schlote 1980; Schlote et al. 1980; Kuzuhara et al. 1983).

In 1981, in a comprehensive review of the subject Wiśniewski et al. claimed that "from the observation that a few (2—3) dystrophic neurites can be found in the absence of amyloid, it was assumed that such aggregates represented the smallest neuritic plaque". The aim of this communication was to extend the above mentioned observation to scrapie-affected hamsters, in which neuritic plaques have never been observed (Liberski, Alwasiak 1983).

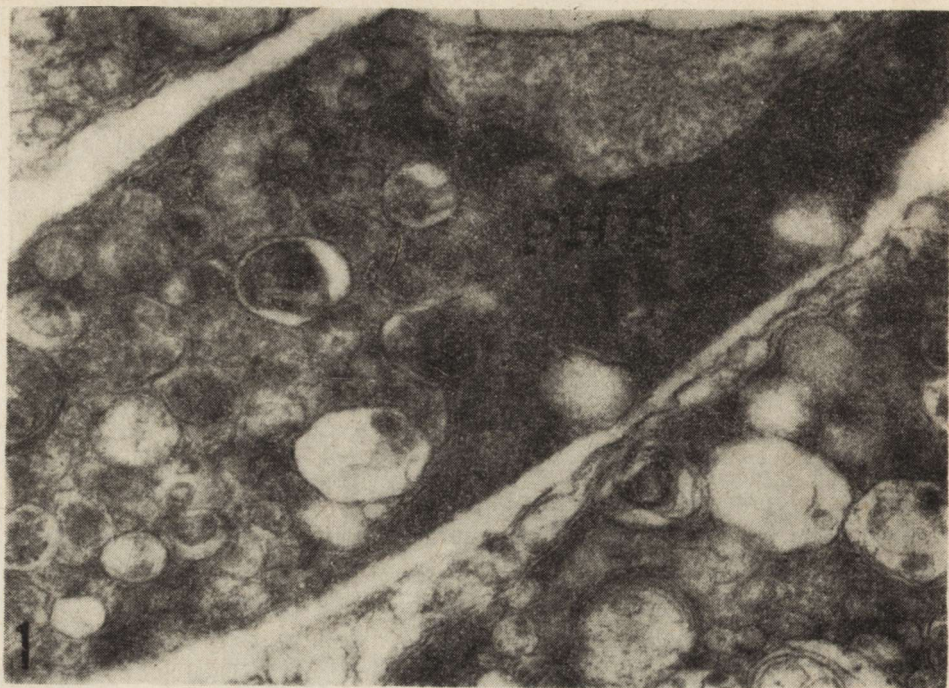
### MATERIAL AND METHODS

The source of the scrapie agent used was the 263 K "quick" (kindly supplied by Dr R. Kimberlin, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh) propagated through Syrian golden hamsters: 60 animals were used in a series of experiments described here. The experimental protocol is given

---

\* Work partly supported by a grant provided by the Ministry of Health and Social Welfare (Nr 5), and a grant provided by the Polish Academy of Sciences (771 — VII).





*Fig. 1.* Axon belonging to the neuritic plaque comprises numerous inclusion bodies and paired helical filaments (pHFs), mv — multivesicular body. Material from a human case of Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and tangles (Liberski et al. 1985).  $\times 52\ 000$

*Ryc. 1.* Akson (element płytki neurotycznej) zawierający ciała wtętowe oraz podwójne filamenty (pHFy), mv — ciała wielopęcherzykowe. Materiał z przypadku choroby Creutzfeldta-Jakoba z płytkami i zwyrodnieniem włókienkowym Alzheimera (Liberski et al. 1985). Pow. 52 000  $\times$

elsewhere (Liberski, Alwasiak 1983). The samples of hamster brains, stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  prior to usage, were suspended in physiological saline to give a 10% suspension (w/v). The suspension was cleared by centrifugation at 1600 G for 15 min at room temperature. 0.05 ml of the supernatant was injected into the right hemisphere of each hamster under light ether anesthesia. Control animals were inoculated with saline under identical conditions. All animals were kept in plastic cages and inspected daily for signs of disease. When unequivocal signs appeared such as tremor, ataxia, ruffled hair, some animals were killed by decapitation under ether anesthesia. The brains were removed, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. These results have been published elsewhere (Liberski, Alwasiak 1983). From some animals half of the brain was frozen and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for further use.

The other animals were anesthetized with intraperitoneal chloral hydrate. They were then perfused through the heart with 50 ml of 1.25% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in cacodylate buffer (pH 7.2) followed by 100 ml of 5% of glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde





Fig. 2. Small axonal profile (Ax) with two inclusions. The synaptic terminal (st) in close association with axon.  $\times 33\ 500$

Ryc. 2. Przekrój aksonu o małej średnicy (Ax) z dwoma ciałami wtętowymi. Zakończenie synaptyczne (st) w bliskim kontakcie z aksonem. Pow.  $33\ 500 \times$

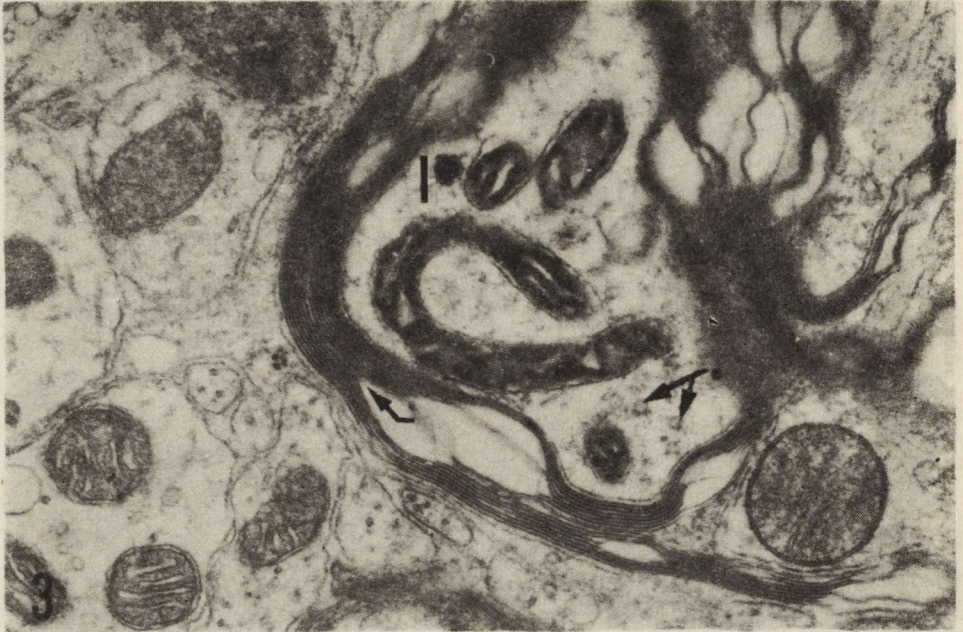
in cacodylate buffer (pH 7.2). The brains were immediately removed, and 1–2 mm<sup>3</sup> blocks were cut and left overnight in the second fixative. All samples were postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon 812. Semithin sections were cut on an Ultratome III LKB and stained with methyl blue. Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate, examined and photographed in EM 109 and JEM 100C transmission electron microscopes.

## RESULTS

The incubation period in the series of experiments described here (measured from the time of inoculation to the first signs of disease) ranged from 57 to 83 days.

Dystrophic neurites (axons or axonal preterminals) were found in all examined animals, but never in controls. It seemed that the counts of dystrophic neurites followed the intensity of other pathological changes, as described elsewhere (Liberski, Alwasiak 1983). However, the true number of dystrophic neurites was not very large. Less than 10 dystrophic neurites were observed per a grid square. Generally speaking, the presence of dystrophic neurites seemed to be a rare phenomenon.





**Fig. 3.** Degenerating axon with inclusions (I) and mitochondria. Note the synaptic vesicles (double arrows) and splitting of the myelin lamellae.  $\times 33\ 500$

**Ryc. 3.** Wyrodnający akson z ciałami wtętowymi (I) i mitochondriami. Zwracają uwagę pęcherzyki synaptyczne (podwójne strzałki) oraz rozwarstwienie blaszek mieliny. Pow. 33 500  $\times$



**Fig. 4.** Longitudinal section through a swollen, degenerating axon. m — mitochondria, mt — microtubules.  $\times 33\ 500$

**Ryc. 4.** Przekrój podłużny obrzmiałego, wyrodnającego aksonu. m — mitochondria, mt — mikrotubule. Pow. 33 500  $\times$



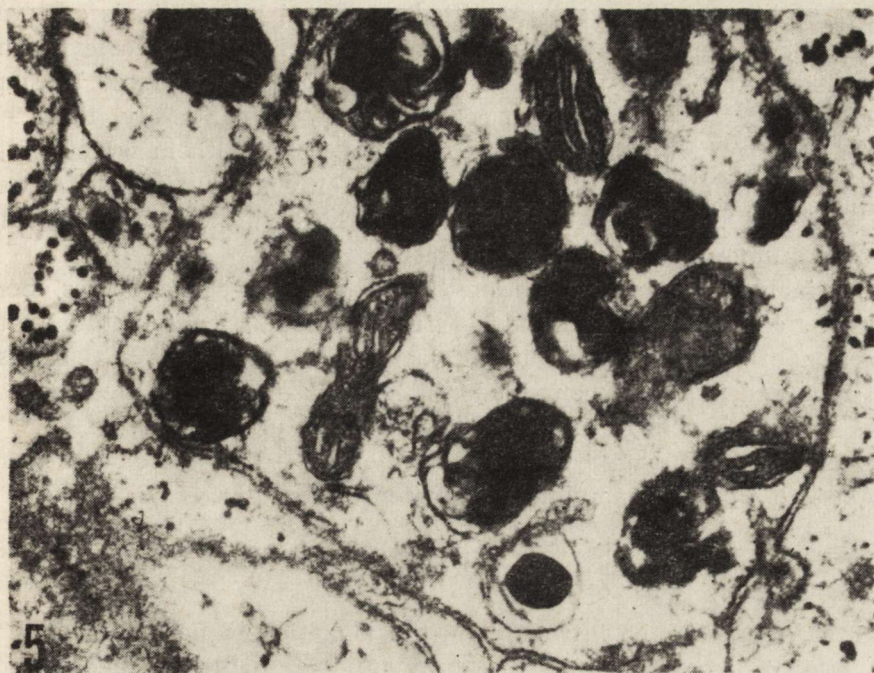


Fig. 5. Degenerating axon. Note diversity of inclusions.  $\times 33\ 500$

Ryc. 5. Wyrodnijący akson. Zwraca uwagę różnorodność ciał wtęrowych. Pow.  $33\ 500 \times$

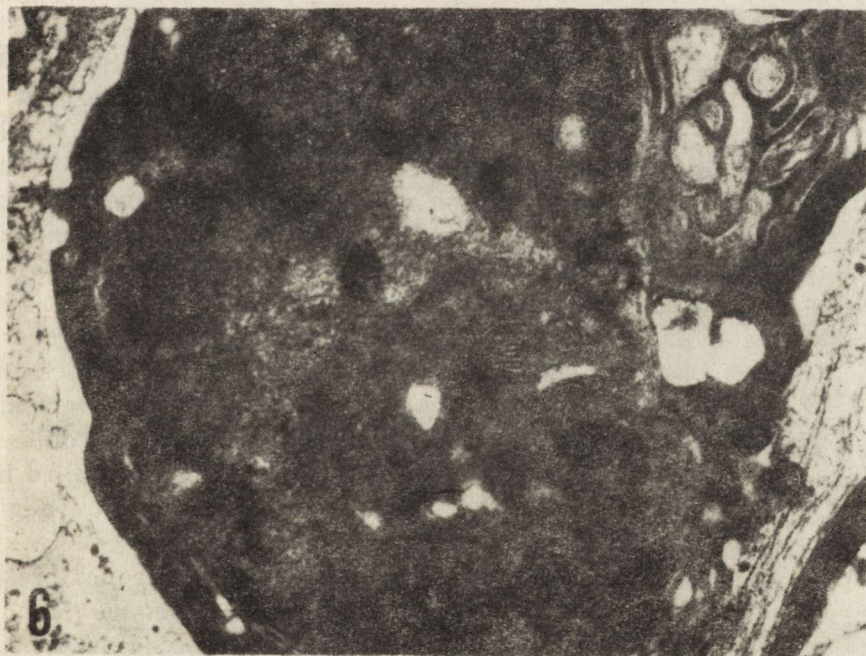


Fig. 6. Degeneration axon completely filled with electron-dense inclusion of fibrillar appearance.  $\times 33\ 500$

Ryc. 6. Wyrodnijący akson całkowicie wypełniony elektronowo-gęstym ciałem wtęrowym o włókienkowatej strukturze. Pow.  $33\ 500 \times$



Dystrophic neurites were identified as axonal preterminals or terminals by the presence of a few myelin lamellae (Figs 2—5). However, they were also identified as dendrites. They were mostly observed as single structures, or as small clusters composed of two or, rarely, three elements. The neurites contained mitochondria, some of them were swollen with the broken cristae. In some neurites only a few inclusions were observed, and these probably represented the earliest changes. Usually, however, numerous inclusions were seen.

The inclusions were membrane-bound, electron-dense bodies. Some inclusions appeared as amorphous or multivesicular, contributing to the formation of small, electron-lucent vacuoles. It should be also stressed that some neurites were completely filled with amorphous, electron-dense material with delicate fibrillar, internal structure (Fig. 6).

The extracellular space was carefully examined. However, the search for amyloid fibrils or amyloid-like material was always negative.

#### DISCUSSION

As suggested in the introduction, the neuritic plaque is composed of degenerating (dystrophic) neurites and amyloid material. The sequence of events, from a primitive plaque (containing numerous neurites and a small amount of amyloid) to the burned-out plaque in which, dystrophic neurites are virtually absent, is not fully understood (Wiśniewski et al. 1983a,b).

From the studies performed in human cases of AD or SDAT (Wiśniewski, Terry 1973; Wiśniewski et al. 1981, 1983a,b) it seems that dystrophic neurites are the first elements appearing early in the development of neuritic plaque. The small clusters made up of two or three dystrophic neurites are probably the smallest neuritic plaque to be seen in human (Wiśniewski et al. 1981, 1983a,b) or in aged Rhesus monkeys (Wiśniewski et al. 1973). Taking into account these data the hypothesis has been put forward pointing to dystrophic neurites as a nidus at which amyloid is later produced (Wiśniewski et al. 1981, 1983a,b). However, in transmissible spongiform encephalopathies: kuru (Klatzo, Gajdusek 1959) and CJD (Krücke et al. 1974; Masters et al. 1981) the plaques are composed of a dense amyloid center with virtually absent neuritic profiles. Of course, such plaques are also observed in AD and SDAT (and called here burned-out plaques), but AD and SDAT are characterized by a great diversity of plaques, visible in different stages of development. In kuru and CJD amyloid (kuru) plaques are the sole type of plaques present. Ten per cent of CJD cases, however, present neuritic plaques (Manuelidis — personal communication), but this is probably a concomitant finding. It seems, thus, that neurites alone are not sufficient to bring about amyloid deposition. In undercutting experiments (Lampert 1967), pinealocytes in normal pigs (Karasek, Wyrzykowski 1980), or in other CJD or



scrapie models (Landis et al. 1981; Kim, Manuelidis 1983) dystrophic neurites have been observed, but not amyloid material. In the study described here dystrophic neurites have also been virtually devoid of amyloid material.

The next question to be answered is the etiology of neuritic plaques. In SDAT and AD there is no good answer, in spite of speculations on possible transmissible etiology of AD (Goudsmit et al. 1980; Brown et al. 1982; Dickinson et al. 1983). In transmissible spongiform encephalopathy, however, the plaques are ultimately connected with replication of the agent (Wiśniewski et al. 1975; Bruce et al. 1976; Fraser, Bruce 1981). The coincidence of cerebral amyloidosis of different mouse genotypes with etiological agents ranged from 0 to 100% (Bruce et al. 1976). Two strains, namely, 87A and 87V, have greatest incidence of amyloidosis, three (22C, 79A, 79V) induce no cerebral amyloidosis, and two (ME7 and 22A) cause moderate incidence. Thus, amyloid-producing factor is most-strain-specific. A similar situation is probably also encountered in man. The CJD strains inducing a large number of plaques (Tateishi et al. 1979, 1984; Masters et al. 1981; Liberski 1983) are characterized also by different features than common CJD strains (the spectrum of permissive species of animals is probably an important feature. However, the host strain is also very important. The C57Bl and VM-passed ME7 and 22A strains have a different incidence of amyloidosis (Bruce et al. 1976). In each case the incidence of amyloidosis parallels the length of the incubation period. However, the incidence of cerebral amyloidosis is not only a simple consequence of the length of the incubation period (Bruce, Fraser 1983). The strains, which do not induce amyloid plaques have incubation periods within the range of those that induce more plaques. Neither is incidence of amyloidosis a consequence of the ageing process (Bruce, Fraser 1982). The increased age of inoculation (and, therefore, of death) have no significant effect on the plaque count. It should be stressed that plaque numbers are always lower with peripheral than intracerebral route of inoculation (Bruce, Fraser 1981). In turn, the incubation period is longer with peripheral than intracerebral route (Outram 1976). Recently it has been documented that amyloid plaques follow the needle track (Wiśniewski et al. 1981).

Recently some indirect data have been provided supporting the hypothesis of close association between the scrapie agent and amyloid. Purified fractions, containing scrapie infectivity stained with Congo red exhibited congophilic birefringence, this suggesting the binding of the dye by the agent contained in the purified fractions (Prusiner et al. 1983). It should be stressed that particular fibrillar structures, called scrapie-associated fibrils (Merz et al. 1981, 1983) or scrapie rods (Prusiner et al. 1983; Prusiner 1984), contained in highly purified fractions, are the best candidates for the scrapie agent or for the amyloid material produced during the course of disease. Recent data suggest that scrapie-associated



fibrils (SAFs) are a particular form of amyloid, which is the cause of death in spongiform encephalopathies (Diringer — personal communication).

Several suggestions can be drawn from the study presented here. Firstly, the presence of dystrophic (degenerating) neurites single or in small clusters, strongly suggests their involvement in the process, which leads to neuritic plaque formation. This process is restrained for unknown reasons, since true neuritic plaques (dystrophic neurites and amyloid) have never been observed. Secondly, the factor contributing to the development of dystrophic neurites is probably strain-specific, it is however, influenced by the general trends of hamster brain response to any type of injury (Liberski — unpublished observation). Of course much additional work should be done to elucidate the significance, if any, of dystrophic neurites in neuritic plaque formation.

#### WYRODNIELAJĄCE NEURYTY W DOŚWIADCZALNEJ SCRAPIE

##### Streszczenie

W scrapie pasażowanej przez chomiki syryjskie opisano wyrodnijące neuryty, podobne do spotykanych w płytkach neurytycznych w przebiegu choroby Alzheimera, scrapie, kuru, choroby Creutzfeldta-Jakoba oraz w zespole Gerstmann-Strausslera. Pomimo obecności wyrodnijących aksonów nie obserwowano w badanym materiale płytek neurytycznych utworzonych z aksonów i amyloidu.

Omówiono hipotetyczne czynniki mogące mieć wpływ na zahamowanie postulowanego procesu tworzenia płytki neurytycznej.

#### ВЫРОЖДАЮЩИЕСЯ НЕВРИТЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ SCRAPIE

##### Резюме

В scrapie пассажированной сирийскими хомяками определялись дегенерирующие невриты, такие же как встречаются в невритических бляшках в болезни Альцгеймера, scrapie, кuru, болезни Крейтцфельда-Якоба и в синдроме Герстмана-Штраусслера. В исследуемом материале, несмотря на наличие дегенерирующих аксонов, не обнаружено невритических бляшек построенных из аксонов и амилоида.

Рассматриваются факторы, которые могут оказывать влияние на торможение предлагаемого процесса образования невритической бляшки.

#### REFERENCES

1. Brown P., Salazar A. M., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Alzheimer's disease and transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1982, 396, 131—143.
2. Boellaard J. W., Schlote W.: Subakute spongiforme Encephalopathie mit multiformer Plaquebildung. *Acta Neuropath.*, (Berl.), 1980, 49, 205—212.



3. Bruce M. E., Fraser H.: Amyloid plaques in the brains of mice infected with scrapie: morphological variation and staining properties. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1975, 1, 189—202.
4. Bruce M. E., Fraser H.: Effect of route of infection on the frequency and distribution of cerebral amyloidosis in scrapie mice. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1981, 7, 289—298.
5. Bruce M. E., Dickinson A. G., Fraser H.: Cerebral amyloidosis in scrapie in mouse: effect of agent strain and mouse genotype. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1976, 2, 471—478.
6. Bruce M. E., Fraser H.: Effect of age on cerebral amyloid plaques in murine scrapie. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1982, 8, 71—74.
7. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. In: *Slow virus disease of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin. North—Holland, Amsterdam, 1976, 210—241.
8. Dickinson A. G., Bruce M. E., Scott J. R.: The relevance of scrapie as an experimental model for Alzheimer's disease. In: *Banbury report 15. Biological aspects of Alzheimer's disease*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1983, 387—398.
9. Fraser H., Bruce E. M.: Experimental control of cerebral amyloid in scrapie in mice. In: *Immunology of the nervous system infections. Progress in Brain Research*. Vol. 59. Eds: P. O. Behan, V. ter Meulen, F. Clifford Rose, Elsevier, Amsterdam, 1983, 281—290.
10. Goudsmit J., Morrow 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.
11. Karasek M., Wyrzykowski Z.: The ultrastructure of pinealocytes in the pig. *Cell, Tissue Res.*, 1980, 211, 151—161.
12. Kim J. H., Manuelidis E. E.: Ultrastructural findings in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in guinea pigs. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1983, 42, 29—43.
13. Klatzo I., Gajdusek D. C., Zigas V.: Pathology of kuru. *Lab. Invest.* 1959, 8, 799—847.
14. Krücke W., Beck E., Vitzhum H.: Creutzfeldt-Jakob disease. Some unusual morphological features reminiscent of kuru. *Z. Neurol.*, 1974, 206, 1—24.
15. Kuzuhara S., Kanazawa I., Sasaki H., Hakanishi T., Shimamura K.: Gerstmann-Straussler-Scheinker's disease. *Ann. Neurol.*, 1983, 14, 216—225.
16. Lampert P. W.: A comparative electron microscopic study of reactive, degenerating, regenerating, and dystrophic axons. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 345—368.
17. Landis M. D., Williams R. G., Masters C. L.: Golgi and electronmicroscopic studies of spongiform encephalopathy. *Neurology*, 1981, 31, 538—549.
18. Liberski P. P.: presented at the EMBO meeting „Scrapie and related unconventional infections”, New Battly Abbey, Scotland, July 2nd-6th, 1983.
19. Liberski P. P., Alwasiak J.: Neuropathology of experimental transmissible spongiform encephalopathy (263 K strain in golden syrian hamsters). I. Standard pathology and development of lesions. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 377—393.
20. Liberski P. P., Papierz W., Alwasiak J.: Brain fine structure in Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and tangles. I. Neuritic plaques. *Neuropath. Pol.*, 1985, 23,
21. 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.
22. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstmann-Straussler syndrome. *Brain*, 1981, 104, 559—588.



23. Merz P. A., Sommerville R. A., Wiśniewski H. M., Iqbal K.: Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1981, 54, 63—74.
24. Merz P. A., Sommerville R. A., Wiśniewski H. M., Manuelidis L., Manuelidis E. E.: Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 1983, 306, 474—476.
25. Outram G. W.: Pathogenesis of scrapie in mice. In: *Slow virus disease of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin. North Holland Publ. Comp., Amsterdam—New York 1976, 325—357.
26. Prusiner S. B.: Some speculations about prions, amyloid and Alzheimer's disease. *New Engl. J. Med.*, 1984, 310, 661—663.
27. Prusiner S. B., McKinley M. P., Bowman K. A., Bolton D. C., Bendheim P. E., Groth D. F., Glenner G. G.: Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983, 35, 349—358.
28. 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, 203—211.
29. Tateishi J., Nagara H., Hikita K., Sato Y.: Amyloid plaques in the brains of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, 1984, 15, 278—280.
30. 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. Handlow. Acad. Press, New York 1979, 175—185.
31. 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.
32. Vaughan D. W., Peters A.: The structure of neuritic plaques in the cerebral cortex of aged rats. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1981, 40, 472—487.
33. Wiśniewski H. M., Bruce M. E., Fraser H.: Infectious etiology of neuritic (senile) plaques in mice. *Science*, 1975, 190, 1108—1110.
34. Wiśniewski H. M., Ghetti B., Terry R. D.: Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged Rhesus Monkeys. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1973, 32, 566—584.
35. Wiśniewski H. M., Merz G. S.: Neuritic and amyloid plaques in senile dementia of Alzheimer type. In: *Banbury report 15, Biological aspects of Alzheimer's disease*. Cold Spring Harbour Lab., 1983, 145—153.
36. 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. Ed. H. M. Zimmerman, Raven Press, New York 1983a, 139—150.
37. Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Lossinsky A. S.: Evidence for induction of localized amyloid deposits and neuritic plaques by an infections agent. *Ann. Neurol.*, 1981, 10, 517—522.
38. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Reexamination of the pathogenesis of senile plaque. In: *Progress in Neuropathology*. Vol. 2. Ed. H. M. Zimmerman, Grune and Stratton, New York 1973, 1—26.
39. Wiśniewski H. M., Sinatra R. S., Iqbal K., Grundke-Iqbal I.: Neurofibrillary and synaptic pathology in the aged brain. In: *Aging and cell structure*. Vol. 1. Ed. J. E. Johnson, Plenum Publ. Corp., New York 1983 b, 105—142.

Author's address: Department of Neurology, Medical Academy. Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź



DARIUSZ ADAMEK, STANISŁAW ŻULICHOWSKI, JÓZEF KAŁUŻA

## LONG SURVIVAL WITH CEREBELLAR APLASIA AND DEGENERATIVE CHANGES OF CNS. A CASE REPORT

Department of Neuropathology, Institute of Neurology, Medical Academy, Cracow  
Department of Pathology, Psychiatric Hospital, Cracow

Reports of cerebellar agenesis or high degree of hypoplasia and/or aplasia of the cerebellum are seldom published. It seems, therefore, justified to present the case of a 38-year-old woman in whom upon *post mortem* examination aplasia of the cerebellum and extensive degenerative changes of the CNS were found. We believe, that the fate of the diseased woman and the course of her life speak for a fairly high plasticity and an adaptive ability in the compensation of dysfunction of the central nervous system.

The case concerns a woman aged 38 years who showed from childhood progressing symptoms of mental deficiency enabling her to complete only 3 classes of primary school. The parents as well as her 2 sisters and 1 brother did not show any signs of mental disorders. At the age of 8 months she succumbed to the Heine-Medin disease. She lived in very unfavourable conditions (at the age of 3 years she lost her mother). At the age of 20 the first epileptic seizure appeared and at 23 she was a permanent resident of the State Houses for Special Care (for mentally retarded persons). During almost 30 years of her life she did not show any motor disturbances (apart from very slight paresis of right leg). No sensory disturbances including vision and hearing were observed. Only her mental capacity showed increasing and constant deterioration. Verbal contact with the patient became more and more difficult and epileptic attacks appeared more frequently. She exhibited psychomotor excitement and attempts of suicide and self-injury. Because of her very grave general and psychic condition she was hospitalized three times during the last 3 years of her life. Apart from debility and epileptic charactero-



pathy, additionally, advanced pulmonary tuberculosis and hepatic cirrhosis were diagnosed. She died at the age of 38 with symptoms of extreme anemia, cachexia and bleeding from the digestive tract.

Autopsy confirmed pulmonary tuberculosis, hemorrhagic diathesis, cirrhosis of the liver and some signs of underdevelopment of endocrine glands, especially ovaries. Nevertheless cerebellar aplasia was the most prominent and interesting abnormality which was found.

The brain weighing 870 g was symmetrical and of normal shape but seemed smaller as compared with normal brains. No malformations of the cerebral cortex were visible. In the region of the brain stem the meninges formed a tent-like membranous cover over the fourth ventricle (Figs 1, 2). On frontal sections of the brain a slight enlargement of

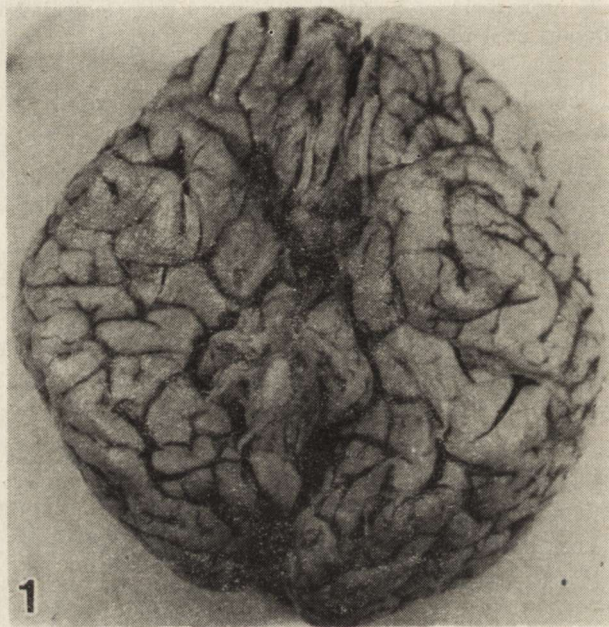


Fig. 1. Base of the brain — general view  
Ryc. 1. Widok ogólny podstawy mózgu

the 3rd ventricle and the aqueduct was noticed. The ependyma of the ventricles was normal. The right hippocampus showed some atypical formation of convolutions (Fig. 3). On both sides of the pons a papillary-like structures 7—8 mm in diameter were present, which macroscopically resembled the tissue of cerebellar cortex (Fig. 4). The pons was reduced in size and its ventral surface was flattened. There was no border visible between the pons, cerebral peduncles and medulla oblongata, respectively. The medulla oblongata showed on the ventral side a deep and slightly broadened *fissura mediana anterior* and well-preserved pyramids,





*Fig. 2.* Brain stem with aplastic cerebellum. Magn. glass  
*Ryc. 2.* Pień mózgu z aplastycznym mózdzkiem. Powiększenie lupowe

In the upper part of the medulla oblongata there were no traces of olives, instead the medulla was flattened in the ventrodorsal dimension, but broadened in the lateral one (Figs 5, 6). Apart from the floor of the 4th ventricle and superior medullary velum attached to the rudimentary cerebellar superior peduncles, other walls of the 4th ventricle were not formed.

The whole brain stem and samples taken from typical regions of the brain were embedded in paraffin. Slides were stained with HE, PTAH, Congo red, PAS, Perdrau, Heidenhain, and after Marsland-Glees-Erikson and Klüver—Barrera.

Microscopical examination:

Slides from the structures macroscopically diagnosed as aplastic cerebellum showed a typical picture of mature cerebellar cortex. In the

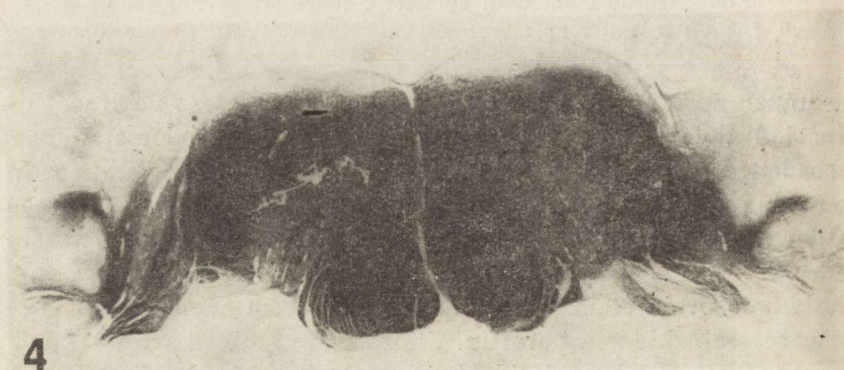


granular layer of the cerebellar cortex the number of neurons was diminished. Ganglionic Purkinje cells were rare. The white matter of the rudimentary cerebellum had properly myelinated nerve fibers. On the left side of the pons a structure of ill-formed *nucleus dentatus* was found. Total bilateral absence of olivary nuclei (of inferior olive), absence of spino-cerebellar tracts, of arcuate and pontine nuclei, external arcuate



*Fig. 3.* Frontal section through right hippocampus at level of lateral geniculate body. Klüver—Barrera. Magn. glass

*Ryc. 3.* Przekrój czołowy przez prawy hipokamp na wysokości ciała kolankowatego bocznego. Klüver—Barrera. Pow. lupowe



*Fig. 4.* Section through brain stem at level of boundary between pons and medulla oblongata. On both sides residual cerebellar hemispheres are seen. Klüver—Barrera. Magn. glass

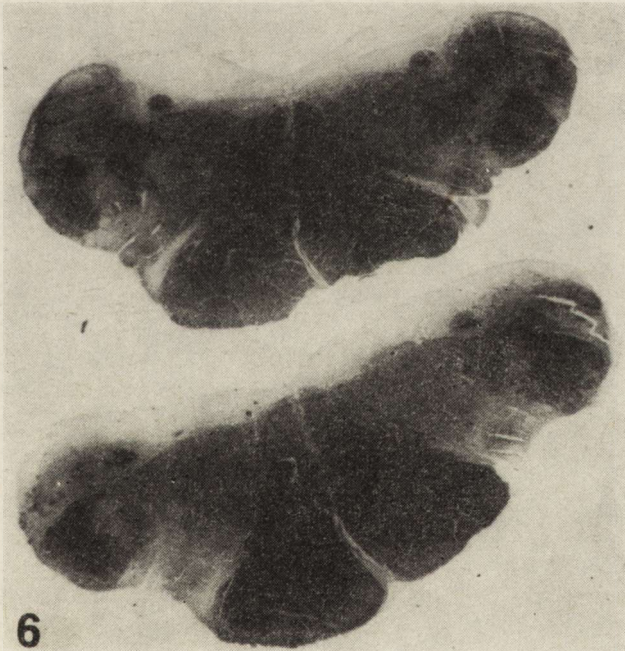
*Ryc. 4.* Przekrój przez pień mózgu na pograniczu między mostem a rdzeniem przedłużonym. Z obu stron widoczne są resztkowe półkule mózdzku. Klüver—Barrera. Pow. lupowe





*Fig. 5.* Sections through inferior part of medulla oblongata. Distinct demyelination in the nuclei of Goll, Klüver—Barrera. Magn. glass

*Ryc. 5.* Przekroje przez dolną część rdzenia przedłużonego. Wyraźnie zaznaczona demielinizacja w obrębie jąder Golla, Klüver—Barrera. Pow. lupowe



*Fig. 6.* Sections through upper part of medulla oblongata — atypical shape due to absence of olives. Klüver—Barrera. Magn. glass

*Ryc. 6.* Przekroje przez górną część rdzenia przedłużonego — zniekształcenie wskutek obustronnego braku oliwek. Klüver—Barrera. Pow. lupowe



and transverse fibers of pons was noted. The superior cerebellar peduncles were built up exclusively of loose, glial tissue. Neurons and neural fibers were lacking. The remaining nuclei and tracts in the brain stem seemed to be preserved, however, we would like to call attention to the difficulties in identification of anatomical structures because of the existence of developmental anomalies.

In the cerebral hemispheres only the right hippocampus showed some abnormality, i.e. probably additional convolutions of the cortex. This resulted in an elongation of the hippocampal cortex (especially of H-5 region) and/or elongation and folding of subiculum (Fig. 3). Neurons of the hippocampus and dentate gyrus were well preserved. Apart from the anatomical abnormalities mentioned above, some microscopical pathological changes were observed in several structures of the CNS. First of all, in the nuclei of Goll (*nucleus gracilis*) intensive degenerative changes similar to neuroaxonal dystrophy were found (Figs 7, 8). Changes of the same type but less pronounced were present in other nuclei

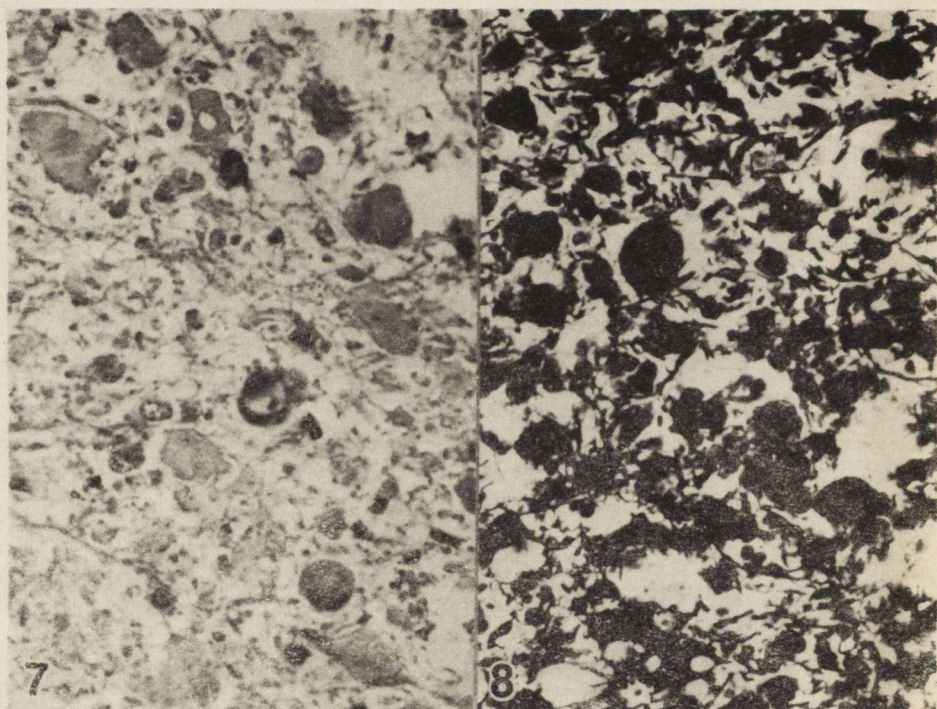


Fig. 7. Nucleus gracilis. Neuroaxonal dystrophy. H—E.  $\times 600$

Ryc. 7. Jądro smukłe Golla. Zmiany typu dystrofii neuroaksonalnej H—E. Pow.  $600 \times$

Fig. 8. Nucleus gracilis. Neuroaxonal dystrophy. Marsland-Glees-Erikson's method for axons.  $\times 600$

Ryc. 8. Jądro smukłe Golla. Dystrofia neuroaksonalna. Met. Marslanda-Gleesa-Eriksona na aksony. Pow.  $600 \times$



of the brain stem. Some delicate calcifications were noted in the *nucleus tractus spinalis n. trigemini*. In the vicinity of the lateral ventricles some blood vessels with a hyalinized, thickened wall, could be observed intermingled with fibrillary gliosis and ependymal ectopias. In the cytoplasm of neurons, astrocytes, oligodendrocytes and endothelial cells of the cerebral cortex and subcortical nuclei many granular eosinophilic, PAS-positive depositions were found. In Nissl stain they showed a tendency for metachromasia. No regions of special predilection for these

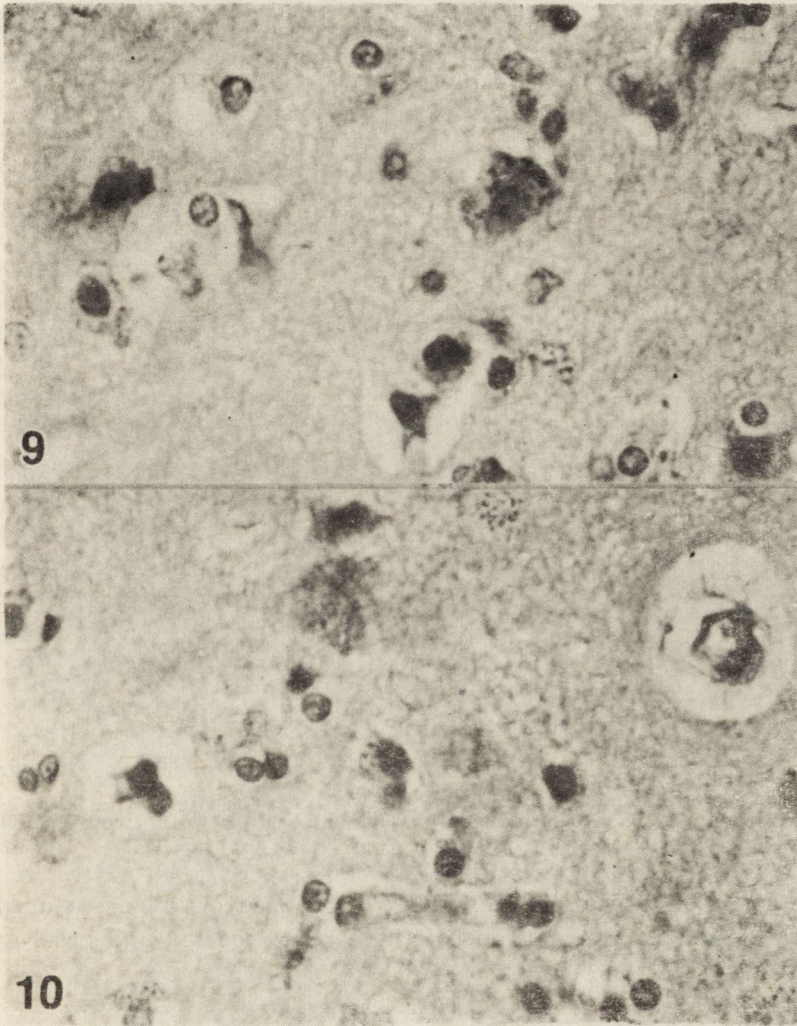
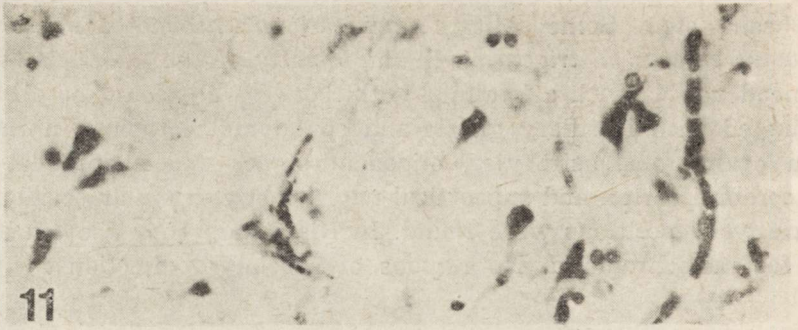


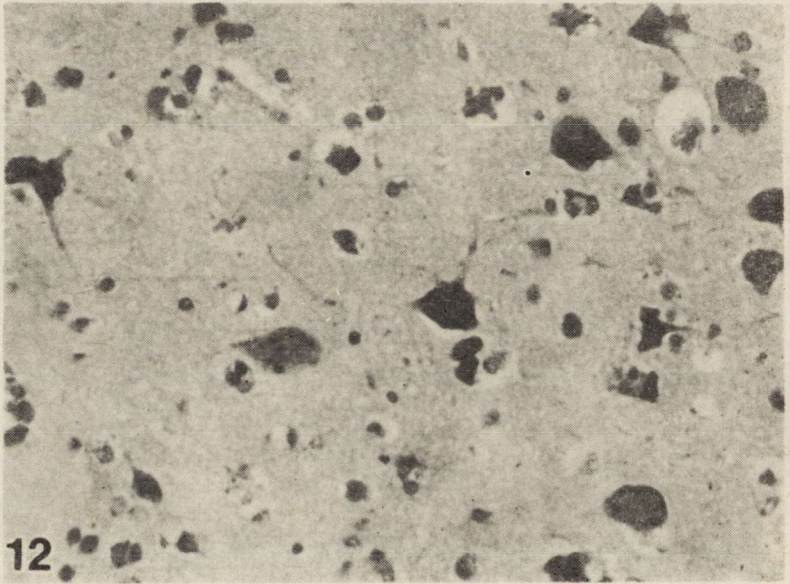
Fig. 9, 10. Cerebral cortex. Granular deposits in cytoplasm of partially damaged neurons, glial cells and probably on sites of totally destroyed cells. PAS.  $\times 600$   
 Ryc. 9, 10. Kora mózgowa. Ziarniste złoży w cytoplazmie częściowo uszkodzonych neuronów, komórek glejowych i prawdopodobnie w miejscach po całkowicie zniszczonych komórkach. PAS. Pow.  $600 \times$





*Fig. 11.* Cerebral cortex. Granular deposits in endothelial cells of blood vessel. In the vicinity of blood vessel some loss of cells is noticeable. PAS.  $\times 400$

*Ryc. 11.* Kora mózgowa. Ziarnistości w komórkach śródbłónka naczynia krwionośnego. Wokół naczynia zaznacza się ubytek komórek. PAS. Pow.  $400 \times$



*Fig. 12.* Cerebral cortex. Different forms of degeneration of neurons. Klüver—Barrera.  $\times 400$

*Ryc. 12.* Kora mózgowa. Różne formy zwyrodnienia komórek nerwowych. Klüver—Barrera. Pow.  $400 \times$

changes could be indicated (Figs 9, 10, 11). Moreover, different unspecific degenerative changes in neurons of the cerebral cortex and basal ganglia were present (Fig. 12).

#### DISCUSSION

The morphological findings of the case described above can be discussed in two different aspects, namely, anatomical and functional. The



latter can be related with the plasticity of the central nervous system. As far as anatomical disturbances are concerned, it seems justified to point out that cerebellar developmental malformations sometimes are a part of different pathological entities. They can occur in such chromosomal disturbances as the Down syndrome and trisomy 13—15 (Norman 1966; Terplan et al. 1966; Warkany et al. 1966). Further, Norman (1961) pointed out some cases with the coexistence of cerebellar hypoplasia and Werdnig-Hoffmann disease. More recently de León et al. (1984) suggested that this coexistence could be considered as a different pathological entity for which they proposed the name "amyotrophic cerebellar hypoplasia". The different types of dysraphic anomalies and cases of Dandy-Walker syndrome are sometimes accompanied by malformations of the cerebellar vermis (de Haene 1955). High degree malformations of the cerebellum are rare. As regards the relation of cerebellar malformations with other structural disturbances of the CNS, some of them are also referred to the Dandy-Walker syndrome (Hart et al. 1972; Riccardi, Marcus 1978). The last mentioned authors observed cases which they classified as belonging to the group of familial cerebellar agenesis with congenital hydrocephalus and suggested that "an X-linked mutation may be the basis of the primary defect". To avoid confusion with the Dandy-Walker syndrome, the authors "consider that the cerebellar agenesis is the primary insult and that the fourth ventricle outflow portals failed to develop as secondary consequence". As a result they disagreed with the opinion that their cases belonged to the Dandy-Walker syndrome. It is well known that the Dandy-Walker syndrome frequently coexists with different developmental abnormalities such as e.g. agenesis of corpus callosum (Benda 1954). Hart et al. (1972) observed in 68% of cases of the Dandy-Walker syndrome developmental abnormalities of different kinds in the brain as well as in other organs. However, in 28 cases of the Dandy-Walker syndrome which they reviewed in their work, they did not find any case of cerebellar hemispheres' hypoplasia. While Źarski et al. (1972) reported a case of a coexisting cerebellar agenesis and Dandy-Walker syndrome. Our case, in view of the almost total absence of cerebellum, cystic enlargement of the fourth ventricle and minor degree of hydrocephalus could be discussed in the group of cases with the common eponym Dandy-Walker syndrome. The coexistent presence in our case of cerebellar aplasia, ectopia of the dentate nucleus and of ependyma confirms only the supposition of Hart et al. (1972) that the Dandy-Walker syndrome may comprise a broad group of developmental disturbances which probably develop in a very early phase of intrauterine life.

As regards our case, it should be mentioned that there is some confusion of terms "aplasia of cerebellum" and "agenesis". It seems that these two expressions cannot be different pathological states, e.g. case no. 1



reported by Baker and Graves (1931) as agenesis, though as regards its description it should be denoted as aplasia of cerebellum. There are investigators who even express some doubts, whether true total cerebellar agenesis really exists (Urich 1976). From the morphological point of view our case seems to be almost identical with case no. 1 of Baker and Graves (1931) and with the case presented by von Tennstedt (1965). The main difference lies in that these cases showed much greater and deeper mental and neurological disturbances from very early childhood, for example a patient presented by Baker and Graves (1931) did not speak and was not selfdependent. However, there are known asymptomatic or oligosymptomatic cases of cerebellar aplasia (Dow, Moruzzi 1958); our case can serve as complementary to that described by the afore-mentioned authors. Nevertheless, we should like to go further and to present our case as an example of adaptive abilities of the CNS to the absence of a structure which plays so important role in motor and sensory functions. In our opinion, a key-element which could explain the pathomechanism of the so late onset of motor disturbances along with cerebellar signs, are the mentioned above degenerative changes of neurons, especially those of *nucleus gracilis* and *cuneatus*, which we regard as neuroaxonal dystrophy. It is well known, that the nuclei of Goll belong to the most frequently involved regions by this pathological process, what finds support in our observations. A degenerative process of so great severity must lead to significant disturbances of function of the funicular system, which is involved in deep sensory conduction. This system might have played an important role in the compensation of function in the absence of the cerebellum and in the adaptive mechanisms developing parallelly with the maturation of the CNS, since in early childhood she did not show remarkable abnormalities in her behaviour and was able to attend primary school. Moreover, it seems possible that the posterior funicles could be an important element and potential compensatory factor in disturbances of motor functions connected with the cerebellum if the onset of disturbances is supposed to occur in very early stages of development of the central nervous system. Along with maturation of the central nervous system the possibility of compensatory functions gradually diminished.

Apart from neuroaxonal dystrophy throughout the brain, severe degenerative changes with depositions of granular substance in the neurons, glial cells and endothelial cells were observed. It seems that, at least partially, this stored substance could have been a kind of lipopigment (lipofuscin?) but of course other different possibilities of its origin can be discussed. Moreover, many other different types of unspecific damage of neurons in the brain cortex and in the subcortical nuclei were found. In our opinion severe dementia, epilepsy and psychiatric disturbances in the late period of the patient's life could be referred to



generalized degenerative changes of CNS. As a result, severe degenerative processes leading to diffuse damage of the CNS caused a functional decompensation of the formerly "well-balanced" brain, in spite of such great anatomical abnormality as aplasia of the cerebellum.

PRZYPADK DŁUGOLETNIĘGO PRZEŻYCIA Z APLAZJĄ MÓZDŻKU  
I ZMIANAMI ZWYRODNIENIOWYMI W OUN. OPIS PRZYPADKU

Streszczenie

Przedstawiono przypadek 38-letniej kobiety, u której w czasie badania pośmierznego stwierdzono aplazję mózdzku. Badaniem histopatologicznym w jądrach smukłych Golla obserwowano zmiany typu dystrofii neuroaksonalnej a w cytoplazmie neuronów, komórek glejowych oraz śródbłków naczyń krwionośnych kory mózgowej i jąder podkorowych nagromadzenie ziarnistej, PAS-dodatniej substancji. Ponadto neurony kory mózgowej wykazywały różnego typu nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe.

Autorzy zwracają uwagę na niewspółmiernie skąpe objawy kliniczne w pierwszym okresie życia chorej w stosunku do tak znacznej anomalii rozwojowej, jaką jest prawie całkowity brak mózdzku. Przez wiele lat chora nie wykazywała istotnych zaburzeń ruchowych a umysłowo była na tyle wydolna, że mogła ukończyć 3 klasy szkoły podstawowej. Autorzy uważają, że dopiero rozwój dodatkowych zmian zwyrodnieniowych w OUN, w szczególności w jądrach sznurów tylnych, doprowadził do narastającego pogorszenia się sprawności psychoruchowej chorej i przyczynił się do zniesienia istniejącej adaptacji OUN do braku funkcji tak ważnej struktury jaką jest mózdzek.

СЛУЧАЙ ДОЛГОЛЕТНЕЙ ЖИЗНИ С АПЛАЗИЕЙ МОЗЖЕЧКА  
И ДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ В ЦНС. СЛУЧАЙ БОЛЕЗНИ

Резюме

Представлен случай 38-летней женщины, у которой при аутопсии была обнаружена аплазия мозжечка. Гистопатологическое исследование нежных ядер Голля показало изменения типа невроаксомальной дистрофии. В цитоплазме нейронов, глиальных клеток и эндотелиев кровеносных сосудов, а также субкортикальных ядер наблюдалось накопление зернистого, PAS-положительного вещества. Кроме того нейроны мозговой коры показывали своеобразные дегенеративные изменения.

Авторы обращают внимание на несоразмерно скудные в ранний период жизни больной клинические симптомы столь значительной аномалии развития, какой является почти полное отсутствие мозжечка. В течение многих лет больная не проявляла существенных нарушений двигательной активности, а психически была настолько развитой, что могла окончить три класса начальной школы. Считается, что только развитие добавочных дегенеративных изменений в ЦНС, в особенности в ядрах задних канатиков, привело к поступающему ухудшению психодвигательной способности больной и способствовало заторможению адаптации ЦНС к атрофии функции такой важной структуры, какой является мозжечок.



## REFERENCES

1. Baker R. C., Graves G. O.: Cerebellar agenesis. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1931, 25, 548—555.
2. Benda C. E.: The Dandy-Walker syndrome of the so-called atresia of the foramen of Magendie. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1954, 13, 14—29.
3. Dow R. S., Moruzzi G.: *Physiology and pathology of the cerebellum*. University of Minnesota Press, Minneapolis, 1958.
4. Haene de A.: Agénésie partielle du vermis du cervelet à caractère familial. 1955, *Acta neurol. belg.*, 1955, 55, 622—628.
5. Hart M. N., Malamud N., Ellis W. C.: The Dandy-Walker syndrome. A clinicopathological study based on 28 cases. *Neurology*, (Minneapolis) 1972, 22, 771—780.
6. León de G. A., Grover W. D., D'Cruz C. A.: Amyotrophic cerebellar hypoplasia: A specific form of infantile spinal atrophy. *Acta neuropath.*, (Berl.) 1984, 63, 282—286.
7. Norman R. M.: Cerebellar hypoplasia in Werding-Hoffmann disease. *Arch. Dis. Child.*, 1961, 36, 96—101.
8. Norman R. M.: Neuropathological findings in trisomies 13—15 and 17—18 with special reference to the cerebellum. *Dev. Med. Child Neurol.*, 1966, 8, 170—177.
9. Riccardi V. M., Marcus E. S.: Congenital hydrocephalus and cerebellar agenesis. *Clin. Genet.*, 1978, 13, 443—447.
10. Tennstedt von A.: Kleinhirnaplasie beim Erwachsenen. *Zbl. allg. Path.*, 1965, 107, 301—304.
11. Terplan K. L., Sandberg A. A., Aceto T. Jr: Structural anomalies in the cerebellum in association with trisomy. *J. A. M. A.*, 1966, 197, 557—568.
12. Urich H.: Malformations of the nervous system, perinatal damage and related conditions in early life. In: *Greenfields Neuropathology* 3rd. ed. Eds: W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. Edward Arnold Ltd. London 1976, 361—469.
13. Warkany J., Passarage E., Smith L. B.: Congenital malformations in autosomal trisomy syndromes. *Am. J. Dis. Child.*, 1966, 112, 502—517.
14. Żarski St., Dziduszko J., Rycembel Z., Dietrich-Rap Z.: Pomyślny wynik chirurgicznego leczenia zespołu Dandy-Walkera współistniejącego z agenezją mózdzku. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1972, 6, 653—656.

Authors' address: Institute of Neurology Medical Academy, Department of Neuropathology, 31-503 Kraków, Botaniczna 3.



PAWEŁ P. LIBERSKI, WIELISŁAW PAPIERZ, JANINA SZULC-KUBERSKA

## MOTOR NEURON DISEASE ASSOCIATED WITH CANCER

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

Paraneoplastic disorders (PN) may be defined as diseases due to neoplasms elsewhere in the body but not due to local metastases or infiltration. The central and peripheral nervous systems are to a great extent involved in paraneoplastic processes. However, a detailed classification has yet to be devised (Norris 1972, 1979). According to Norris (1972, 1979) involvement of the spinal cord is a prominent sign among paraneoplastic encephalopathies, and this led to a distinction between syndromes as follows: long tract myelopathy, amyotrophic myelopathy (reminiscent of amyotrophic lateral sclerosis — ALS) and necrotizing encephalomyelopathy. Other causes of spinal cord dysfunction, particularly of toxic, nutritional and deficiency origin should of course be excluded.

### MATERIAL AND METHODS

A 72-year-old man developed weakness and wasting in both upper (Fig. 1) and lower extremities, accompanied by numerous fasciculations. During the first admission (1982) the search for occult carcinoma was negative. At the second admission (1983) the patient revealed atrophy of the muscles, more evident in the upper extremities (Fig. 2), accompanied by frequent fasciculations in upper and lower extremities. The fasciculations were also observed in the tongue, but occurred less frequently. Reflexes were hypoactive in the upper, and absent in the lower extremities. The plantar response was always flexor and other pyramidal signs were never observed. The patient also complained of paresthesia of the trunk and extremities. It seemed also that tactile discrimination was slightly reduced. Laboratory examinations were as follows: erythrocyte sedimentation rate 65/102, red and white blood cell counts together with differentiation counts, urinalysis, fasting blood sugar were within nor-

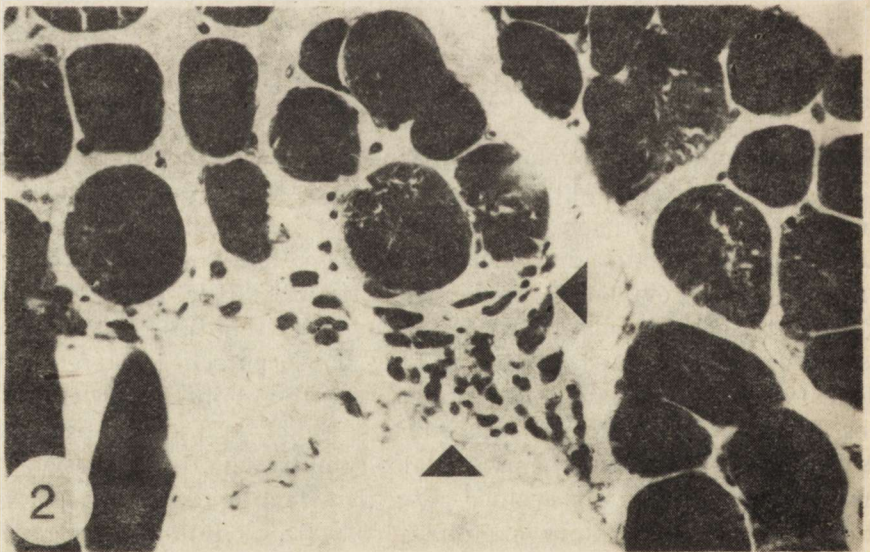


mal limits. EMG revealed numerous fasciculations. Single potentials were impossible to evaluate owing to overlapping of fasciculations. X-ray studies revealed a large, dense mass in the hilus of the right lung, suggestive of carcinoma with metastases to lymph nodes at the hilus, and to the mediastinum. Fine needle biopsy of the enlarged lymph nodes



*Fig. 1.* Patient with motor neuron disease and lung cancer. Note atrophy of the thenar muscles (stars)

*Ryc. 1.* Pacjent z chorobą neuronu ruchowego i rakiem płuca. Zwracają uwagę zaniki mięśni kłębu (gwiazdki)



*Fig. 2.* Muscle biopsy. Note denervation atrophy (arrows). H—E,  $\times 160$

*Ryc. 2.* Biopsja mięśnia. Zanik z odnerwienia (strzałki). H—E. Pow. 160  $\times$

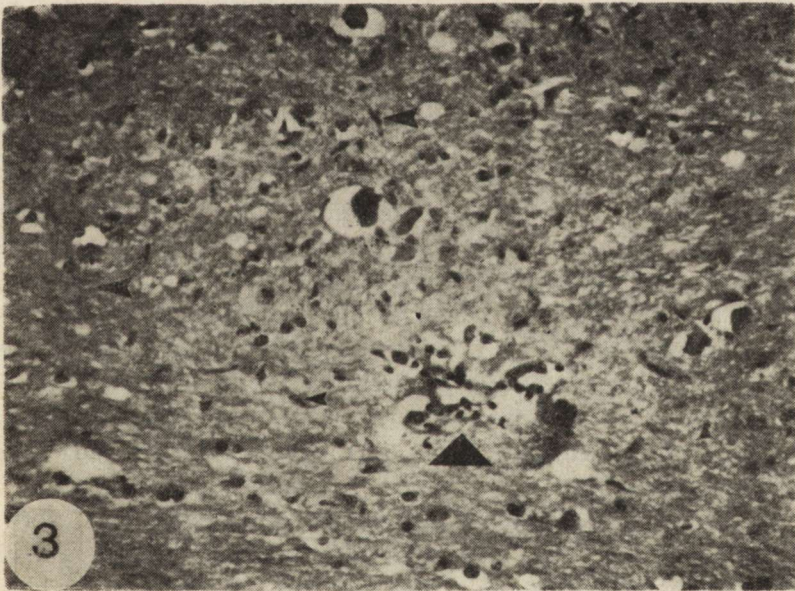


at the supraclavicular fossa revealed carcinomatous cells most consistent with oat cell carcinoma cells. The course of disease was slowly and steadily progressive, and was complicated with pneumonia at the terminal stage. The patients died with symptoms of circulatory and respiratory collapse.

The brain was removed and fixed in 10% formalin. Samples were embedded in paraffin and slides were stained with H-E, and luxol violet.

### RESULTS

Neuropathological examination revealed lesions confined to the spinal cord, medulla, pons and midbrain. The changes in cerebral cortex, cerebellum, basal ganglia, thalamus and hypothalamus were unremarkable. In the spinal cord rarefaction and myelin pallor were seen in lateral funiculi (pyramidal tracts). The dorsal funiculi were also affected. Neuronal loss of moderate degree accompanied by mild proliferation of microglial cells was seen in the anterior horns (Fig. 3). In the medulla (section through decussation of pyramidal tracts) pyramidal tracts were pale. In the next section (through inferior olivary nucleus) lymphocytic infiltration of the leptomeninges was found. In the dorsal nucleus of



*Fig. 3.* Anterior horn of the spinal cord. Neuronal loss, lymphocytic cuffs (large arrow) and microglial cells (small arrows). H—E.  $\times 160$

*Ryc. 3.* Róg przedni rdzenia kręgowego. Zanik neuronów, nacieki limfocytarne (duża strzałka) oraz rozplem mikrogleju (małe strzałki). H—E. Pow.  $160 \times$





*Fig. 4.* Inferior olive. Lymphocytic cuffs (large arrow) and abundant proliferation of microglia (small arrows). H—E.  $\times 160$

*Ryc. 4.* Oliwka dolna. Nacieki limfocytarne (duża strzałka) oraz znaczny rozplem mikrogleju (małe strzałki). H—E. Pow. 160  $\times$

the vagus nerve neuronal loss was seen, accompanied by delicate perivascular cuffs composed of lymphocytes. The greatest changes occurred in the inferior olivary nucleus (Fig. 4). Here proliferation of microglial cells was abundant, with formation of microglial nodules and microglial infiltration of nervous parenchyma. The majority of microglial cells were seen around olivary neurons, which, in turn, showed features of central chromatolysis, rarefaction, homogenization and total destruction. Perivascular lymphocytic cuffs were observed. The nucleus of the hypoglossal nerve revealed proliferation of microglial cells accompanied by perivascular lymphocytic cuffs. The changes seemed to be symmetrical in both hypoglossal nuclei. In the pontine nuclei small hemorrhages occurred together with moderate proliferation of microglial cells. More advanced proliferation of both astrocytes and microglial nuclei was observed in some subependymal regions. In the nuclei of the VIth and VIIth cranial nerves some neuronal loss was observed together with proliferation of microglial cells. In the midbrain the lesions were confined to the nuclei of both the IIIrd and IVth cranial nerves, in which some proliferation of microglial cells was also observed, but here the neurons seemed to be quite well preserved. Both the red nucleus and substantia nigra were intact. Abundant proliferation of microglial cells was observed on the lateral midbrain.



## DISCUSSION

Paraneoplastic ALS was firstly described by Norris and Engel (1965). Among 150 ALS cases they found 13 cases of concomitant neoplasms. Carcinomas of the lung and bronchi (3 cases) and of colon (2 cases) predominated. It should be stressed that neuropathological examination of the CNS revealed only degenerative changes without any inflammation. In the same year Brain et al. (1965) described 11 cases of motor neuron disease (MND) associated with neoplastic processes, and lung cancer was found most frequently. The case number 5 was particularly remarkable due to occurrence of paresthesia, which has not been typical for most reported ALS cases. However, paresthesia has been also observed in the case described here. Neuropathological examinations were performed only in two cases of the series of Brain and co-workers (1965). The spinal cord lesions consisted of mild neuronal loss in the anterior horns, moderate fibrillary gliosis, pallor and demyelination of pyramidal tracts, and of the posterior columns. Brain et al. (1965) stressed the more benign course of the MND associated with neoplasms than of common ALS cases without cancer. Shy and Silverstein (1965) found 9 cases associated with neoplasms among 186 ALS cases. In the more recent published series Norris (1979) found 18 cases of neoplasms (6%) among 300 ALS cases. However, Kurtzke and Beebe (1980) found only 3 cases of cancer among their ALS patients in comparison with 4 cases in the control group of comparable size.

Despite the evident lack of crucial evidence that ALS (or better MND) is ultimately connected with neoplasia, several reports of such association have been published. Walton et al. (1968) described a 44-year-old man with Hodgkin's disease associated with lower MND. Here neuropathological findings were most consistent with ALS changes, although perivascular cuffs together with more generalized inflammatory infiltration, and neuronophagia were observed. It should be stressed, therefore, that a clear cut picture of the inflammatory process was also the hallmark of the case presented here. TEM examination of the Walton et al. (1969) case revealed 40—50-nm particles, similar to polioviruses. In a case reported by Peters and Clatanoff (1968) MND was associated with macroglobulinemia, and on chemotherapy of chlorambucil (4 mg daily) there seemed to be fewer fasciculations, and the strength of the muscles improved. It became possible to elicit some reflexes, absent before therapy. In a case of Costa et al. (1974) the occurrence of MND in the sister of a granulocytic leukemia sufferer was described. Such an association between the two processes developing in sisters might suggest a genetic background or some common environmental factor(s). In another study (Somasundaram et al. 1975) six patients with MND and malignant lymphomas (5 with Hodgkin's disease and 1 with non-Hodgkin



lymphoma) were described. Here the neuropathological examination was most consistent with ALS. The case of Winkler and Richardson (1977) also demonstrated signs and symptoms of MND associated with multiple myeloma.

To sum up from the cases reviewed here it is evident that in the vast majority of cases the neuropathological picture is most consistently a purely degenerative MND similar to, or identical with ALS. In a very small number of cases (and the case described here is an example of this) inflammatory changes reminiscent of polyomyelitis dominate the neuropathological picture. Such cases might, therefore, have an infectious or immunologic pathogenesis. Therefore, the suggestion of a possible viral cause of MND, associated with cancer, is further favoured by the discovery in wild mice of a spontaneous MND caused by type C-retrovirus, which is also responsible for malignant lymphoma in these wild mice (Gardner et al. 1973). Further elaboration of this model (Oldstone et al. 1977; Gardner et al. 1979) has led to the establishment of a potentially useful model for ALS, but a real parallel between this model and the human disease, particularly ALS associated with cancer, is still conjectural.

Acknowledgements: The authors thank dr H. Fraser, Neuropathogenetic Unit, Edinburgh, U.K. for helpful language assistance.

## CHOROBA NEURONU RUCHOWEGO WSPÓLISTNIEJĄCA Z RAKIEM PŁUC

### Streszczenie

Opisano przypadek 72-letniego mężczyzny, z objawami choroby neuronu ruchowego w przebiegu raka płuca. Badanie neuropatologiczne wykazało zmiany zwyrodnieniowo-zapalne ograniczone do rogów przednich rdzenia kręgowego, szeregu jąder ruchowych pnia mózgu i oliwki dolnej. Obraz przypominał *poliomyelitis anterior*. W dyskusji przedstawiono dane kliniczne i doświadczalne dotyczące powiązania choroby neuronu ruchowego z procesami nowotworowymi.

## БОЛЕЗНЬ ДВИГАТЕЛЬНОГО НЕВРОНА В ХОДЕ РАКА ЛЕГКИХ

### Резюме

Описывается случай 72-летнего больного с симптомами болезни двигательного нейрона (напоминающей SLA) в ходе рака лёгких. При невропатологическом исследовании были обнаружены дегенеративные изменения, но лишь только в передних рогах спинного мозга, в ряду двигательных ядер мозгового ствола и нижней оливе. В целом картина напоминала *poliomyelitis anterior*. В дискуссии представлены клинические и экспериментальные данные, в которых учитываются связи болезни двигательного нейрона с раковыми процессами.



## REFERENCES

1. Brain L., Croft P. B., Wilkinson M.: Motor neuron disease as a manifestation of neoplasm. *Brain*, 1965, 88, 479—500.
2. Costa J. C., Rabson A. S., Tralka T. S., Engel W. K., Canellos G. P., Bratenhal C. G.: Leukemia and motor neuron disease. *Lancet*, 1974, 111, 107—108.
3. Gardner M. B., Henderson B. E., Officer E., Rongey R. W., Parker J. C., Oliver C., Huebner R. J.: A spontaneous lower motor neuron disease apparently caused by indigenous type-C RNA virus in a population of wild mice. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1973, 51, 1243—1254.
4. Gardner M. B., Pal B. K., Rasheed S., Bryant M. L., Rongey R. W., Andrews J. M.: Murine retrovirus motor neuron disease. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Vol. 2. Eds: S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Academic Press, New York, 1979, 187—207.
5. Kurtzke J. F., Beebe G. W.: Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: I. A case control comparison based on amyotrophic lateral sclerosis deaths. *Neurology*, 1980, 30, 453—462.
6. Norris F. H.: The remote effects of cancer on the nervous system. *Z. Neurol.*, 1972, 201, 201—210.
7. Norris F. H.: Remote effects of cancer on the spinal cord. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 38. Eds: P. J. Vinken, G. W. Bruyn, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-New York-Oxford, 1979, 669—677.
8. Norris F. H., Engel W. K.: Carcinomatous amyotrophic lateral sclerosis. In: *The remote effects of cancer on the nervous system*. Eds: L. Brain, F. H. Norris, Grune and Stratton, New York-London, 1965, 24—34.
9. Oldstone M. B. A., Lampert P. W., Lee S., Dixon F. J.: Pathogenesis of the slow diseases of the central nervous system associated with WM 1504E virus. *Am. J. Path.*, 1977, 88, 193—206.
10. Peters H. A., Clatanoff D. V.: Spinal muscular atrophy secondary to macroglobulinemia. *Neurology*, 1968, 18, 101—108.
11. Shy G. M., Silverstein N. I.: A study of the effects upon the motor unit by remote malignancy. *Brain*, 1965, 88, 515—528.
12. Somasundaram M., Cho E. S., Posner J. B.: Anterior horn cell degeneration as a "remote effect" of lymphoma. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 355—356.
13. Walton J. N., Tomlinson B. E., Pearce G. W.: Subacute „poliomyelitis" and Hodgkin's disease. *J. Neurol. Sci.*, 1968, 6, 435—445.
14. Winkler G. F., Richardson E. P.: Discussion. Case report. Massachusetts General Hospital. *New Engl. J. Med.*, 1977, 297, 266—274.

Authors' address: Dept. of Neurology, Medical Academy, Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź.



MIECZYSLAW WENDER, ANDRZEJ GONCERZEWICZ

## MORPHOMETRIC STUDIES OF THE DEVELOPING OPTIC NERVE IN WISTAR RATS \*

Department of Neurology, Academy of Medicine, Poznań, Poland

Studies on the development of the optic nerve may help in elucidation of maturation events in the central nervous system as viewed by general biology. However, despite some studies published up till now (Bishop et al. 1969; Moore et al. 1976; Vaney, Hughes 1976; Stone, Champion 1978; Guillery et al. 1982; Kirby et al. 1982), several questions concerning the interrelationship between axon and myelin in the course of development still remain open. Their importance ensues additionally from the particular susceptibility of this nerve to various pathogenic factors, exceeding that of other structures of the central nervous system. The problem is of great importance as regards Wistar rats, which often serve as experimental model for studying the effect of exogenous factors on myelination and other developmental events. Bearing this in mind, we have undertaken morphometric studies of the developing optic nerve in Wistar rats.

### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on Wistar rats at 12, 21, 30 and 60 days of extrauterine life, four animals from each group were perfused through the aorta with a mixture of 2.0% glutaraldehyde and 3.4% paraformaldehyde buffered to pH 7.4 with 0.1 M sodium cacodylate. Short pieces of the intracranial part of optic nerves were kept in cold fixative for additional 3 hours, washed overnight in cacodylate buffer and then postfixed for 1 hour in 1% osmium tetroxide. Properly oriented pieces were embedded in Epon and subsequently the resin blocks were angled so that the cutting plane was parallel to the transverse

---

\* Investigations supported by the Research Agreement No 10.4.06.3.2, from the Polish Academy of Sciences.



section of the nerve. After this adjustment, gold ultrathin sections were cut on Reichert's Ultratome, collected on coated grids, stained with uranium and lead salts and photographed with an Opton electron microscope.

The areas sampled for photography were randomly selected across the whole nerve face. However, the marginal part of the nerve, where axons of smaller caliber predominated, was excluded from this study. The bundles of axons situated near medium size capillaries in areas devoid of glial cell bodies were preferred for photography. Usually six adjacent non-overlapping micrographs with strict reference to the grid bars were taken from each area at the primary magnification  $\times 10\,000$ . Four to six of these areas were enough to obtain the appropriate number of axons for counting. Only axons whose entire profiles lay fully within the micrograph area were counted.

The final measurements were performed on prints magnified photographically to  $\times 35\,000$  with Reichert's Multioperational Planimeter. Thus, such values as axonal diameter, circumference and thickness of its myelin sheath were computed automatically, and subsequently they were recounted and estimated in micrometers ( $\mu\text{m}$ ). In addition, the number of myelin lamellae for every measured axon was counted manually.

Moreover, in the search for possible relationships between the above mentioned values, the following ratios were estimated for each axon:

1. Ratio of myelin thickness (in  $\mu\text{m}$ ) to the number of myelin lamellae (the compaction index).
2. Ratio of the axon area (in  $\mu\text{m}^2$ ) to the number of myelin lamellae.
3. Ratio of the difference between the actual diameter of the measured axon and the mean diameter of not yet myelinated axons to the number of myelin lamellae.
4. Ratio of the axon area (in  $\mu\text{m}^2$ ) to the length of its myelin sheath, estimated from the equation  $L = 2\pi RM$ , where  $R$  is the sum of one half of the myelin thickness and one half of axon diameter, and  $M$  is the number of myelin lamellae (Webster 1971).

More directly, the axon-myelin interrelationship was analyzed in two ways. First, all results concerning myelin were divided into three classes according to the axon diameter. For more details of this division see legends in Tables 9—12. Also a correlation was studied between the number of myelin lamellae and axon diameter. All these data were statistically analyzed.

## RESULTS

The results of morphometric studies of the developing optic nerve are presented in Tables 1—8. The following observations should be stressed. The mean thickness of myelin increased gradually in the period of observations (up to the 60th day). However, the growth of axon



Table 1. Developing optic nerve of the rat. Thickness of myelin (in  $\mu\text{m}$ )  
 Tabela 1. Rozwijający się nerw wzrokowy szczura. Grubość mieliny (w  $\mu\text{m}$ )

№ Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maxi- mum Maksi- mum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartości	
1	12 days dni	167	0.13	0.00	0.79	0.22		
2	21 days dni	177	0.22	0.00	0.69	0.20	4.12** (1-2)	5.61** (2-3)
3	30 days dni	259	0.29	0.02	0.57	0.09	10.36** (1-3)	10.34** (2-4)
4	60 days dni	131	0.41	0.15	0.95	0.16	12.59** (1-4)	8.89** (3-4)

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

\* statistically significant  
istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
wysoco istotne statystycznie

Table 2. Developing optic nerve of the rat. Axon diameter (in  $\mu\text{m}$ )  
 Tabela 2. Rozwijający się nerw wzrokowy szczura. Przekrój aksonu (w  $\mu\text{m}$ )

№ Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maxi- mum Maksi- mum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartości	
1	12 days dni	167	0.52	0.15	1.81	0.27		
2	21 days dni	177	0.69	0.28	1.92	0.29	5.35** (1-2)	1.00 (2-3)
3	30 days dni	259	0.71	0.26	1.57	0.24	7.40** (1-3)	1.90 (2-4)
4	60 days dni	131	0.76	0.19	2.44	0.37	6.22** (1-4)	1.45 (3-4)

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

\* statistically significant  
istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
wysoco istotne statystycznie



Table 3. Developing optic nerve of the rat. Number of myelin lamellae  
 Tabela 3. Rozwijający się nerw wzrokowy szczura. Liczba blaszek mieliny

Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartości	
1	12 days dni	167	1.79	0.00	11.50	2.89		
2	21 days dni	177	3.94	0.00	13.50	3.26	6.39** (1-2)	7.82** (2-3)
3	30 days dni	259	6.07	0.50	12.50	2.39	16.44** (1-3)	8.02** (2-4)
4	60 days dni	131	6.73	2.00	16.50	2.63	15.12** (1-4)	2.51* (3-4)

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

\* statistically significant  
 istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
 wysoce istotne statystycznie

Table 4. Developing optic nerve of the rat. Ratio of axon area to the number of myelin lamellae  
 Tabela 4. Rozwijający się nerw wzrokowy szczura. Stosunek pola aksonu do liczby blaszek mieliny

Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartości	
1	12 days dni	167	227.49	14.29	695.20	143.40		
2	21 days dni	177	185.51	10.59	1304.00	202.92	2.17* (1-2)	7.40** (2-3)
3	30 days dni	259	81.73	6.72	813.60	80.14	13.34** (1-3)	7.40** (2-4)
4	60 days dni	131	53.06	12.94	151.02	24.93	13.70** (1-4)	3.98** (3-4)

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

\* statistically significant  
 istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
 wysoce istotne statystycznie



diameter ended earlier (the difference between the mean axon diameter of 30- and 60-day-old animals was already insignificant). The increase in number of myelin lamellae was noticed in the course of the whole period of observation, however, after the 30th day of life, it was very slow (the mean difference between 30- and 60-day-old rats is only 0.66). Similar observations concern the ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae (compaction index). The regression equation of the number of myelin lamellae to the axon diameter in the developing optic nerve of the rat was linear in all experimental groups.

Thickness of myelin, number of myelin lamellae and the ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae were related with the axon diameter in all age classes, however, the greatest differences were found in the youngest group — 12 days of postnatal life (Tab. 9, 10 and 11). The positive correlation between the number of myelin lamellae and the diameter of the axon was also highly significant (Tab. 12).

#### DISCUSSION

The understanding of the basic mechanism of myelination of nerve fibres depends on the solution of the following question: does the differentiation of neuroglia of the oligo line transform inactive cells into myelinating ones, being also the trigger of the impulse to the onset of

Table 5. Ratio of myelin thickness to the number of myelin lamellae

Tabela 5. Stosunek grubości mieliny do liczby blaszek mieliny

Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartości	
1	12 days dni	167	0.77	0.00	4.06	1.13		
2	21 days dni	177	1.29	0.00	5.80	0.97	4.55** (1-2)	5.65** (2-3)
3	30 days dni	259	1.70	0.97	7.20	0.53	11.33** (1-3)	7.22** (2-4)
4	60 days dni	131	1.92	0.95	2.80	0.29	11.32** (1-4)	4.42** (3-4)

$$t_{0.05} = 1.96$$

$$t_{0.01} = 2.58$$

\* statistically significant  
istotnie statystycznie

\*\* highly statistically significant  
wysoce istotnie statystycznie



myelinogenesis depending on the information present in the genome of these cells or/and conditioned by signals deriving from the axons to be myelinated, and being generated in the perikaryon (Tennekoon et al. 1977).

The briefly presented problem was studied by one of us in collaboration with other coworkers in three consecutive works. In the first one concerning normal myelination of the rabbit optic nerve (Wender et al. 1979) we noticed that larger axons were the first to acquire the myelin sheath, this seeming to suggest that axons must reach a definite thickness before they can be myelinated. This fact speaks in favour of the hypothesis that the onset of myelinogenesis is triggered by mechanical axonal signals. In our further studies (Wender et al. 1980) we examined the effect of unilateral enucleation performed in 8-day-old rabbits on the myelination process. We found that disconnection of axons from their parental perikarya caused a considerable delay and reduction of diffe-

Table 6. Developing optic nerve of the rat

$$\text{Ratio: } \frac{\text{Dx} - \text{Dm}}{\text{number of myelin lamellae}}$$

Tabela 6. Rozwijający się nerw wzrokowy szczura

$$\text{Stosunek: } \frac{\text{Dx} - \text{Dm}}{\text{liczba blaszek mieliny}}$$

№ Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean		Maxi- mum Maksi- mum	Standard deviation Odchylenie standardowe	“t” value	
			Średnia	Minimum			„t”	wartości
1	12 days dni	167	0.58	-17.81	36.39	9.78		
2	21 days dni	177	0.96	-14.69	29.91	4.94	0.46 (1-2)	1.32 (2-3)
3	30 days dni	259	1.42	-12.90	15.10	2.16	1.33 (1-3)	2.07* (2-4)
4	60 days dni	131	1.89	-0.66	7.71	1.56	1.51 (1-4)	2.19* (3-4)

Dx — axon diameter  
przekrój aksonu

Dm — mean diameter of nonmyelinated axon  
średni przekrój niezmielinizowanego aksonu

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

\* statistically significant  
istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
wysocze istotne statystycznie



rentiation of the immature neuroglia cells into oligodendrocytes and that these cells when maturing in contact with degenerating immature axons are incapable of promoting myelinogenesis. However, in our last work of this series (Wender et al. 1981), when we were producing central Wallerian degeneration in the mature optic nerve, we found that an intact functional connection between the perikaryon, axon and myelin sheaths is not necessary in the mature optic nerve for initiation of remyelination in the form of topographically aberrant myelin sheaths.

In the present morphometric studies of the developing optic nerve in Wistar rats we have found a well pronounced dependence between the thickness of myelin, number of myelin lamellae and axon diameter in the course of myelination. These facts speak in favour of the conception of a close interrelationship between axon and myelin, at least in the period of myelinogenesis.

The nature of the neuronal factor(s) which mediate in the ability of the axon for stimulation of myelin production is yet unknown. Several possible mechanisms may be considered. One possibility is that the stimulation of myelinogenesis is controlled by a mechanical factor such as an expanding axon. Despite that fact that our studies have indicated a positive correlation between axon diameter, myelin thickness and the number of myelin lamellae, the view that the mechanical factor should

Table 7. Developing optic nerve of the rat. Ratio of axon area to the length of myelin sheath  
Tabela 7. Rozwijający się nerw wzrokowy szczura. Stosunek pola aksonu do długości osłonki mielinowej

Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartości	
1	12 days dni	167	5.36	0.12	17.02	4.09		
2	21 days dni	177	2.79	0.15	13.19	3.33	22.70** (1-2)	0.15 (2-3)
3	30 days dni	259	0.88	0.15	8.51	1.03	32.14** (1-3)	2.08* (1-4)
4	60 days dni	131	0.46	0.15	1.50	0.22	32.27* (1-4)	2.24* (3-4)

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

\* statistically significant

istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant

wysoce istotne statystycznie



be the exclusive and decisive one cannot be accepted without some reservation, basing on our studies of the Wallerian degeneration in the mature and developing optic nerve.

Another hypothesis was advanced by Brady and Quarles (1973) who basing on the presumed role of membrane glycoprotein in cellular recognition believed that the control of myelinogenesis might involve a glycoprotein mediated interaction between the axon and the myelinating cell. The latter problem was widely developed by Quarles et al. (1973), who examined in detail the myelin associated glycoprotein (MAG), a substance present between the proteolipid lamellae of myelin and the axonal proteins.

According to some suppositions, the neuron produces chemical signals which, after being transferred by the mechanism of axonal transport, are able to stimulate myelination (Singer, Steinberg 1972; Giorgi et al.

Table 8. Regression equation of the number of myelin lamellae to the axon diameter (mean) in the developing optic nerve of the rat

Tabela 8. Równanie regresji liczby blaszek mieliny do przekroju aksonu (średnia) rozwijającego się nerwu wzrokowego szczura

12 days of postnatal life 12 dzień życia pozapłodowego		21 days of postnatal life 21 dzień życia pozapłodowego		30 days of postnatal life 30 dzień życia pozapłodowego		60 days of postnatal life 60 dzień życia pozapłodowego	
Number of myelin lamellae	Axon diameter (mean)	Number of myelin lamellae	Axon diameter (mean)	Number of myelin lamellae	Axon diameter (mean)	Number of myelin lamellae	Axon diameter (mean)
Liczba blaszek mieliny	Przekrój aksonu (średnia)	Liczba blaszek mieliny	Przekrój aksonu (średnia)	Liczba blaszek mieliny	Przekrój aksonu (średnia)	Liczba blaszek mieliny	Przekrój aksonu (średnia)
(x)	(y)	(x)	(y)	(x)	(y)	(x)	(y)
0.0	0.42	0.0	0.48	0.0	0.46		
1.0	0.47	1.0	0.53	1.0	0.50		
2.0	0.52	2.0	0.58	2.0	0.54	2.0	0.35
3.0	0.59	3.0	0.63	3.0	0.59	3.0	0.44
4.0	0.64	4.0	0.67	4.0	0.63	4.0	0.54
5.0	0.70	5.0	0.72	5.0	0.67	5.0	0.75
6.0	0.75	6.0	0.77	6.0	0.71	6.0	0.76
7.0	0.81	7.0	0.82	7.0	0.75	7.0	0.81
8.0	0.86	8.0	0.87	8.0	0.79	8.0	0.91
9.0	0.92	9.0	0.91	9.0	0.83	9.0	1.01
10.0	0.97	10.0	0.96	10.0	0.87	10.0	1.10
11.0	1.09	11.0	1.06	11.0	0.91	11.0	1.19
				12.0	0.96	12.0	1.29
				13.0	1.00	13.0	1.38

$$y = 0.42 + 0.66x$$

Linear relation

Stosunek liniowy

$$y = 0.48 + 0.05x$$

Linear relation

Stosunek liniowy

$$y = 0.46 + 0.04x$$

Linear relation

Stosunek liniowy

$$y = 0.35 + 0.08x$$

Linear relation

Stosunek liniowy



Table 9. Axon-myelin interrelationship in the developing optic nerve of the rat. Division into classes according to Dx (diameter of axon). Thickness of myelin (in  $\mu\text{m}$ )

Tabela 9. Stosunek akson-mielina w rozwijającym się nerwie wzrokowym szczura. Podział na klasy stosownie do Dx (przekrój aksonu). Grubość mielin (w  $\mu\text{m}$ )

No Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Mini- mum Mini- mum	Maxi- mum Maksi- mum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartość		
1	12 days dni								
	Class I Klasa I	82	0.03	0.00	0.72	0.11	4.83** (1-2)	10.88** (1-3)	4.86** (2-3)
	Class II Klasa II	59	0.16	0.00	0.75	0.20			
	Class III Klasa III	22	0.43	0.00	0.80	0.26			
2	21 days dni								
	Class I Klasa I	38	0.09	0.00	0.38	0.13	3.78** (1-2)	7.08** (1-3)	6.01** (2-3)
	Class II Klasa II	97	0.20	0.00	0.50	0.15			
	Class III Klasa III	42	0.36	0.00	0.63	0.13			
3	30 days dni								
	Class I Klasa I	36	0.22	0.03	0.34	0.07	3.90** (1-2)	6.98** (1-3)	4.43** (2-3)
	Class II Klasa II	134	0.28	0.02	0.59	0.09			
	Class III Klasa III	53	0.35	0.16	0.56	0.09			
4	60 days dni								
	Class I Klasa I	28	0.35	0.15	0.60	0.11	2.00* (1-2)	4.03** (1-3)	2.78** (2-3)
	Class II Klasa II	55	0.40	0.15	0.74	0.14			
	Class III Klasa III	48	0.45	0.16	0.95	0.17			

\* statistically significant  
istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
wysoce istotne statystycznie

$t_{0.05} = 1.96$   
 $t_{0.01} = 2.58$

Mean Dx =  $0.65 \pm 0.28$

Średnia Dx

Class I =  $\text{Dx} < 0.46$  (25%)

Klasa I

Class II =  $0.46 < \text{Dx} < 0.83$  (50%)

Klasa II

Class III =  $\text{Dx} > 0.83$  (25%)

Klasa III



Table 10. Axon-myelin interrelationship in the developing optic nerve of the rat. Division into classes according to Dx (diameter of axon). Number of myelin lamellae

Tabela 10. Stosunek akson-mielina w rozwijającym się nerwie wzrokowym szczura. Podział na klasy stosownie do Dx (przekrój aksonu). Liczba blaszek mieliny

Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Minimum Minimum	Maximum Maksimum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartość		
1	12 days dni								
	Class I Klasa I	82	0.45	0.00	10.00	1.45	4.70** (1-2)	10.72** (1-3)	5.04** (2-3)
	Class II Klasa II	59	2.14	0.00	8.50	2.62			
	Class III Klasa III	22	5.82	0.00	11.50	3.61			
2	21 days dni								
	Class I Klasa I	38	1.72	0.00	8.00	2.70	3.47** (1-2)	8.38** (1-3)	5.85** (2-3)
	Class II Klasa II	97	3.62	0.00	9.50	2.92			
	Class III Klasa III	42	6.68	0.00	13.50	2.58			
3	30 days dni								
	Class I Klasa I	36	4.58	0.00	9.00	2.19	2.98** (1-2)	5.33** (1-3)	4.01** (2-3)
	Class II Klasa II	134	5.84	0.00	12.00	2.25			
	Class III Klasa III	53	7.36	2.50	12.00	2.54			
4	60 days dni								
	Class I Klasa I	28	5.31	2.00	10.00	1.89	2.26** (1-2)	4.25** (1-3)	3.00** (2-3)
	Class II Klasa II	55	6.41	3.00	11.00	2.21			
	Class III Klasa III	48	7.94	4.00	16.50	2.94			

\* statistically significant  
istotne statystycznie

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

Mean Dx =  $0.65 \pm 0.28$

Średnia Dx

Class I =  $Dx < 0.46$  (25%)

Klasa I

Class II =  $0.46 < Dx < 0.83$  (50%)

Klasa II

Class III =  $Dx > 0.83$  (25%)

Klasa III

\*\* highly statistically significant  
wyoce istotne statystycznie



Table 11. Axon-myelin interrelationship in the developing optic nerve of the rat. Division into classes according to Dx (diameter of axon). Rate thickness of myelin to the number of myelin lamellae

Tabela 11. Stosunek akson-mielina w rozwijającym się nerwie wzrokowym szczura. Podział na klasy stosownie do Dx (przekrój aksonu). Stosunek grubości mieliny do liczby blaszek mieliny

Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Mini- mum	Maxi- mum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartość		
1	12 days dni								
	Class I Klasa I	82	0.30	0.00	4.45	0.80	4.74** (1-2)	8.87** (1-3)	3.29** (2-3)
	Class II Klasa II	59	1.16	0.00	4.13	1.34			
	Class III Klasa III	22	2.24	0.00	4.73	1.25			
2	21 days dni								
	Class I Klasa I	38	0.99	0.00	5.80	1.47	1.91 (1-2)	3.39** (1-3)	2.48* (2-3)
	Class II Klasa II	97	1.42	0.00	4.50	0.99			
	Class III Klasa III	42	1.82	0.00	2.98	0.50			
3	30 days dni								
	Class I Klasa I	36	1.79	1.14	4.20	0.65	1.10 (1-2)	1.51 (1-3)	0.86 (2-3)
	Class II Klasa II	134	1.69	1.02	4.80	0.42			
	Class III Klasa III	53	1.64	0.97	2.35	0.31			
4	60 days dni								
	Class I Klasa I	28	2.15	1.49	2.90	0.33	1.08 (1-2)	1.24 (1-3)	0.26 (2-3)
	Class II Klasa II	55	2.07	1.36	3.20	0.32			
	Class III Klasa III	48	2.05	1.04	3.15	0.34			

\* statistically significant  
istotne statystycznie

\*\* highly statistically significant  
wysoce istotne statystycznie

$t_{0.05} = 1.96$

$t_{0.01} = 2.58$

Mean Dx =  $0.65 \pm 0.28$

Średnia Dx

Class I = Dx < 0.46 (25%)

Klasa I

Class II =  $0.46 < Dx < 0.83$  (50%)

Klasa II

Class III = Dx > 0.83 (25%)

Klasa III



Table 12. Axon-myelin interrelationship in the developing optic nerve of the rat. Division into classes according to Dx (diameter of axon). Rate axon area to the number of myelin lamellae

Tabela 12. Stosunek akson-mielina w rozwijającym się nerwie wzrokowym szczura. Podział na klasy stosownie do Dx (przekrój aksonu). Stosunek pola aksonu do liczby blaszek mieliny

No Nr	Period of development Okres rozwoju	Number of estimations Liczba oznaczeń	Mean Średnia	Mini- mum Mini- mum	Maxi- mum Maksi- mum	Standard deviation Odchylenie standardowe	"t" value „t” wartość		
1	12 days dni								
	Class I Klasa I	82	256.67	15.01	514.80	103.36	0.63	4.40**	2.21**
	Class II Klasa II	59	241.04	31.86	695.20	183.67	(1-2)	(1-3)	(2-3)
	Class III Klasa III	22	150.40	53.78	304.47	88.38			
2	21 days dni								
	Class I Klasa I	38	182.43	11.25	438.00	128.08	0.58	0.27	0.81
	Class II Klasa II	97	205.22	25.43	1042.20	227.04	(1-2)	(1-3)	(2-3)
	Class III Klasa III	42	172.41	48.39	1304.00	193.35			
3	30 days dni								
	Class I Klasa I	36	41.49	6.72	200.80	44.58	1.88	6.03**	2.63**
	Class II Klasa II	134	71.31	12.47	813.60	92.09	(1-2)	(1-3)	(2-3)
	Class III Klasa III	53	106.79	37.65	295.20	53.47			
4	60 days dni								
	Class I Klasa I	28	37.43	13.59	100.80	17.24	3.69**	5.74**	3.90**
	Class II Klasa II	55	54.11	26.67	127.27	20.45	(1-2)	(1-3)	(2-3)
	Class III Klasa III	48	74.10	28.77	163.60	31.06			

\* statistically significant  
istotne statystycznie

$t_{0.05} = 1.96$   
 $t_{0.01} = 2.58$

\*\* highly statistically significant  
wysoce istotne statystycznie

Mean Dx =  $0.65 \pm 0.28$

Średnia Dx

Class I =  $Dx \leq 0.46$  (25%)

Klasa I

Class II =  $0.46 < Dx < 0.83$  (50%)

Klasa II

Class III =  $Dx > 0.83$  (25%)

Klasa III



1973; Elam 1974; Weinberg, Spencer 1976). Such a mechanism may work together with the membrane interaction, involving a glycoprotein, most probably myelin-associated glycoprotein. It remains to be determined whether different signals are involved in the initiation of myelinogenesis in the course of development and remyelination, and how far these chemical interactions between neurons, myelin and neuroglia are similar to those involved in the induction of cell differentiation in the course of the development of other tissues.

### CONCLUSIONS

1. The thickness of myelin, number of myelin lamellae and the thickness ratio of myelin to the number of myelin lamellae are related with the axon diameter in the course of the development process of the optic nerve of Wistar rats.

2. There exists a positive correlation between the number of myelin lamellae and the axon diameter during myelinogenesis of the optic nerve of Wistar rats.

3. The development of myelin in the optic nerve of Wistar rats is closely related with the maturation of the axon, however, the nature of this interrelationship has not been solved yet.

Table 13. Axon-myelin interrelationship in the developing optic nerve of the rat. Correlation between the number of myelin lamellae and axon diameter

Tabela 13. Stosunek akson-mielina w rozwijającym się nerwie wzrokowym szczura. Korelacja pomiędzy liczbą blaszek mieliny a przekrojem aksonu

	12 days of postnatal life Mean $\pm$ S.D. 12 dzień życia pozapłodowego Średnia $\pm$ S.D.	21 days of postnatal life Mean $\pm$ S.D. 21 dzień życia pozapłodowego Średnia $\pm$ S.D.	30 days of postnatal life Mean $\pm$ S.D. 30 dzień życia pozapłodowego Średnia $\pm$ S.D.	60 days of postnatal life Mean $\pm$ S.D. 60 dzień życia pozapłodowego Średnia $\pm$ S.D.
Number of myelin lamellae	1.79 $\pm$ 2.89	3.94 $\pm$ 3.26	5.99 $\pm$ 2.47	6.73 $\pm$ 2.63
Liczba blaszek mieliny				
Axon diameter	0.52 $\pm$ 0.27	0.69 $\pm$ 0.29	0.70 $\pm$ 0.25	0.76 $\pm$ 0.37
Przekrój aksonu				
Correlation coefficient	0.65**	0.57**	0.41**	0.51**
Współczynnik korelacji				

\* statistically significant  
istotne statystycznie

$t_{0.05} = 1.96$

\*\* highly statistically significant  
wysoce istotne statystycznie

$t_{0.01} = 2.58$



## BADANIA MORFOLOGICZNE ROZWIJAJĄCEGO SIĘ NERWU WZROKOWEGO SZCZURA WISTAR

### Streszczenie

Przeprowadzono badania morfometryczne nerwu wzrokowego u 12, 21, 30 i 60-dniowych szczurów Wistar.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. W przebiegu rozwoju nerwu wzrokowego grubość mieliny, liczba blaszek mieliny i stosunek grubości mieliny do liczby blaszek mieliny wykazują związek ze średnicą aksonu.

2. W czasie mielinogenezy nerwu wzrokowego istnieje dodatnia korelacja pomiędzy liczbą blaszek mieliny i średnicą aksonu.

3. Rozwój mieliny w nerwie wzrokowym szczura jest ściśle związany z dojrzewaniem aksonów, jednakże istota tego wzajemnego powiązania dotychczas nie jest wyjaśniona.

## МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ЗРИТЕЛЬНОГО НЕРВА КРЫСЫ ВИСТАР

### Резюме

Проводились морфометрические исследования зрительного нерва 12-, 21-, 30- и 60-дневных крыс Вистар. Результаты привели к следующим выводам:

1. В ходе развития зрительного нерва крысы Вистар толщина миелина, число пластинок и соотношение толщины миелина к числу пластинок миелина зависят от диаметра аксонов.

2. При миелиногенезе зрительного нерва крыс обнаруживается положительная корреляция между числом миелиновых пластинок в оболочках и диаметром аксонов.

3. Развитие миелина зрительного нерва крыс Вистар тесно связано с созреванием аксонов но сущность этого взаимоотношения до сих пор не выявлена.

### REFERENCES

1. Bishop G., Clare M., Landau W.: Further analysis of fiber groups in the optic nerve of the cat. *Exp. Neurol.*, 1969, 24, 386—399.
2. Brady R., Quarles R.: The enzymology of myelination. *Molec. Cell. Biochem.*, 1973, 2, 23—29.
3. Elam J.: Association of axonally transported proteins with goldfish brain myelin fractions. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 343—354.
4. Giorgi P., Karlsson J., Sjöstrand J., Field E.: Axonal flow and myelin protein in the optic pathway. *Nature New. Biol.*, 1973, 244, 121—124.
5. Guillery R., Palley E., Torrealba F.: The arrangement of axons according to fiber diameter in the optic tract of the cat. *J. Neurosci.*, 1982, 714—721.
6. Kirby M., Clift-Forsberg L., Wilson P., Rapisardi S.: Quantitative analysis of the optic nerve of the North American opossum (*Didelphis Virginiana*). An electron microscopic study. *J. comp. Neurol.*, 1982, 212, 318—327.
7. Moore C., Kalil R., Richards W.: Development of myelination in optic tract of the cat. *J. comp. Neurol.*, 1976, 125, 125—136.
8. Quarles R., Everly I., Brady R.: Evidence for the close association of a gly-



- coprotein with myelin in rat brain. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 1177—1191.
9. Singer M., Steinberg M.: Wallerian degeneration: a reevaluation based on transected and colchicine-poisoned nerves in the amphibian *Triturus*. *Amer. J. Anat.*, 1972, 133, 51—84.
  10. Stone J., Champion J.: Estimate of the number of myelinated axons in the cat's optic nerve. *J. comp. Neurol.*, 1978, 180, 799—806.
  11. Tennekoon G., Cohen S., Price D., Guy H., McKhann: Myelinogenesis in optic nerve. A morphological, autoradiographic biochemical analysis. *J. Cell. Biol.*, 1977, 72, 604—616.
  12. Webster J. de F.: The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J. Cell. Biol.*, 1971, 48, 348—367.
  13. Weinberg H., Spencer P.: Studies on the control of myelinogenesis. II. Evidence for neuronal regulation of myelin production. *Brain Res.*, 1976, 113, 363—378.
  14. Wender M., Kozik M., Goncerzewicz A.: Neuroglia in central Wallerian degeneration (ultrastructural and histoenzymatic studies). *J. Hirnforsch.*, 1981, 22, 205—216.
  15. Wender M., Kozik M., Goncerzewicz A., Mularek O.: Neuroglia of the developing optic nerve in the course of Wallerian degeneration. *J. Hirnforsch.*, 1980, 21, 418—428.
  16. Wender M., Kozik M., Sniatała-Kamasa M., Mularek O., Pankrac J.: Neuroglia of the optic nerve in the course of myelination. *J. Hirnforsch.*, 1979, 20, 191—200.
  17. Vaney D., Hughes A.: The rabbit optic nerve. Fiber diameter spectrum, fibre count and comparison with a retinal ganglion cell count. *J. comp. Neurol.*, 1976, 170, 241—252.

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



KRYSTYNA DOMAŃSKA-JANIK

## ZABURZENIA METABOLIZMU GLUKOZY W ENERGETYCZNIE WYRÓWNYM NIEDOTLENIENIU MÓZGU SZCZURA

### STRESZCZENIE PRACY HABILITACYJNEJ

Zakład Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

W chwili podjęcia przedstawionych w pracy badań nad oceną zmian metabolicznych mózgu, towarzyszących umiarkowanym postaciom hipoksji, problem jej odrębności jakościowej od ostrych form niedotlenienia był słabo rozróżniany. W połowie lat 70-tych pojawiły się pierwsze dane w piśmiennictwie, wskazujące wyraźnie na odrębny mechanizm tych zaburzeń wyprzedzający pojawienie się deficytu energetycznego. Założono wstępnie, że ich występowanie może być związane z czasowym ograniczeniem zużycia ATP w procesach biochemicznych istotnych dla funkcji lecz nie dla utrzymania integralności (przeżycia) komórek OUN. Reorientacja podstawowego metabolizmu OUN mogłaby stanowić podłoże biochemiczne zaburzeń patofizjologicznych typowych dla umiarkowanego niedotlenienia. Dlatego też, w badaniach prowadzonych w kontrolowanym modelu skompensowanego energetycznie niedotlenienia, skoncentrowano się na ocenie podstawowych przemian metabolicznych wytwarzających i zużywających ATP, ze szczególnym uwzględnieniem procesów syntez makromolekularnych. Ze względu na znaczenie przemiany glukozy w cyklu pentozowym i jej ścisłą korelację z procesami anabolicznymi komórki określono jej aktywność w mózgu w normie i w niedotlenieniu. Część zagadnień, dotyczących regulacji wewnątrzkomórkowego metabolizmu glukozy, a szczególnie jej wykorzystania w procesach syntezy związków makromolekularnych oraz w przemianie prowadzącej do powstania pentoz opracowano w układach modelowych *in vitro*. Ocenę uszkodzeń biochemicznych, będących skutkiem umiarkowanego niedotlenienia, przeprowadzono na podstawie analizy metabolizmu lipidów mózgu. Otrzymane wyniki pozwoliły na podjęcie próby wyjaśnienia mecha-



nizmu powstawania zaburzeń metabolicznych i funkcjonalnych mózgu, występujących w umiarkowanym niedotlenieniu pomimo braku oznak zaburzonej homeostazy energetycznej.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na samcach szczurów rasy Wistar o masie ciała 200—250 gramów.

##### *Model niedotlenienia*

Niedotlenienie wywoływano umieszczając szczury w komorze hermetycznej, przez którą przepuszczano mieszaninę gazową zawierającą 7% O<sub>2</sub> w N<sub>2</sub>. W większości doświadczeń niedotlenienie trwało 2 godz. Ciepłotę ciała szczurów utrzymywano na stałym poziomie równym kontroli przez nagrzewanie komory lampą lub poduszką elektryczną. W czasie niedotlenienia określano charakterystyczne zmienne krwi tętniczej: pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, pH, poziom glukozy, pirogronianu i mleczanu oraz wartość ciśnienia tętniczego (tab. 1).

*Tabela 1. Parametry krwi tętniczej charakteryzujące stopień niedotlenienia szczurów*  
*Table 1. Arterial blood parameters in mild hypoxia*

	paO <sub>2</sub> mmHg	paCO <sub>2</sub>	pH	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mmol/l	Stosunek mleczan pirogronian Lactate Pyruvate ratio
Kontrola Control	88,0±3,54	39,9±0,90	7,39±0,04	24,0	7,9
Niedotlenienie Hypoxia	24,5±2,78	20,1±1,04	7,71±0,03	16,5	21,4

##### *Materiał doświadczalny*

Mózg do badań pobierano w różnych czasach trwania niedotlenienia i do 24 godzin po niedotlenieniu. Zwierzęta dekapitowano, przy czym w części doświadczeń głowy zamrażano w ciekłym azocie. Dalszy podział, ważenie i ekstrakcję przeprowadzano według typowych metod preparatywnych. Materiał doświadczalny stanowiły skrawki tkankowe, homogenaty oraz subfrakcje komórkowe.

Badania podstawowej przemiany glukozy przeprowadzano zarówno *in*



*vivo* jak i *in vitro*, głównie za pomocą znakowanych  $^{14}\text{C}$  i  $^3\text{H}$  izotopów glukozy. Pomiar szybkości pojawiania się znacznika w produktach końcowych przemiany glukozy służył do oceny szybkości jej metabolizmu w badanych układach doświadczalnych.

Sposób ekstrakcji i analizy badanych związków w mózgu oparto na rutynowych metodach opisanych w licznych pracach:

a) Lipidy ekstrahowano według metody Folcha (1957) i oznaczano ilościowo gangliozydy i cerebrozydy wg metody Svennerholma (1957) oraz fosfolipidy według metody Bartletta i wsp. (1959). Szczegółową analizę składu przeprowadzano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej.

b) Frakcję kwasów tłuszczowych po saponifikacji ekstraktów lipidowych, izolowano według metody Kates'a (1972).

c) Kwasy nukleinowe ekstrahowano wg metody Glazera i Webera i oznaczano ilościowo według metody Logana i wsp. (1969).

d) Białka ekstrahowano również w oparciu o metodę opisaną przez Glazera i Webera (1971) i oznaczano metodą Lowry'ego (1964).

e) Stężenie związków pośrednich przemiany podstawowej glukozy, jak i metabolizmu energetycznego w mózgu oznaczano spektro- lub fluorometrycznie. Jedynie poziom cAMP oznaczano metodą radioizotopową.

Badania aktywności enzymów związanych z cyklem pentozowym przeprowadzano według typowych metod spektrofotometrycznych.

Badanie aktywności przemiany glukozy w cyklu pentozowym (C.P.)

a) *in vitro* — oznaczono poprzez porównanie aktywności dwutlenku węgla, powstającego w trakcie spalania glukozy znakowanej  $^{14}\text{C}$  na węglu 1 i 6 łańcucha cukrowca

b) *in vivo* — poprzez użycie swoistego inhibitora drugiej reakcji C.P. — dehydrogenazy kwasu 6-fosfoglukonowego (DH-6PGA) i pomiar szybkości akumulacji kwasu 6-fosfoglukonowego (6PGA) w mózgu szczurów w tych warunkach.

#### WYNIKI I Dyskusja

W prowadzonej serii badań wykazano, że wczesną reakcją metaboliczną mózgu na narastające niedotlenienie, wyprzedzającą załamanie się metabolizmu energetycznego, jest reorientacja przemiany glukozy w kierunku glikolizy z zahamowaniem C.P. oraz uogólnione ograniczenie syntez związków makromolekularnych. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* oraz danych z piśmiennictwa wydaje się, że lokalne zmiany stężenia jonów w środowisku, związane z pobudzeniem aktywności neuronów, stają się sygnałem zwiększającym zużycie energii w procesach transportu błonowego. Powoduje to kompensacyjne uaktywnienie metabolizmu energetycznego komórek. Jednocześnie ze wzrostem zapo-



trzebowania energetycznego, związanego z aktywacją energozależnych układów enzymatycznych transportu jonowego zostają ograniczone wewnątrzkomórkowe procesy syntezy, zużywające energię. Zahamowanie syntezy związków makromolekularnych obserwowano w badanym niedotlenieniu *in vivo*, jako inhibicję wbudowywania uniwersalnego substratu U-<sup>14</sup>C-glukozy do frakcji białek, lipidów i kwasów nukleinowych. Podobne zahamowanie wbudowywania znacznika <sup>14</sup>C-glukozy do związków makromolekularnych obserwowano również w modelu depolaryzacji skrawków mózgu *in vitro*. Może to wskazywać na wspólny mechanizm leżący u podstaw obserwowanego zjawiska.

Ograniczenie aktywności anabolicznej mózgu w umiarkowanym niedotlenieniu ma charakter uogólniony i zasadniczo odwracalny w krótkim czasie po przywróceniu prawidłowego utleniania. Jedyne wyjątkiem stanowi zaburzenie metabolizmu frakcji lipidowej, do której wbudowywanie węgla <sup>14</sup>C-glukozy w skrawkach kory mózgu pozostaje ograniczone do 24 godz. po przebyciu 2 godzinnym, umiarkowanym niedotlenieniu.

Na zahamowanie procesów anabolicznych, wykorzystujących energię do syntezy komórkowych, wskazywało również obniżenie szybkości zużycia rezerw związków wysokoenergetycznych ( $\Delta \sim P$ ) w mózgu szczurów dekapitowanych po przebyciu niedotlenienia. Mózg szczurów zużywa większość  $\sim P$  w pierwszej minucie skrajnych warunków niedokrwienych wywołanych dekapitacją. U zwierząt poddanych uprzednio niedotlenieniu szybkość tego procesu ulega wyraźnemu zwolnieniu z wartości  $\Delta \sim P$   $16,8 \pm 1,08$  mmol/kg/min do  $11,6 \pm 2,2$  mmol/kg/min. Wykazano również, że po niedotlenieniu poziom cyklicznego AMP w mózgu szczurów nie zmienia się po dekapitacji. Stanowi to wyraźną różnicę z reakcją szczurów kontrolnych, u których obserwowano znamienne wzrost stężenia tego metabolitu w 30 s po dekapitacji.

Z wyników własnych badań oraz danych z piśmiennictwa wynika, że akumulacja cAMP w mózgu pod wpływem dekapitacji zależna jest od pobudzenia  $\beta$ -receptorów adrenergicznych. Obniżenie ich wrażliwości w umiarkowanym niedotlenieniu znosi poniedokrwieną akumulację cAMP w mózgu szczura.

Stymulacja glikolizy i zahamowanie syntezy związków makromolekularnych w umiarkowanym niedotlenieniu łączy się ze znacznym ograniczeniem aktywności utleniania glukozy w C.P. Wykazano, że po podaniu 6-aminoamidu kwasu nikotynowego (6-AN), przyrost substratu zahamowanej drugiej reakcji C.P. — DH-6PGA, jest skorelowany z aktywnością utleniania glukozy w tym szlaku jej przemiany w mózgu *in vivo*.

Opierając się na wynikach otrzymanych za pomocą zastosowanej metody oznaczono, że przemiana pentozowa zużywa 0,4 mmol/kg/godz. czyli około 1,5% całej spalanej przez mózg glukozy w korze mózgu i 0,8 mmola/



/kg/godz., czyli około 30% metabolizowanej glukozy w pniu mózgu. W czasie umiarkowanego niedotlenienia aktywność C.P. spada do około 30% wartości kontrolnych. Natomiast po przerwaniu niedotlenienia szybkość akumulacji 6PGA w półkulach mózgu szczura wzrasta dwukrotnie w stosunku do kontroli. Stymulacja ta jest przejściowa i zanika po 3 godzinach od zakończenia niedotlenienia.

Stymulację przemiany pentozowej glukozy po niedotlenieniu wykazano również w serii badań prowadzonych na skrawkach kory mózgu *in vitro*, poprzez porównanie włączania znacznika  $^{14}\text{C}$ -glukozy znakowanej na różnych węglach łańcucha do frakcji kwasów tłuszczowych i dwutlenku węgla. Oznaczano również aktywności związanych z C.P. enzymów — DH-G6P i DH-6PGA, które wzrastały znamienne zarówno w trakcie, jak i po niedotlenieniu.

W badaniach nad regulacją przemiany glukozy w C.P. przeprowadzanych *in vitro*, wykazano, że szybkość obrotu aktywnego wodoru w układzie oksydoredukcyjnym  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ , wpływa bezpośrednio na intensywność przemiany glukozy w C.P. w tkance, natomiast aktywność kluczowych enzymów ma drugorzędne znaczenie regulacyjne.

Wykazane zmiany aktywności C.P. w czasie trwania niedotlenienia i po jego ustąpieniu, wskazują na zmianę zaopatrzenia tkanki w NADPH i pentozy — dwa podstawowe produkty związane z tą drogą przemiany glukozy. To ścisłe powiązanie metaboliczne może stanowić przyczynę równoległości zahamowania procesów syntez makromolekularnych i obniżenia aktywności C.P. w umiarkowanym niedotlenieniu. Natomiast za stymulację przemiany pentozowej glukozy po przebytych niedotlenieniu może być odpowiedzialny proces odwrotny tzn. zwiększenie zużycia NADPH i pentoz, związane bądź z okresową stymulacją syntez komórkowych, bądź też z pobudzeniem reakcji zwiększających potencjał antyoksydacyjny tkanki, a szczególnie zapobiegających utlenianiu wolnorodnikowemu lipidów mózgu.

W związku z opisaną reorientacją przemiany podstawowej glukozy w mózgu szczurów w niedotlenieniu, oznaczono dynamikę jej transportu przez barierę krew-mózg. Szybkość transportu glukozy z krwi do mózgu w normoksji wynosiła, zgodnie z większością danych piśmiennictwa, 0,44 mmola/kg/min. W umiarkowanym niedotlenieniu transport glukozy do mózgu ulegał przyspieszeniu do 0,73 mmola/kg/min. Za przyspieszenie transportu glukozy w niedotlenieniu odpowiedzialny jest prawdopodobnie wzrost różnicy stężeń tego substratu pomiędzy krwią a mózgiem.

Wykazano, że przestrzeń pozakomórkowa wraz z glem o funkcji transportującej glukozę (astroglej), wzrasta w niedotlenieniu, zajmując 56%, podczas gdy w warunkach kontrolnych zajmuje jedynie 32% ogół-



nej masy tkanki. Stwarza to dodatkową przyczynę utrudnienia dyfuzji substratów do komórek OUN.

W ostatnich latach pogląd na stabilność strukturalną i metaboliczną błon komórkowych uległ zasadniczej zmianie. Istnieje coraz więcej dowodów, że liczne jej składniki wykazują znaczną dynamikę przemian biochemicznych, których zakłócenia powodują zasadniczą zmianę reagowania błony jako całości. W przedstawionych badaniach wykazano, że frakcja lipidowa, główny składnik struktur błonowych komórki, jest (w porównaniu z innymi frakcjami związków makromolekularnych) szczególnie wrażliwa na niedotlenienie. Poza znamienym spadkiem stężenia fosfolipidów i gangliozydów w mózgu szczurów niedotlenionych, obserwowano obniżenie wbudowywania węgla  $U-^{14}C$ -glukozy do frakcji lipidowej, utrzymujące się do 24 godz. po zakończeniu niedotlenienia. Najgłębsze zaburzenia po niedotlenieniu wykazywała frakcja fosfolipidów kwaśnych, w której przewagę stanowią glicerofosfolipidy inozytolowe. Również wbudowywanie glukozy w czasie trwania niedotlenienia obniżało się wyraźnie w tej właśnie frakcji lipidowej. Obniżenie syntezy fosfolipidów kwaśnych wydaje się charakterystyczne dla umiarkowanego niedotlenienia i nie zostało stwierdzone w stanach głębokiej hipoksji oraz ischemii. Obserwowane obniżenie stężenia gangliozydów w mózgu o 25% w stosunku do kontroli było również typowe dla przewlekłego, umiarkowanego niedotlenienia.

Z piśmiennictwa i prac własnych wiadomo, że zarówno glicerofosfolipidy inozytolowe jak i gangliozydy, stanowią związki o szczególnej aktywności i znaczeniu dla receptorowej funkcji błon komórkowych. Zaburzenie tej funkcji w stosunku do  $\beta$ -receptorów adrenergicznych, odpowiedzialnych za akumulację cAMP u szczurów po dekapitacji, obserwowano w badanym modelu niedotlenienia. Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, że szczególna wrażliwość komponentu lipidowego błon komórkowych na zmiany środowiska towarzyszące niedotlenieniu (kwasica mleczanowa, aktywacja fosfolipaz, neuraminidazy, peroksydacja lipidów oraz obniżenie potencjału antyoksydacyjnego tkanki związane z zahamowaniem C.P.) może stać się podłożem zaburzeń prawidłowej czynności błony. Zachodzące procesy destrukcyjne są pogłębione uogólnionym obniżeniem aktywności anabolicznej mózgu towarzyszącej niedotlenieniu.

#### WNIOSKI

1. W umiarkowanym niedotlenieniu, w którym nie dochodzi do spadku poziomu związków wysokoenergetycznych w mózgu, przyczyną występujących zaburzeń są uszkodzenia komponentu lipidowego błon cytoplazmatycznych z wtórnym upośledzeniem ich funkcji receptorowej.



2. Do istotnych czynników przyczynowych uszkodzenia błon cytoplazmatycznych w umiarkowanym niedotlenieniu należy zaliczyć:

a) wczesne wystąpienie kwasicy metabolicznej, pogłębione wzrostem transportu glukozy z krwi do mózgu,

b) uogólnione ograniczenie syntez związków makromolekularnych w czasie trwania niedotlenienia, a w przypadku frakcji lipidowej również w okresie 24 godz. po ustąpieniu hipoksji,

c) zahamowanie przemiany glukozy w cyklu pentozowym, a tym samym obniżenie potencjału antyoksydacyjnego tkanki.

Piśmiennictwo u autorki.

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



SPIS PRAC OPUBLIKOWANYCH  
W „NEUROPATOLOGII POLSKIEJ”  
W ROKU 1985 — TOM 23

Dydyk Lubomira, Elżbieta Medyńska, Olgierd Puciłowski: Identyfikacja pęcherzyków dopaminergicznych w obrazach mikroskopowo-elektronowych zbitej warstwy istoty czarnej szczura . . . . .	145
Dymecki Jerzy, Danuta Markiewicz, Maciej Półtorak, Olgierd Puciłowski, Wojciech Kostowski, Andrzej Bidziński: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. I. Comparative evaluation of two models of Parkinson's disease induced by unilateral stereotaxic lesion of the substantia nigra with electrocoagulation and with 6-hydroxydopamine . . . . .	167
Dymecki Jerzy, Maciej Półtorak, Olgierd Puciłowski, Danuta Markiewicz, Wojciech Kostowski: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. II. Results of histopathological and histofluorescence studies . . . . .	181
Dymecki Jerzy, Olgierd Puciłowski, Wanda Dyr, Danuta Markiewicz, Maciej Półtorak, Wojciech Kostowski, Mirosława Hauptmann, Barbara Lipińska: Effects of intracerebral transplantation of immature substantia nigra in rats with experimentally induced Parkinson's disease. III. Results of behavioural and biochemical investigations . . . . .	287
Gajkowska Barbara: Reakcja jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza królika na przegrzanie i oziębienie organizmu . . . . .	353
Gajkowska Barbara: Kompleks Golgiego w stymulowanych neuronach sekrecyjnych podwzgórza szczura . . . . .	445
Gajkowska Barbara, Andrzej Loesch, Ryszard Pluta: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei . . . . .	55
Gajkowska Barbara, Anna Zareba-Kowalska: The effect of lithium on cultured nervous tissue . . . . .	315
Gajkowska Barbara, Teresa E. Bugera, Mieczysław Śmiałek: Ultrastruktura mieliny ośrodkowego układu nerwowego szczura po zatruciu octanem kobaltawym . . . . .	545
Gadamski Roman, Roman Lasocki: Zmiany morfologiczne oraz aktywność fosfatazy kwaśnej i pirofosfatazy tiaminowej w jądrach tworzących siatkowatego i jądrach neurosekrecyjnych podwzgórza u królików poddanych działaniu podwyższonej temperatury otoczenia . . . . .	83
Grochowicz Paweł M.: Allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego . . . . .	455
Iwanowski Lech: Ultrastruktura of brain capillaries in young rabbits treated with cyclophosphamide . . . . .	557
Iwanowski Lech, Zofia Czechowska, Marek Sielczak: Analysis of neuropathological changes in the central nervous system of 51 patients who died	



from proliferative hematological diseases . . . . .	531
Kapuściński Andrzej, Mirosław J. Mossakowski: Próby farmakologicznego przeciwdziałania rozwojowi zmian niedokrwiennych w mózgu królików po jego całkowitym niedokrwieniu . . . . .	97
Kida Elżbieta, Krystyna Renkawek, Mieczysław Śmiałek: Rozległe uszkodzenie struktur pnia mózgu w przypadku ostrej postaci choroby Wilsona . . . . .	433
Klimowicz-Młodzik Izabela, Włodzimierz Pisarski, Małgorzata Sasinowska, Mieczysław Śmiałek: Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) i kwasu homowanilinowego (HVA) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z padaczką . . . . .	419
Kosicka Barbara, Teresa E. Bugera, Marek Kittel, Mieczysław Śmiałek: Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) oraz aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w mózgu szczura z zespołem pozapiramidowym po ostrym zatruciu chlorkiem manganawym . . . . .	191
Kosicka Barbara, Marek Kittel, Mieczysław Śmiałek: Wpływ zatrucia chlorkiem manganawym w okresie ciąży i laktacji u szczurów na poziom i syntezę kwasu gamma-aminomasłowego GABA w mózgu . . . . .	201
Kraszpułski Michał, Teresa Wrzółkowa, Piotr Mierzewski: Blood-brain exchange in the cat amygdaloid body. Morphometric studies . . . . .	255
Kroh Halina: Multifocal neoplasms of the nervous system induced with ethylnitrosourea in Wistar rats . . . . .	389
Liberski Paweł P., Wielisław Papierz, Janusz Alwasiak: Brain fine structure in Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and tangles. I. Neuritic plaques . . . . .	507
Liberski Paweł P., Janusz Alwasiak, Wielisław Papierz: Brain fine structure in Creutzfeldt-Jakob disease with plaques and tangles. II. Neurofibrillary tangles composed of paired helical filaments . . . . .	521
Loesch Andrzej, Barbara Gajkowska, Ryszard Pluta: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons . . . . .	71
Łukaszuk Irena: Capillary blood vessels of the brain. III. Terminal vessel ultrastructure in the nuclei of the cat amygdaloid body. Morphometric studies . . . . .	265
Matyja Ewa, Elżbieta Kida, Teresa Piórek: Przypadek rakowatości opon miękkich mózgu . . . . .	49
Mossakowski Mirosław J., Jerzy W. Borowicz: Early electron-microscopic changes in hepatogenic encephalopathy induced by thioacetamide intoxication in rats . . . . .	375
Mossakowski Mirosław J., Roman Gądamski: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia sektora CA <sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich . . . . .	493
Muranyi Małgorzata: Powiązania czynnościowe między układem neurohormonalnym a immunologicznym . . . . .	1
Orendáčová Judita, Mikuláš Chavko, Anna Ferčáková, Darina Kluchová, Martin Bona, Jozef Maršala: The fine structure of granular endoplasmic reticulum in neurons and <sup>14</sup> C-leucine incorporation into proteins in spinal ganglia of dog after ischemia . . . . .	465
Pluta Ryszard: Wpływ prostocykliny na zmiany podstawowych parametrów fizjologicznych w całkowitym niedokrwieniu mózgowia . . . . .	475
Rafałowska Urszula, Zbigniew Dąbrowiecki, Anna Pastuszko, Maria Rosnowska: Effect of chronic lithium administration of neurotransmitter metabolism in synaptosomes from rat brain . . . . .	211
Rafałowska Urszula, Anna Pastuszko: Karboksymetylacja białek i jej rola	



w regulacji procesów neurosekrecji . . . . .	273
Ryba Mirosław, Andrzej Kukwa, Wiktor Janczewski: Cardiovascular response to greater petrosal nerve section as method of prevention of experimental cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage . . . . .	247
Szczech Józef, Antoni Godlewski: Effect of BCNU given to pregnant female rats on neuroglia morphology and histochemistry in the progeny . . . . .	565
Szumańska Grażyna, Mirosław J. Mossakowski: Aktywność cykazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganawym . . . . .	297
Szymaś Janusz: Diagnostic value of demonstrating glial fibrillary acidic protein in human astrocytomas . . . . .	23
Szymaś Janusz: Ocena znaczenia diagnostycznego kwaśnego białka włókienek glejowych w wyściółczakach . . . . .	37
Szymaś Janusz, Andrzej Wajgt: Myelin-associated glycoprotein (MAG) in oligodendrogliomas — an immunohistochemical study . . . . .	239
Taraszevska Anna, Irmina B. Zelman: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy . . . . .	219
Wajgt Andrzej, Mirosław Górny, Janusz Szymaś: Izolacja i immunogenność głównej glikoproteiny mieliny (MAG) mózgu ludzkiego . . . . .	229
Weinrauder Halina: Lokalizacja syntetazy glutaminowej w astrocytach in vitro	411
Wender Mieczysław, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Żórawski: Effect of fatty acid-enriched diet on the composition of fatty acids in lipids of cerebral myelin during development . . . . .	119
Wender Mieczysław, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Goncerzewicz: Influence of unappropriate diet during development on the susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis . . . . .	129
Zaręba-Kowalska Anna, Jerzy W. Borowicz: The effect of hyperthermia on the ultrastructure of the gigantocellular reticular region in the rabbit . . . . .	335
Zelman Irmina B., Jan Sawicki: Zmiany morfologiczne w układzie wzrokowym królika laboratoryjnego w następstwie wrodzonego jednostronnego małowocza . . . . .	585



## INDEKS NAZWISK AUTORÓW

- Adamczewska-Gonczewicz Z. 119, 129  
 Alwasiak J. 507, 521  
 Bidziński A. 167  
 Bona M. 465  
 Borowicz J. W. 335, 375  
 Bugera T. E. 191, 545  
 Chavko M. 465  
 Czechowska Z. 531  
 Dąbrowiecki Z. 211  
 Dydak L. 145  
 Dymecki J. 167, 181, 287  
 Dyr W. 287  
 Ferčáková A. 465  
 Gadamski R. 83  
 Gajkowska B. 55, 71, 315, 353, 445, 545  
 Godlewski A. 565  
 Gonczewicz A. 129  
 Górny M. 229  
 Grochowicz P. 455  
 Hauptmann M. 287  
 Iwanowski L. 531, 557  
 Janczewski W. 247  
 Kapuściński A. 97  
 Kida E. 49, 433  
 Kittel M. 191, 201  
 Klimowicz-Młodzik I. 419  
 Kluchová D. 465  
 Kosicka B. 191, 201  
 Kostowski W. 167, 181, 287  
 Kraszpulski M. 255  
 Kroh H. 389  
 Kukwa 247  
 Lasocki R. 83  
 Liberski P. P. 507, 521  
 Lipińska B. 287  
 Loesch A. 55, 71  
 Łukaszyk I. 265  
 Markiewicz D. 167, 181, 287  
 Matyja E. 49  
 Maršala J. 465  
 Medyńska E. 145  
 Mierzewski P. 255  
 Mossakowski M. J. 97, 297, 375, 493  
 Muranyi M. 1  
 Orendáčova J. 465  
 Papierz W. 507, 521  
 Pastuszko A. 211, 273  
 Piórek T. 49  
 Pisarski W. 419  
 Pluta R. 55, 71, 475  
 Póltorak M. 167, 181, 287  
 Puciłowski O. 145, 167, 181, 287  
 Rafałowska U. 211, 273  
 Renkawek K. 433  
 Rosnowska M. 211  
 Ryba M. 247  
 Sasinowska M. 419  
 Sawicki J. 585  
 Sielczak M. 531  
 Szczech J. 565  
 Szumańska G. 297  
 Szymaś J. 23, 37, 229, 239  
 Śmiałek M. 191, 201, 419, 433, 545  
 Taraszewska A. 219  
 Wajgt A. 229, 299  
 Weinrauder H. 411  
 Wender M. 119, 129  
 Wrzołkowa T. 255  
 Zaręba-Kowalska A. 315, 335  
 Zelman I. B. 219, 585  
 Zórawski A. 119



кислотой на состав липидов миелина мозга у крыс питаемых диетой с различным содержанием жирных кислот . . . . .	43
Евгения Тарновска-Дзидушко: Морфологическая картина мозжечка в ходе хронического алкоголизма . . . . .	57
Ирена Борковска, Данута Есёнок, Януш Сольски, Барбара Вуйцичка: Уровень катехоламин в мозге кролика „pt” . . . . .	69
Петр П. Либерски: Деренирующие невриты в экспериментальной scrapie . . . . .	79
Дариуш Ададек, Станислав Жулиховски, Юзеф Калужа: Случай долголетней жизни с аплазией мозжечка и дегенеративными изменениями в ЦНС. Случай болезни . . . . .	89
Павел П. Либерски, Веслав Папеж, Алина Шульц-Куберска: Болезнь моторного нейрона в ходе рака лёгких . . . . .	101
Мечислав Вендер, Анджей Гонцезевич: Морфометрические исследования развивающегося зрительного нерва крысы Вистар . . . . .	109
Крыстина Доманьска: Расстройства метаболизма глюкоза при энергетически уравновешенной гипоксии мозга крысы (резюме докторской диссертации) . . . . .	125

### CONTENTS

Krystyna Renkawek: Experimental model of Parkinson's disease induced by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) . . . . .	1
Ilija Victorov, Natalia Shashkova, Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Mirosław J. Mossakowski: Maturation of dopaminergic neurons in dissociated cultures of mouse substantia nigra . . . . .	9
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek: Effect of serum and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease on the ultrastructural properties of rat striatum <i>in vitro</i> . . . . .	17
Jerzy Dymecki, Maciej Pótorak, Danuta Markiewicz, Mirosława Hauptmann, Wojciech Dzieziak, Wojciech Kostowski: Effects of intracerebral transplantation of the adrenal medulla in rats with experimental Parkinson's disease . . . . .	29
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Gonczewicz, Janina Stanisławska, Barbara Knitter, Danuta Talkowska, Jadwiga Pankrac: Influence of cyanide intoxication on the composition of myelin lipids in rats fed during development on a diet containing various amounts of lipids . . . . .	43
Eugenia Tarnowska-Dziduszko: Pathomorphology of cerebellum in the course of chronic alcoholism . . . . .	57
Irena Borkowska, Danuta Jesionek, Janusz Solski, Barbara Wójcicka: Catecholamines levels in pt rabbit brain . . . . .	69
Paweł P. Liberski: Degenerative neurites in experimental scrapie . . . . .	79
Dariusz Adamek, Stanisław Żulichowski, Józef Kałuża: Long survival with cerebellar aplasia and degenerative changes of CNS. A case report . . . . .	89
Paweł P. Liberski, Wielisław Papierz, Janina Szulc-Kuberska: Motor neuron disease associated with cancer . . . . .	101
Mieczysław Wender, Andrzej Gonczewicz: Morphometric studies of the developing optic nerve in Wistar rats . . . . .	109
Krystyna Domańska-Janik: Disturbances of glucose metabolism in energy-balanced hypoxia of the rat brain . . . . .	125



## SPIS TREŚCI

Krystyna Renkawek: Doświadczalny model choroby Parkinsona wywołany N-metylo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP) . . . . .	1
Ilija Victorov, Natalia Shashkova, Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Mirosław J. Mossakowski: Dojrzewanie dopaminergicznych neuronów istoty czarnej w hodowli tkankowej typu zdysocjowanego . . . . .	9
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek: Wpływ surowicy i płynu mózgowo-rdzeniowego od pacjentów z chorobą Parkinsona na obraz ultrastrukturalny prądkowia <i>in vitro</i> . . . . .	17
Jerzy Dymecki, Maciej Półtorak, Danuta Markiewicz, Mirosława Hauptmann, Wojciech Dziedziak, Wojciech Kostowski: Efekty domózgowych przeszczerpów istoty rdzennej nadnerczy u szczurów z doświadczalną chorobą Parkinsona . . . . .	29
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Gonczewicz, Janina Stanisławska, Barbara Knitter, Danuta Talkowska, Jadwiga Pankrac: Wpływ zatrucia cyjanowodorem na obraz lipidów mieliny mózgu szczurów żywnych w okresie rozwoju dietą z różną zawartością kwasów tłuszczowych . . . . .	43
Eugenia Tarnowska-Dziduszko: Obraz morfologiczny mózdzku w przebiegu przewlekłego alkoholizmu . . . . .	57
Irena Borkowska, Danuta Jesionek, Janusz Solski, Barbara Wójcicka: Poziom amin katecholowych w mózgu królika pt . . . . .	69
Paweł P. Liberski: Wyrodniejące neuryty w doświadczalnej scrapie . . . . .	79
Dariusz Adamek, Stanisław Zulichowski, Józef Kałuża: Przypadek długoletniego przeżycia z aplazją mózdzku i zmianami zwyrodnieniowymi w OUN . . . . .	89
Paweł P. Liberski, Wielisław Papierz, Janina Szulc-Kuberska: Choroba neuronu ruchowego współlistniająca z rakiem płuc . . . . .	101
Mieczysław Wender, Andrzej Gonczewicz: Badania morfometryczne rozwijającego się nerwu wzrokowego szczura Wistar . . . . .	109
Krystyna Domańska-Janik: Zaburzenia metabolizmu glukozy w energetycznie wyównanym niedotlenieniu mózgu szczura. Streszczenie pracy habilitacyjnej . . . . .	125

## СОДЕРЖАНИЕ

Крыстина Ренкавек: Экспериментальная модель болезни Паркинсона, вызванной метоло-4-фенило-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МРТР) . . . . .	1
Илья Викторов, Наталия Шашкова, Эльжбета Киды, Крыстина Ренкавек: Рост дофаминергических нейронов чёрного вещества в диссоциированной тканевой культуре . . . . .	9
Эльжбета Киды, Крыстина Ренкавек: Влияние сыворотки и спинномозговой жидкости от пациентов с болезнью Паркинсона на ультраструктурную картину striatum <i>in vitro</i> . . . . .	17
Ежи Дымецки, Мацей Пулторак, Данута Маркевич, Мирослава Хауптман, Войцех Дзедзяк, Войцех Костовски: Эффекты внутримозговых трансплантатов вещества надпочечника у крыс с экспериментальной болезнью Паркинсона . . . . .	29
Мечислав Вендер, Зоя Адамчевска-Гонцеевич, Янина Станиславска, Барбара Книттер, Данута Тальковска, Ядвига Панкрац: Влияние интоксикации цианистой . . . . .	