

0022

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 24

1986

ZESZYT 2

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM

1986

ZESZYT 2

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo von Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), Istvan Környey (Pécs), Jochen Quandt (Berenburg-Saale), Franz Seitelberger (Wiedeń), Istvan Tariska (Budapeszt)

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

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

ADRES REDAKCJI

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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1986.
Nakład: 570 egz. Objętość: ark. wyd. 11,60, ark. druk. 9,88, ark. A₁-12.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70×100. Oddano do składowania 1986.03.17.
Podpisano do druku 1986.09.2. Druk ukończono we wrześniu 1986.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 1136/86. J-4. Cena zł 150.—

MARIA DĄBSKA, KRYSZYNA WIŚNIEWSKA, PIOTR KOZŁOWSKI,
JOANNA SHER

NEUROPATOLOGIA
ZESPOŁU NABYTEJ NIETYDOLNOŚCI IMMUNOLOGICZNEJ

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa

Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Nowy Jork
Kings County Hospital Center, Nowy Jork

Zespół nabytej niewydolności immunologicznej znany jest ogólnie pod angielską nazwą AIDS (acquired immune deficiency syndrome), ponieważ został po raz pierwszy opisany w Stanach Zjednoczonych Ameryki i na Haiti na przełomie lat 1978/1979. Dotąd w USA rozpoznano najwięcej przypadków tego ciężkiego schorzenia (Centers for Disease Control 1982; Pape i wsp. 1983; Centers for Disease Control 47, 1984).

Istotą AIDS jest gwałtowny spadek odporności u poprzednio zdrowych osób, wyrażający się limfopenią i zaburzeniami w obrębie podgrup komórek T, które najczęściej bywają określane jako zmniejszenie liczby komórek pomocniczych w stosunku do komórek supresyjnych (Valdiserri 1985). Dokładniej sprecyzowano ten defekt immunologiczny jako obniżenie liczby komórek T_4 przy nadczynności komórek B. Obniżone są też odczyny skórne na różne antygeny oraz zwiększony poziom immunoglobulin IgG i IgA. Ponadto często obserwuje się *in vitro* obniżoną odpowiedź limfocytów na mitogeny i antygeny, zmniejszoną odpowiedź cytotoksyczną, zaburzoną funkcję monocytów oraz podwyższony poziom kompleksów immunologicznych w surowicy. Inne ewentualnie współistniejące nieprawidłowości immunologiczne nie są istotne dla rozpoznania tego zespołu (Seligman i wsp. 1984).

Zespół nabytej niewydolności immunologicznej napotymano początkowo jedynie wśród określonych grup społecznych, które nazwano grupami wysokiego ryzyka. Byli to homoseksualiści, narkomani stosujący dożylnie środki narkotyzujące oraz Haitańczycy. Dalsze obserwacje doprowadziły do wykrycia AIDS u kobiet, partnerek seksualnych chorych z tym zespołem, u osobników obu płci w środowiskach heteroseksualnej prostytucji w Afryce, a w końcu wśród ludzi, którzy otrzymywali

przetoczenia krwi lub jej składników (Harris i wsp. 1983; Perre i wsp. 1984). Szczególnie zagrożonymi okazali się chorzy na hemofilię, którzy przyjmują koncentraty czynnika VIII, otrzymywanego z surowicy pochodzącej od licznych krwiodawców (Essex i wsp. 1984; Seligman i wsp. 1984). Dotychczas udowodniono przekazywanie zespołu AIDS przez kontakty seksualne, używanie zakażonych igieł do zastrzyków oraz przez przetoczenia krwi lub jej składników (Centers for Disease Control 47, 1984). Ostatnio pojawiły się przypadki AIDS u dzieci matek chorych na tę chorobę, a tylko u części z nich dokonywano przetoczeń krwi lub jej składników przed wystąpieniem objawów niewydolności immunologicznej. Całokształt obrazu klinicznego wskazuje na przejście czynnika wywołującego AIDS drogą transłożyskową lub w okresie okołoporodowym. Na początku schorzenia uderza u tych dzieci zahamowanie ogólnego rozwoju, dalszy przebieg i objawy podobne są do obserwowanych u dorosłych, jedynie limfopenia jest mniej częsta w zespole typowych zaburzeń immunologicznych (Cowan i wsp. 1984; Scott i wsp. 1984).

Badania nad epidemiologią AIDS doprowadziły do coraz powszechniejszego przekonania, że jest to choroba wywołana zakażeniem, najprawdopodobniej przez wirus (Ioachim 1984). W toku badań pierwszoplanowym kandydatem do roli czynnika wywoławczego w AIDS okazał się wirus białaczki ludzkiej z komórek T-typ III (HTLV-III retrovirus = human T-cell leukemia virus). Wirus ten został określony w Instytucie Pasteura jako LAV—IDAV (lymphadenopathy associated virus — immunodeficiency associated virus). Tenże wirus został wyhodowany z limfocytów, węzłów chłonnych, nasienia, śliny i łez osób chorych na AIDS oraz osób należących do grup wysokiego ryzyka (Quinn 1985). Ostatnio wykryto jego obecność również w mózgach kilku chorych na AIDS, którzy wykazywali objawy zajęcia układu nerwowego przez proces chorobowy (Shaw i wsp. 1985). Przeciwciała przeciw wirusowi HTLV-III występują u ponad 90% chorych na AIDS i u mniej niż 1% ludzi zdrowych. Badania epidemiologiczne wskazują jednak, że zakażenie tym wirusem może przebiegać bezobjawowo, a także może wywołać przemijające zaburzenia immunologiczne lub przewlekłą adenopatię. U części chorych z limfadenopatią (jak się wydaje u 5—15%) rozwijają się po pewnym czasie objawy nabytej niewydolności immunologicznej (Quinn 1985). Mimo że wszystkie wyniki badań przemawiają za tym, że retrowirus HTLV-III jest poszukiwanym czynnikiem etiologicznym, AIDS pozostaje schorzeniem, którego etiopatogeneza pozostaje nie znana. Skutecznego leczenia brak (Landesmann i wsp. 1985). Do ostatecznego rozwiązania problemu brak spełnienia postulatów Kocha; przesądziłoby to o roli etiologicznej HTLV-III/LAV. Intensywne badania zmierzające do uzyskania szczepionki, skutecznego leku przeciwwirusowego oraz zwierzęcego modelu choroby są kontynuowane po-

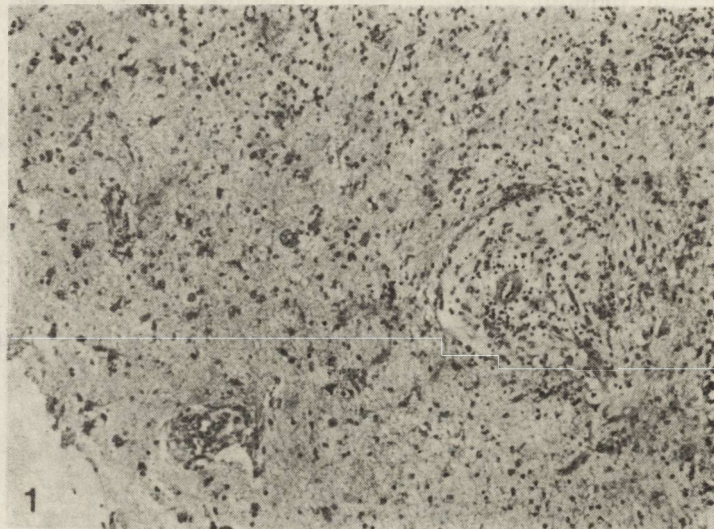
mimo nikłych szans na spełnienie tych postulatów (Merigan 1984). Zespół zaburzeń immunologicznych wywołany u małp przez retrowirus białaczki zwierzęcej różni się znacznie od AIDS u ludzi (Ioachim 1984; Seligman 1984).

Klinicznie AIDS powoduje u dotkniętych nim chorych wysoką zapadalność na różne infekcje, które charakteryzuje ciężki przebieg, podczas gdy wiele z nich u ludzi o prawidłowej odporności przebiega jako bezobjawowe lub banalne zakażenia. Infekcje następują kolejno jedne po drugich, często współlistnieje kilka równocześnie i prowadzą w ostatecznym wyniku przeważnie do śmierci chorego (Vieira i wsp. 1983). Oprócz infekcji w przebiegu tego zespołu występują niektóre choroby nowotworowe. Należy do nich przede wszystkim mięsak Kaposiego, który u chorych na AIDS obejmuje zwykle liczne narządy, ale tylko u części z nich staje się bezpośrednią przyczyną zgonu oraz chłoniaki (Pape i wsp. 1983; Guarda i wsp. 1984).

Znaczny procent chorych na AIDS cierpi na powikłania ze strony układu nerwowego. Koppel i wsp. (1985) napotkali takie powikłania u 28 spośród 121 chorych na AIDS, a u dalszych 8 były one podejrzane. Snider i wsp. (1983) zbadali 50 pacjentów, u których wystąpiły kliniczne objawy tego rodzaju powikłań. U większości z nich rozpoznano następstwa różnego typu zakażeń, u kilku zmiany nowotworowe z grupy chłoniaków. Ponadto napotkano kilka przypadków powikłań naczyniopochodnych lub trudnych do zakwalifikowania objawów ogniskowych, a także neuropatię obwodową. W innych ośrodkach obserwowano zmiany, które określano jako otępienne (Shaw i wsp. 1985).

Przegląd ten wskazuje, że zakażenia oportunistyczne są cechą charakterystyczną AIDS. Przyczyną powikłań neurologicznych w przebiegu AIDS jest najczęściej rozszerzenie się tych zakażeń na oun. Wśród nich na pierwszy plan wysuwa się zakażenie pierwotniakiem *Toxoplasma Gondii*. Wydaje się, że chorzy na AIDS mają szczególną skłonność do rozwijania zapalenia mózgu spowodowanego tym pasożytem (Luft i wsp. 1984; Farkash i wsp. 1985). Występujące w jego przebiegu objawy kliniczne, takie jak zaburzenia świadomości, drgawki, uszkodzenia nerwów czaszkowych, nie są charakterystyczne. Badania serologiczne wykazują zwykle podwyższone miana przeciwciał (Farkash i wsp. 1985), ale w części przypadków są one niecharakterystyczne. Stosunkowo najczęściej odnotowywano patognomicznie dodatni wynik testu Sabina—Feldmana (Luft i wsp. 1984). Szczególnie pomocnym w rozpoznawaniu toksoplazmozy ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu AIDS okazało się tomograficzne badanie komputerowe mózgu, które ujawnia w tych przypadkach pojedyncze lub mnogie, pierścieniowate lub okrągławe, ogniska (Post i wsp. 1983). Neuropatologicznie odpowiadają one zwykle raczej rozległym ogniskom martwicy. Mikroskopowo wokół ognisk widoczny

jest przerost astrogleju i liczne grudki mikrogleju rozsiane w ośrodkowym układzie nerwowym. Odczynny te kontrastują z niewielkimi okołonacyniowymi i oponowymi naciekami limfocytarno-plazmatycznymi (ryc. 1). Wprawdzie w poszczególnych przypadkach nasilenie nacieków jest zmienne, ale zasadniczo są one skąpe, często minimalne (Luft i wsp. 1984; Dąbska i wsp. 1986; Farkash i wsp. 1985).

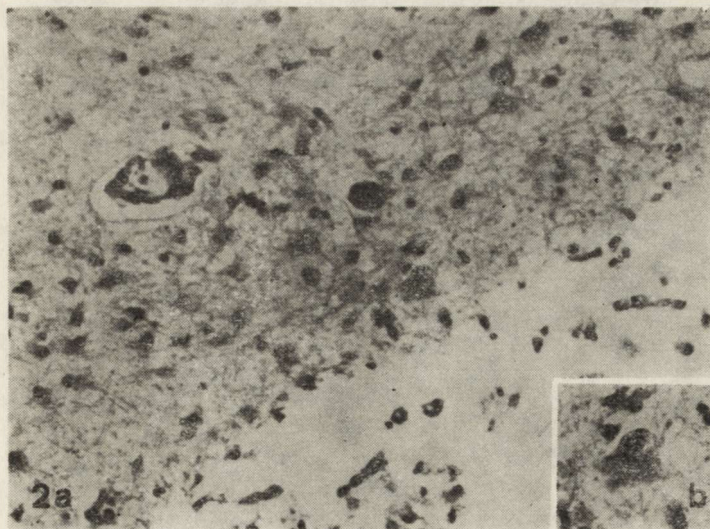


Ryc. 1. Toksoplazmoza w przebiegu AIDS. Obrzeże ogniska martwicy z przerostem gleju i prawie zupełnym brakiem nacieków okołonacyniowych. H—E. Pow. 16,5 ×

Fig. 1. The border of focal necrosis in a case of toxoplasmosis in the course of AIDS. Proliferation of glial cells and nearly total lack of perivascular infiltration. H—E. × 16.5

Szczególnie często w przebiegu AIDS występują zakażenia wirusowe, zwłaszcza z grupy wirusów opryszczki. Uogólnioną infekcją wirusem cytomegalii (CMV) znaleziono w 100% w badanej grupie chorych na AIDS, a wirusem Epsteina—Barra w 97% przypadków tej grupy (Quinann i wsp. 1984). Wiąże się z tym występowanie, wprawdzie jak dotąd niezbyt licznych, zapaleń mózgu spowodowanych przez CMV. W ich przebiegu obserwuje się skłonność do zmian martwiczych, podobną do spotykanej w tym zespole u noworodków, „noworodkowa” jest również okołokomorowa lokalizacja zmian (ryc. 2 i 2a). Okołonacyniowe nacieki zapalne są z reguły skąpe, podobnie do stwierdzanych w innych zakażeniach w przebiegu AIDS (Hawley i wsp. 1983; Dąbska i wsp. 1986).

Poza tym należy odnotować inne rzadko spotykane schorzenie — postępującą wielogniskową leukoencefalopatię (PWL), w przebiegu której stwierdza się w mózgu obecność wirionów wirusów z grupy papowa.



Ryc. 2. Cytomegalia w przebiegu AIDS. 2a. Okołoskomorowe umiejscowienie komórek wtrętowych, naczynie bez nacieku. H—E. Pow. 16,5 \times . 2b. Komórka z wtrętem w większym powiększeniu. H—E. Pow. 40 \times

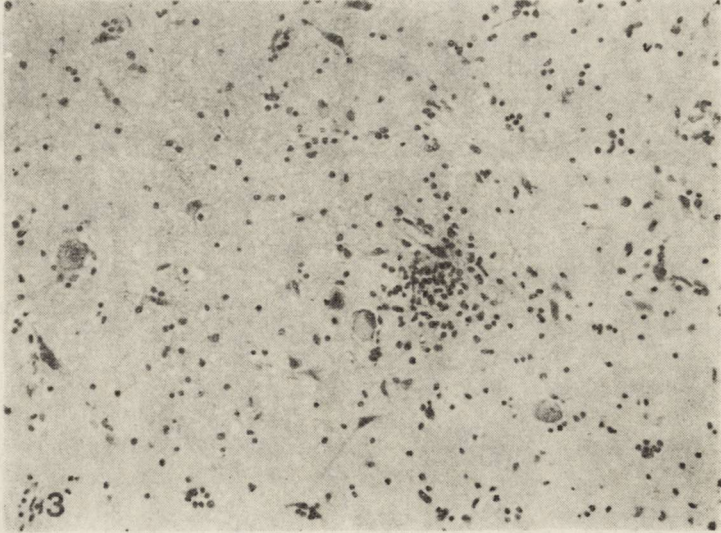
Fig. 2. CMV infection. 2a. Periventricular localization of cells with inclusions. Blood vessel without infiltration. H—E. \times 16.5. 2b. Higher magnification of a cell with inclusions. H—E. \times 40

Zgodnie ze znaną skłonnością do występowania PVL w przypadkach z obniżoną odpornością immunologiczną jest ona coraz częściej spotykany z zespołem w przebiegu AIDS (Berdi i wsp. 1983).

Omawiając zakażenia wirusowe ośrodkowego układu nerwowego u chorych na AIDS należy wspomnieć o często opisywanych rozsianych woun licznych guzkach mikroglejowych, którym nie towarzyszą inne morfologicznie uchwytne zmiany chorobowe w tkance nerwowej (ryc. 3). Przyczyna występowania tych guzków nie jest jasna, można myśleć o odpowiedzi tkanki nerwowej na przygodne zakażenia najprawdopodobniej wirusowe, powstaje też pytanie, czy nie są one wywołane przez zakażenie wirusem wywołującym schorzenie podstawowe?

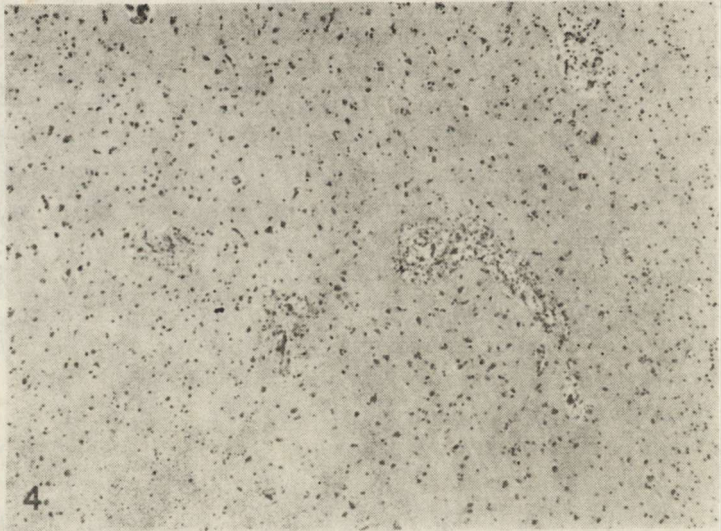
Trzecią grupę infekcji, którą należy wymienić, są zakażenia grzybicze ośrodkowego układu nerwowego. Najczęstszą i najlepiej udokumentowaną jest *Cryptococcosis cerebro-meningealis* (ryc. 4). Grzyb ten, znany z powinowactwa do układu nerwowego, powoduje szczególnie często w przebiegu AIDS masywne zakażenia (Snider i wsp. 1983; Koppel i wsp. 1985), znane jako bezodczynowe w przeciwieństwie do przypadków o prawidłowej odporności, w których zwykle rozwijają się w oponach nacieki limfo-plazmocytarne.

Opisane typy zakażeń w przebiegu nabytej niewydolności immunologicznej nie wyczerpują wszystkich możliwych ich rodzajów, są jednak niewątpliwie najczęściej spotykanymi. Zdecydowanie rzadziej znajduje



Ryc. 3. Grudka mikroglejowa w pniu mózgu. H—E. Pow. 16,5 ×

Fig. 3. Microglial nodule in the brain stem. H—E. × 16.5



Ryc. 4. Kryptokokoza w przebiegu AIDS. Okołonaczyniowe skupienia kryptokoków. H—E. Pow. 16,5 ×

Fig. 4. *Cryptococcosis cerebri* in the course of AIDS. Perivascular accumulation of fungi. H—E. × 16.5

się wzmianki o uogólnionych zakażeniach bakteryjnych, zwłaszcza przy bakteriami Gram-dodatnich. W ośrodkowym układzie nerwowym opisano dotychczas kilkanaście przypadków zakażenia *Mycobacterium avium intracellulare*, cztery przypadki gruźlicy, po jednym kiły, *Nocardia* i *Mycobacterium kansasii* (Koppel i wsp. 1985). Nasuwa się przypuszczenie, że zjawisko to może być związane z udziałem granulocytów obojętnochłonnych, których dysfunkcja w odpowiedzi obronnej organizmu nie należy do zespołu AIDS.

Skłonność chorych na AIDS do niektórych schorzeń nowotworowych w odniesieniu do układu nerwowego wyraża się przede wszystkim występowaniem w nim pojedynczych chłoniaków. Pierwotne chłoniaki o un są schorzeniem rzadkim, natomiast zespoły zaburzeń immunologicznych, np. we wrodzonej niewydolności immunologicznej, u chorych z przeszczepami nerek bądź po leczeniu choroby Hodgkina, a także w AIDS zwiększają ryzyko wystąpienia chłoniaków. Większość chłoniaków spotykanych w un w przebiegu AIDS histopatologicznie odpowiada *lymphoblastoma* (Case Records 1983). U chorych na AIDS cierpiących na uogólnione chłoniaki również często dochodzi do objęcia układu nerwowego procesem nowotworowym (Snider i wsp. 1983). Istnieją również doniesienia o występowaniu w ośrodkowym układzie nerwowym mięsaka Kaposiego oraz o dwóch przypadkach mięsaka i szpiczaka mnogiego (Koppel i wsp. 1985).

Wśród neurologicznych powikłań w przebiegu AIDS stosunkowo często sygnalizowano objawy określane jako otępienne, uważane za wyraz encefalopatii, do której powstania mają być podatni chorzy z tym zespołem. Koppel i wsp. (1985) przypuszczają, że zakażenie wirusowe może być przyczyną zmian określonych przez nich jako podostra encefalopatia. Shaw i wsp. (1985) zbadali neuropatologicznie 15 chorych, którzy zmarli z takim rozpoznaniem, nie znaleźli jednak jakiegoś określonego, powtarzającego się typu zmian, które można by uczynić odpowiedzialnymi za objawy otępienne. W przebadanym materiale napotkali oni zarówno mózgi normalne, jak i wykazujące cechy uogólnionego zaniku, niektóre z toksoplazmozą lub z zapaleniem mózgu wywołanym przez CMV, inne zawierały jako jedyną zmianę rozsiane grudki mikroglejowe. W mózgach, które opracowano neuropatologicznie, przeprowadzono również poszukiwania prawdopodobnego czynnika wywołującego zespół niewydolności immunologicznej, czyli wirusa HTLV-III. Jego obecność ustalono na podstawie wykrycia tzw. „proviral DNA” w pięciu przypadkach (Shaw i wsp. 1985). Stwierdzenie wirusa HTLV-III w zbadanych mózgach wydaje się interesujące wobec wykrycia jego bliskiego morfologicznego i genetycznego podobieństwa z wirusem Visna, należącego do tzw. wirusów powolnych i powodującego u owiec przewlekłą chorobę o un charakteryzującą się ogniskowymi naciekami i demielinizacją (Gonda i wsp. 1985). Immu-

nolodzy wysuwają podejrzenie, że wirus HTLV-III może powodować bliżej jeszcze nie sprecyzowane zmiany w tkance nerwowej leżące u podłoża objawów otępiennych (Shaw i wsp. 1985). Sugestie te wymagają jednak dalszych dokładniejszych badań, zwłaszcza wobec wspomnianego wyżej braku określonych zmian morfologicznych u chorych na AIDS z objawami demencji. Nie można również pominąć faktu, że ciężkie schorzenie, jakim jest AIDS, prowadzi pod koniec życia do ogólnego, często daleko posuniętego wyniszczenia, które może przyczynić się do obniżenia sprawności psychicznej chorych.

Ostatnio opublikowano przypadek AIDS (Goldstick i wsp. 1985), w którym zaobserwowano nowy zespół neuropatologiczny, polegający na zwyrodnieniu dróg piramidowych i sznurów tylnych w rdzeniu. Patomechanizm tych zmian w przebiegu AIDS nie jest jasny.

Powyższa krótka charakterystyka zespołu nabytej niewydolności immunologicznej, w przebiegu której często występują również ciężkie zmiany w układzie nerwowym, ukazuje zagrożenie, jakie to schorzenie ze sobą niesie. Coraz to nowe przypadki AIDS opisywane są we wszystkich częściach świata. Do końca 1984 r. opisano w Europie 559 przypadków AIDS (Centers for Disease Control 2, 1985b), ponad 7000 przypadków w USA, ponad 500 w pozostałych krajach Ameryki, kilka tysięcy w Afryce (Quinn 1985). W USA, gdzie liczba przypadków jest największa, prowadzone są szczególnie intensywne badania nad AIDS. Ustalono, że inkubacja schorzenia trwa od 6 miesięcy do ponad 4 lat. Na podstawie wykrycia w grupach dużego ryzyka znacznej liczby osób, które mają przeciwciała przeciwko wirusowi HTLV-III, niektórzy epidemiolodzy spodziewają się, że liczba przypadków AIDS w przeciągu najbliższych 2 lat zwiększy się o dalszych 40 000 osób (Quinn 1985). Inni oceniając, że co najmniej 400 000 obywateli USA wykazuje obecność HTLV-III, mówią o dziesiątkach tysięcy, które prawdopodobnie zachorują na AIDS (Landesman i wsp. 1985). Ostatnio obliczono, że liczba chorych podwaja się w ciągu 10 miesięcy, więc liczba przypadków pełnoobjawowego AIDS osiągnie w USA 65 000 w czasie najbliższych 2 lat. Przebieg schorzenia jest, jak dotąd, niepomysłny, 80% chorych zmarło w ciągu 2 lat od chwili jego rozpoznania (Quinn 1985).

Na obecnym etapie walki z AIDS ważne jest znalezienie bezobjawowych nosicieli, którzy mogą szczególnie przyczyniać się do jej rozszerzania. Przede wszystkim duże znaczenie ma eliminacja tych osobników spośród ewentualnych krwiodawców, dlatego coraz powszechniej stosuje się u kandydatów na krwiodawców oznaczanie przeciwciał przeciw wirusowi HTLV-III.

Uderzająco szybki postęp badań nad tym wciąż jeszcze nowym schorzeniem pozwala mieć nadzieję na uzyskanie wkrótce odpowiedzi na istniejące dotąd pytania i opanowanie szerzącego się zagrożenia.

НЕВРОПАТОЛОГИЯ СИНДРОМА AIDS

Резюме

В работе дается обзор сведений, касающихся природы синдрома AIDS и изменений, возникающих в ходе болезни в центральной нервной системе.

Ослабление иммунитета вызывает проникновение инфекции также и в центральную нервную систему, где особенно часто выступают токсоплазмоз, криптококкоз и вирусные инфекции, в особенности, возбуждаемые вирусом цитомегалии. Характерным признаком этих инфекций в морфологическом плане является немногочисленность околососудистых инфильтратов. Кроме воспалительных процессов, частым осложнением AIDS бывают некоторые злокачественные заболевания. В нервной системе чаще всего наблюдаются лимфомы, первичные или метастатические.

NEUROPATHOLOGY
OF ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME

Summary

The paper is a review of the present knowledge on the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and on changes in the central nervous system developing in the course of AIDS. The decreased immunity predispose to infections which affect also the nervous system. Among CNS infections the most common are toxoplasmosis, cryptococcosis and viral infections, particularly due to cytomegalovirus. Morphologically striking finding in these infections is poor perivascular inflammatory reaction. Besides, AIDS is often complicated by some neoplasms. Primary or metastatic lymphomas develop most frequently in the nervous system.

PIŚMIENNICTWO

1. Berdi J., Weinstein W., DeGregorio P., Verity A. M.: Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome. *New Eng. J. Med.*, 1983, 25, 492—493.
2. Case Records of the Massachusetts General Hospital. *New Eng. J. Med.*, 1983, 309, 359—369.
3. Centers for Diseases Control. Epidemiological aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *New Eng. J. Med.* 1982, 306, 248.
4. Centers for Diseases Control. Antibodies to a retrovirus etiologically associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in populations with increased incidence of the syndrome. *MMWR*, 1984, 33, 27, 608—609.
5. Centers for Diseases Control. Update: Acquired immunodeficiency syndrome — Europe. *MMWR*, 1985, 34, 2, 1106—1110.
6. Cowan M. J., Hellmann D., Chudwin D., Wara D. W., Chang R. S., Ammann A. J.: Maternal transmission of acquired immune deficiency syndrome. *Pediatrics*, 1984, 73, 382—386.
7. Dąbwska M., Sher J., Kozłowski P., Wiśniewski K.: Neuropathological involvement in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). A collection of 58 cases. *Clin. Neuropath.*, 1986, (w druku).
8. Essex M., McLane M. F., Lee T. H., Tachibana N., Mullins J. I., Kreiss J., Kasper C. K., Poon M.-C., Landay A., Stein S. F., Francis D. P., Cabradilla

- C., Lawrence D. N., Evatt B. L.: Antibodies to human T-cell leukemia virus membrane antigens (HTLV-III) in hemophiliacs. *Science*, 1983, 221, 1061—1064.
9. Farkash A. E., Maccabee P. J., Sher H. J., Landesman S. H., Hotson Gwendolyn: CNS toxoplasmosis in acquired immune deficiency syndrome: A clinical-pathological-radiologic review of 12 cases. 36th Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Boston, Massachusetts, April 1984.
 10. Goldstick L., Mandybur T. I., Bode R.: Spinal cord degeneration in AIDS. *Neurology*, 1985, 35, 103—106.
 11. Gonda M. A., Wong-Staal F., Gallo R. C., Clements J. E., Naryan O., Gilden R. V.: Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and Visna virus, a pathologic lentivirus. *Science*, 1985, 227, 173—177.
 12. Guarda L. A., Luna M. A., Smith J. L., Mansell P. W. A., Gyorkey F., Roca A. N.: Acquired immune deficiency syndrome: Post mortem findings. *Am. J. Clin. Path.*, 1984, 81, 549—557.
 13. Harris C., Small C. B., Klein R. S., Friedland G. H., Moll B., Emeson E. E., Spigland I., Steigbigel N. H.: Immunodeficiency in female sexual partners of men with acquired immunodeficiency syndrome. *New Eng. J. Med.*, 1983, 308, 1181—1184.
 14. Hawley D. A., Schaefer J. F., Schulz D. M., Muller J.: Cytomegalovirus encephalitis in acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Clin. Path.*, 1983, 80, 874—877.
 15. Ioachim H. L.: Acquired immune deficiency disease after three years the unsolved riddle. *Lab Invest.*, 1984, 54, 1—6.
 16. Koppel B. S., Wormser G. P., Tuchman A. J., Maayan S., Hewlett D. Jr., Daras M.: Central nervous system involvement in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neurol. Scand.*, 1985, 71, 337—353.
 17. Landesman S. H.: Ginzburg H. M., Weiss S. H.: The AIDS epidemic. *New Eng. J. Med.*, 1985, 21, 521—524.
 18. Luft B. J., Brooks R. G., Conley F. K., McCabe R. E., Remington J. S.: Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 1984, 252, 913—917.
 19. Merigan T. C.: What are we going to do about AIDS and HTLV-III/LAV infection? *New Eng. J. Med.*, 1984, 311, 1311—1312.
 20. Pape J. W., Liautaud B., Thomas F., Mathurin J. R., St. Amand M. M. A., Bony M., Pean V., Pamphile M., Laroche A. C., Johnson W. D. Jr.: Characteristics of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Haiti. *New Eng. J. Med.*, 1984, 309, 945—950.
 21. Perre P., Lepage P., Kestelyn P., Hekker A. C., Rouvroy D., Bogaerts J., Kayihigi J., Butzler J. P., Clumeck N.: Acquired immunodeficiency syndrome in Rwanda. *Lancet*, 1984, July 14, 61—64.
 22. Post M. J. D., Chan J. C., Hensley G. T., Hoffman T. A., Moskowitz L. B., Lippmann S.: Toxoplasma encephalitis in Haitian adults with acquired immunodeficiency syndrome: a clinical-pathologic-CT correlation. *Am. J. Radiol.*, 1983, 140, 861—868.
 23. Quinn T. C.: Perspectives on the future of AIDS. *JAMA* 1985, 253, 247—248.
 24. Quinnan G. V., Jr., Masur H., Rook A. H., Armstrong G., Frederick W. R., Epstein J., Manischewitz J. F., Macher A. M., Jackson L., Ames J., Smith H. A., Parker M., Pearson G. R., Parrillo J., Mitchell C., Straus S. E.: Herpesvirus infections in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 1984, 252, 72—77.

25. Scott G. B., Buck B. E., Leterman J. G., Bloom F. L., Parks W. P.: Acquired immunodeficiency syndrome in infants. *New Eng. J. Med.*, 1984, 310, 76—80.
26. Seligmann M., Chees L., Fahey J. L., Fauci A. S., Lachmann P. J., L'Age-Stein J., Ngu J., Pinching A. J., Rosen F. S., Spira T. J., Wybran J.: AIDS — an immunologic reevaluation. *New Eng. J. Med.*, 1984, 311, 1286—1287.
27. Shaw G. M., Harper M. E., Hahn B. H., Epstein L. G., Gajdusek D. C., Price R. W., Navia B. A., Petit C. K., O'Hara C. J., Groopman J. E., Eun-Sook Cho, Oleske J. M., Wong-Staal F., Gallo R. C.: HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science*, 1985, 227, 177—181.
28. Snider W. D., Simpson D. M., Nielsen S., Gold J. W. M., Metroka C. E., Posner J. B.: Neurological complications of acquired immune deficiency syndrome: analysis of 50 patients. *Ann. Neurol.*, 1983, 14, 403—418.
29. Valdiserri R. O.: Retrovirus and AIDS. *Med.*, 1985, 16, 101—104.
30. Vieira J., Frank E., Spira T. J., Landesman S. H.: Acquired immune deficiency in Haitians. *New Eng. J. Med.*, 1983, 308, 125—129.

Adres autora: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-993 Warszawa

ELŻBIETA KIDA

ULTRASTRUCTURAL PROPERTIES OF RAT SUBSTANTIA NIGRA IN ORGANOTYPIC CULTURE

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

Ultrastructural studies of the rat substantia nigra initiated by Bak in 1967 were continued by other investigators in various species, also in the process of development (Rinvik, Grofova 1970; Gulley, Wood 1971; Hajdu et al. 1973; Tennyson et al. 1973; Schwyn, Fox 1974; Phelps, Adinolfi 1982; Domesick et al. 1983). These studies have provided informative data on the cell and synaptic organization.

Substantia nigra (SN) representing a target structure in Parkinson's disease was also a subject of interest in tissue culture. The studies, performed on organotypic and dissociated-type of SN culture were mainly focused on dopaminergic properties of neurons, but not on their ultrastructure (Coyle et al. 1973; Prochiantz et al. 1979; Hemmedinger et al. 1981; Whetsell et al. 1981; Berger et al. 1982; Mytilineou et al. 1983).

The aim of the present study was to describe ultrastructural characteristics of neurons and synaptic contacts in an organotypic culture of rat substantia nigra which could serve as model for further investigations.

MATERIAL AND METHODS

SN was dissected under sterile conditions from the rostral midbrain of 16—17—day-old Wistar rat embryos, placed in a pool of culture medium and cut into small pieces. Small slices (about 1—2 mm²) of SN were placed on collagen-coated coverslips and kept at 36.5°C in a Maximov chamber double coverslip assembly or in a Carrel flask. The cultures were grown in a medium composed of 30% human serum, 60% Earle's balanced salt solution, 10% chick embryo extract supplemented with 600 mg% glucose and 100 U/ml penicillin. The cultures were fed twice weekly.

During the entire period of 21 days the cultures were observed in

a light microscope. On the 7, 14, 21th day *in vitro* (DIV) the cultures were processed for electron microscopy. Each culture was removed from the Maximov chamber or Carrel flask, washed in balanced salt solution and placed in 1.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer pH 7.2 at 4°C for 1/2 hour. Afterwards, the cultures were rinsed for 1 hour with the same buffer and postfixed in 2% osmium tetroxide at 4°C for one hour. Then, the cultures were detached from their coverslips by means of a razor blade, dehydrated in graded alcohols and propylene oxide and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEM 10B electron microscope.

RESULTS

The cultures of the substantia nigra after 7 DIV consisted of a cell population of immature or poorly differentiated neurons. Neurons with slightly oval nucleus containing uniformly dispersed chromatin sometimes forming a darker, thin rim beneath the nuclear envelope could be seen (Fig. 1). In the cell cytoplasm many free ribosomes were pre-

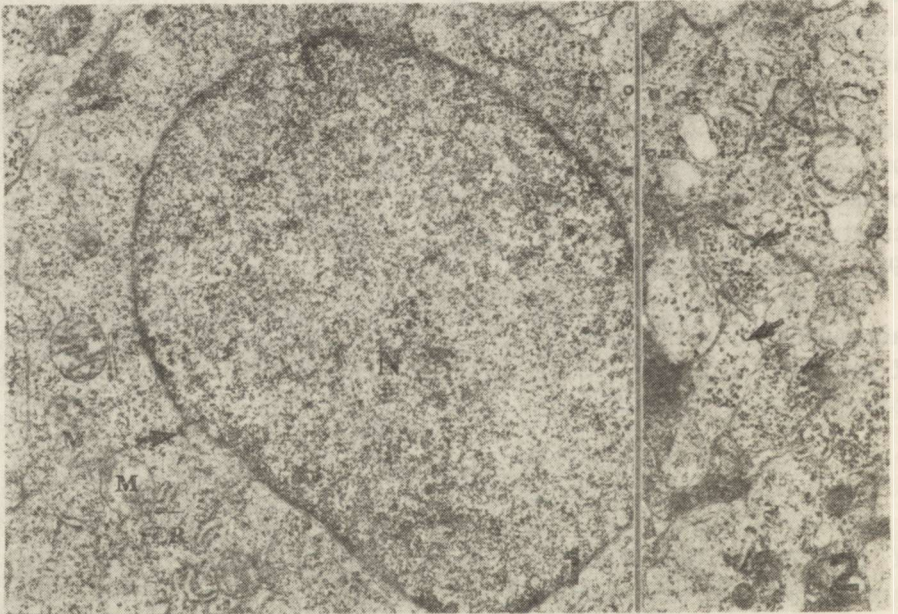


Fig. 1. Immature neuron with oval nucleus (N), short channels of granular endoplasmic reticulum (rER), large mitochondria (M) and single dense core vesicles (arrows) in the cell cytoplasm. Seven DIV. $\times 4800$

Ryc. 1. Nisko zróżnicowana komórka nerwowa zawierająca owalne jądro (N), krótkie kanały siateczki ziarnistej (rER), duże mitochondria (M) oraz pojedyncze pęcherzyki typu „dense core” (strzałki) w cytoplazmie. Siedem DIV. Pow. 4800 \times

Fig. 2. Glycogen particles in neuronal and glial cell processes (arrows). Seven DIV. $\times 4800$

Ryc. 2. Glikogen w wypustkach neuronalnych i glejowych (strzałki). Siedem DIV. Pow. 4800 \times

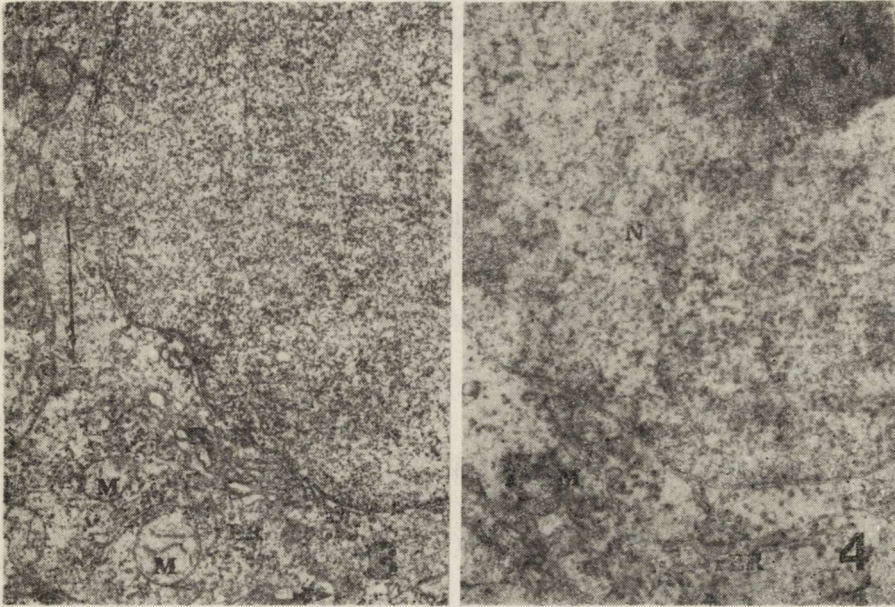


Fig. 3. Neuron with round nucleus containing well developed Golgi apparatus (G), large mitochondria (M), short channels of granular endoplasmic reticulum (eER), single dense core vesicles (long arrow) and short appendage of cellular cytoplasm (thick arrow). Seven DIV. $\times 4800$

Ryc. 3. Komórka nerwowa zawierająca okrągłe jądro, dobrze rozbudowany aparat Golgiego (G), duże mitochondria (M), krótkie kanały siateczki ziarnistej (rER), pojedyncze pęcherzyki typu „dense core” (długa strzałka) oraz płytke wypustki błony komórkowej (gruba strzałka). Siedem DIV. Pow. 4800 \times

Fig. 4. Neuron with round nucleus (N) with distinct nucleolus (Nc), electron lucent cell cytoplasm, longer channels of granular endoplasmic reticulum (rER) and mitochondria (M). Seven DIV. $\times 6000$

Ryc. 4. Komórka nerwowa mająca okrągłe jądro (N) z dużym jąderkiem (Nc), jasną cytoplazmą, dłuższe kanały siateczki ziarnistej (rER) i mitochondria (M). Siedem DIV. Pow. 6000 \times

sent. The cisternae of granular endoplasmic reticulum were sparse and randomly distributed. Mitochondria were large, Golgi apparatus was poorly developed. Many glycogen particles could be observed in the cell processes (Fig. 2). Some of the neurons contained round, excentrically located nuclei with flat infoldings of nuclear envelope and uniformly dispersed nucleochromatin (Fig. 3). The organelles were often accumulated in one pole of the cell body. Numerous polyribosomes filled the cytoplasm, but cisternae of the endoplasmic reticulum covered by ribosomes were scarce. Golgi apparatus in these cells consisted of flattened sacs, vacuoles and vesicles situated close to the nucleus. Large mitochondria accompanied the other organelles. Lysosomes were sporadically seen. Sometimes, in the cell cytoplasm single, large dense core vesicles were encountered. Short spine-like projections of the cell cytoplasm could be observed in these neurons. Some of the neurons were characterized by a lower density of cytoplasmic matrix, due to a smaller quantity of polyribosomes. The cisternae of granular endoplasmic

reticulum were somewhat longer, but still not numerous (Fig. 4). Golgi apparatus was often confined to a few vacuoles and short cisternae. Mitochondria were scanty, smaller, distributed uniformly around the nucleus. Neurons often appeared in small clusters separated by astroglial processes. Among the neuronal processes, very rarely, immature synaptic junctions could be observed. The axon terminals were filled with varied quantities of round, rather small vesicles. Sometimes, in the cell processes single, large, dense core vesicles were present. The axons were unmyelinated. Dendrites contained many tightly packed short arrays of microtubules, mitochondria, polyribosomes and vacuoles. Frequently, glycogen particles were present in the neuronal processes. Growth cones, containing fibrillar matrix, single mitochondria, vacuoles and glycogen particles were also seen. Some axon terminals exhibited degeneration and contained many unusually large, round vesicles in the dark matrix.

In the 14 DIV cultures two essential types of neurons could be differentiated. The cell bodies of the neurons were distinctly enlarged, the cellular organelles were much more conspicuous. The first type of neurons (Fig. 5) was characterized by an excentrically situated nucleus possessing distinct infoldings of the nuclear envelope. The chromatin

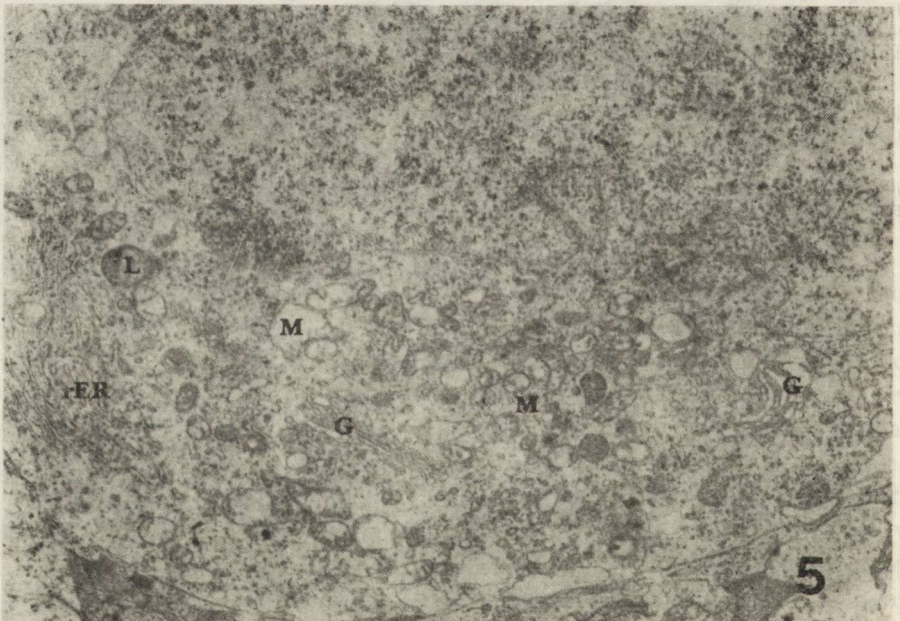


Fig. 5. Neuron with well developed Golgi apparatus (G), parallel arrays of cisternae of granular endoplasmic reticulum (rER), many mitochondria (M) and single lysosomes (L). Fourteen DIV. $\times 4800$

Ryc. 5. Komórka nerwowa zawierająca dobrze rozbudowany aparat Golgiego (G), równoległe układy kanałów siateczki ziarnistej (rER), liczne mitochondria (M) oraz pojedyncze lizosomy (L). Czternaście DIV. Pow. 4800 \times

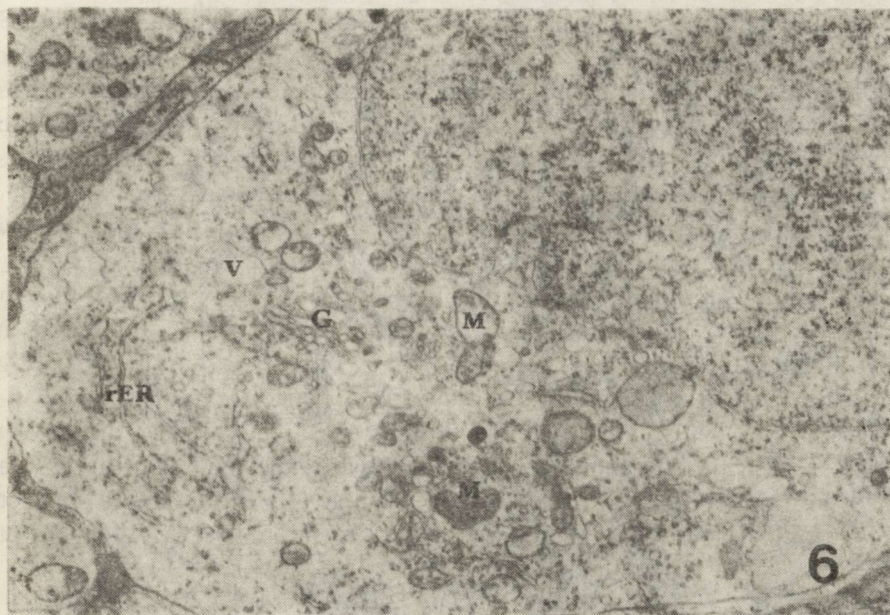


Fig. 6. Neuron with few, long channels of granular endoplasmic reticulum (rER), well developed Golgi apparatus (G), large vacuoles (v) and many mitochondria (M). Fourteen DIV. $\times 4800$

Ryc. 6. Komórka nerwowa zawierająca nieliczne, długie kanały siateczki ziarnistej (rER), dobrze rozwinięty aparat Golgiego (G), duże wakuole (v) oraz mitochondria (M). Czternaście DIV. Pow. 4800 \times

was uniformly dispersed in the nucleus, the nucleolus was large. Golgi apparatus was well developed forming few distinct groups of large cisternae, short channels and vacuoles. Adjacent to it, many large and small vesicles were seen. Some of them represented coated vesicles or dense core vesicles. The granular endoplasmic reticulum was organized in parallel arrays of long cisternae. Numerous polyribosomes, often in rosettes, were distributed between the cisternae and scattered free in the cell cytoplasm. The mitochondria, often accumulated in the region of the cell soma rich in other organelles, were of various size, the largest of them characterized by a light matrix and few cristae. Lysosomes were seen in greater number, frequently filled with granular or electron dense material. Multivesicular bodies with light or dark matrix were also present. Sporadically among the cisternae of granular endoplasmic reticulum parallel rows of electron dense laminar material were observed. Sometimes close to the cytoplasmic membrane axonal endings filled with round small vesicles were seen, but no synaptic contacts were noted.

The second type of neurons (*Fig. 6*) possessed also a nucleus eccentrically situated in the cell soma, containing invaginations of the nuclear envelope. Golgi apparatus was well developed comprising many

large and small vesicles, vacuoles, coated and dense core vesicles. Sometimes very large, distended cisternae of Golgi complex were seen. The granular endoplasmic reticulum was confined to randomly distributed channels, very rarely forming few parallel rows. Polyribosomes were not so numerous as in the first type of neurons. The cytoplasm had many electron lucent areas devoid of organelles.

Among the neuronal population, the second type of neurons was more often encountered in the cultures. Besides these two types of neurons, few smaller cells resembling the second type were also observed. In those cells the Golgi apparatus was poorly developed and the other cytoplasmic organelles appeared in smaller quantity. Glial cells could be often seen in perineuronal position. The neuronal processes in the 14 DIV cultures were numerous and well organized. Myelin sheath formation around the axons was rarely encountered. Dendrites contained along their shafts many parallelly arranged microtubules, single vacuoles, ribosomes, mitochondria and few glycogen par-

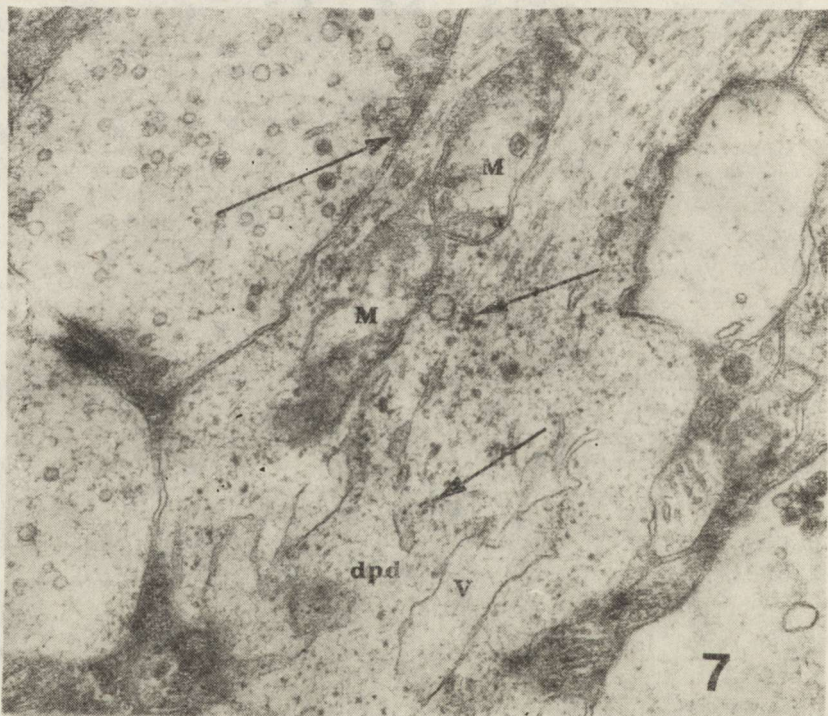


Fig. 7. Fragment of dendrite with many microtubules (mt), mitochondria (M), and glycogen particles (arrows). Large vacuoles (v) in distal part of dendrite (dpd). Axon terminal with few scattered vesicles and synaptic contact on the dendritic surface (long arrow). Fourteen DIV. $\times 9000$

Ryc. 7. Fragment wypustki dendrytycznej zawierającej liczne mikrotubule (mt), mitochondria (M) oraz ziarna glikogenu (strzałki). W części końcowej dendrytu (dpd) duże wakuole (v). Zakończenie aksonalne zawierające nieliczne pęcherzyki synaptyczne, widoczne połączenie synaptyczne na powierzchni dendrytu (długa strzałka). Czternaście DIV. Pow. 9000 \times

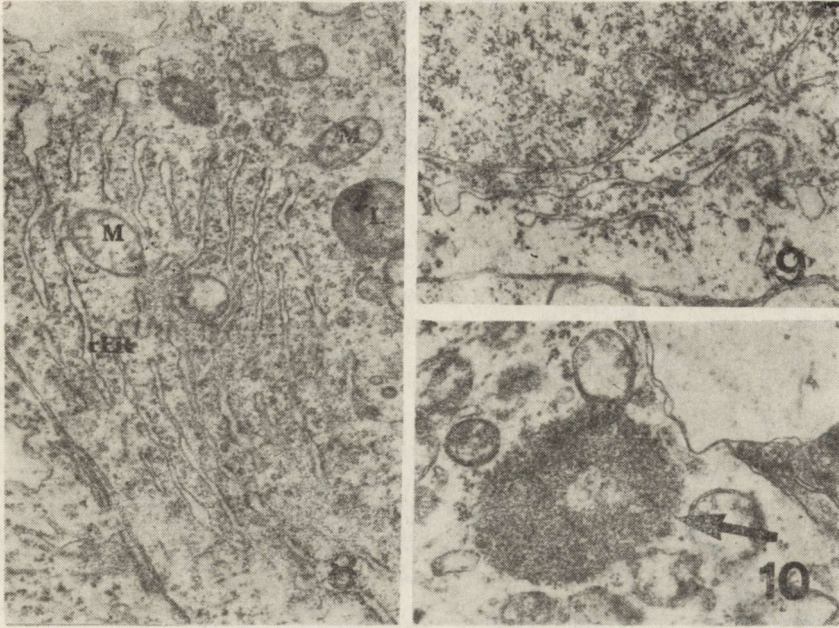


Fig. 8. Fragment of neuronal cytoplasm with abundant channels of granular endoplasmic reticulum (rER), mitochondria (M) and lysosome (L). First type of neurons. Twenty one DIV. $\times 6000$

Ryc. 8. Fragment cytoplazmy neuronu z licznymi kanałami siateczki ziarnistej (rER), mitochondriami (M) i lizosomem (L). Neuron typu I. Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 6000 \times

Fig. 9. Fragment of cytoplasm of II type of neurons with few channels of granular endoplasmic reticulum, one of them being in continuity with the nuclear envelope (arrow). Twenty one DIV. $\times 6000$

Ryc. 9. Fragment cytoplazmy neuronu typu II zawierającego nieliczne kanały siateczki ziarnistej, z których jeden stanowi przedłużenie otoczki jądrowej (strzałka). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 6000 \times

Fig. 10. Filamentous, electron dense inclusion in the neuronal cytoplasm (arrow). Twenty one DIV. $\times 12000$

Ryc. 10. Elektronowo gęsty, włókienkowy wtręt cytoplazmatyczny w komórce nerwowej (strzałka). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 12000 \times

ticles (Fig. 7). Dendritic distal swellings filled with filamentous material, vacuoles, mitochondria, glycogen particles were present. Some dendritic endings had thin filopodial or spine-like processes. On dendritic surfaces synaptic profiles, more numerous than in 7 DIV cultures were observed. Very rarely axo-somatic synapses contacted the membrane of the second type of neurons.

In the 21 DIV cultures, the neurons revealed the same characteristic as in 14 DIV cultures, however, a somewhat greater number of organelles and distinct enlargement of the cell bodies could be seen. The cisternae of granular endoplasmic reticulum formed prominent aggregations in the first type of neurons (Fig. 8), confined to only a few parallel arrays of cisternae in the second type of neurons (Fig. 9). The

cisternae of granular endoplasmic reticulum were sometimes in continuity with the nuclear envelope. In many neurons of both types, round, electron dense filamentous inclusions without limiting membrane, often with excavated centre could be observed (Fig. 10). They were sometimes, but not invariably, connected with granular endoplasmic reticulum and corresponded to what is called nematosomes (Le Beux 1972). From the abundant channels of Golgi apparatus frequently a process of vesicles formation could be traced (Fig. 11).

A notable difference consisted also in the better organization of the neuropil containing numerous, mature synaptic contacts of various types in the 21 DIV cultures. Among the synaptic junctions, the most commonly observed type in all cultures was an symmetrical, axo-dendritic synapse (Fig. 12). The presynaptic ending contained rather densely packed small round vesicles. Sometimes single large dense core vesicles were seen among them too, as well as single mitochondria. The synaptic cleft was wide. The presynaptic membrane revealed prominent thickening. These endings contacted usually small or preterminal dendrites (Fig. 13). Other types of synapses appeared in the cultures very rarely. Among them, an asymmetrical, axo-dendritic synapse could be seen containing in the presynaptic bouton round, but larger than

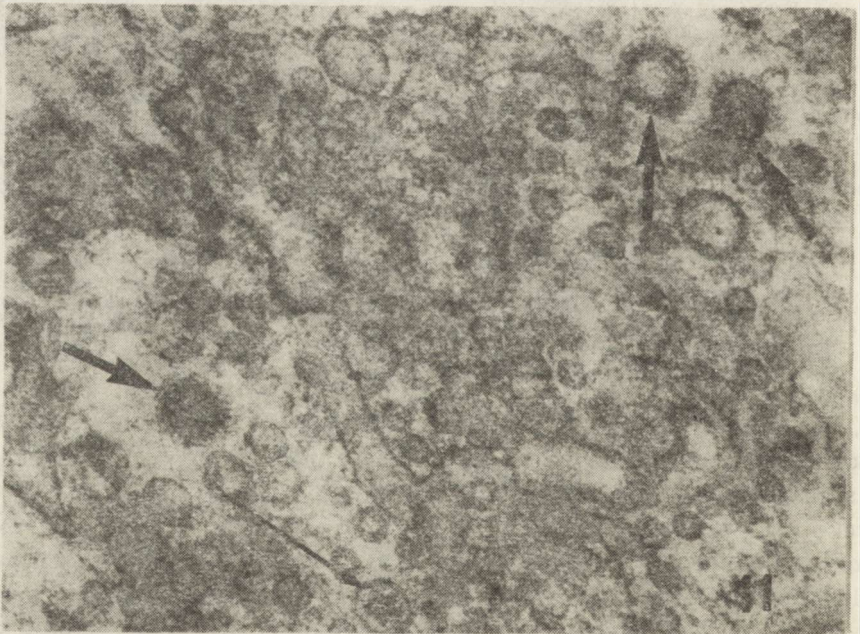


Fig. 11. Fragment of Golgi apparatus with process of vesicle formation. Some coated vesicles (arrows) and large dense core vesicles (long arrow) can be seen.
Twenty one DIV. $\times 24000$

Ryc. 11. Fragment aparatu Golgiego z odszczepiającymi się pęcherzykami. Widoczne pęcherzyki opłaszczone (strzałki) oraz pęcherzyki typu „dense core” (długa strzałka). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 24000 \times

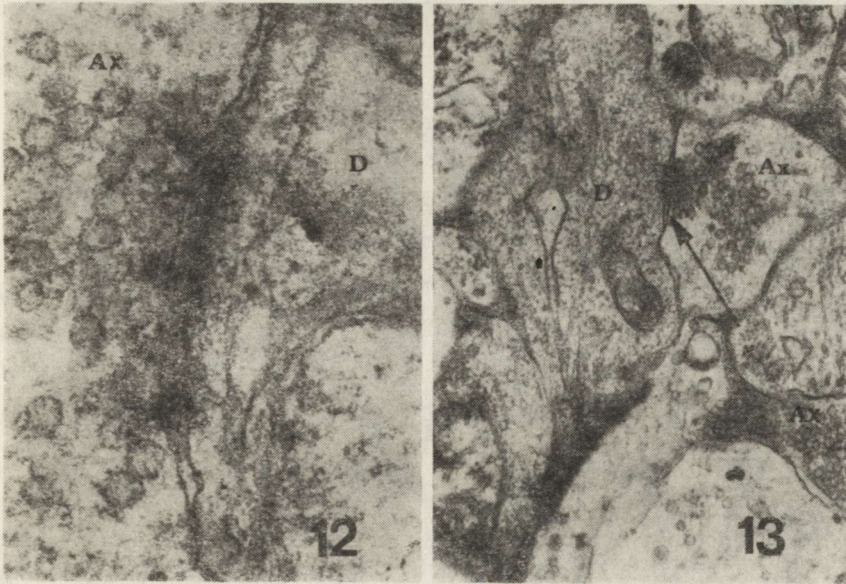


Fig. 12. An asymmetrical axo-dendritic synapse. Small, round vesicles in the presynaptic bouton (Ax). Wide synaptic cleft. Prominent thickening of the postsynaptic membrane belonging to a dendrite (D). Twenty one DIV. $\times 30000$

Ryc. 12. Asymetryczna synapsa akso-dendrytyczna. W zakończeniu przedsynaptycznym widoczne małe, okrągłe pęcherzyki (Ax). Szeroka szczelina synaptyczna, wyraźne zagęszczenie błony postsynaptycznej należącej do wypustki dendrytycznej (D). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 30000 \times

Fig. 13. Two axon terminals filled with small round vesicles (Ax). An asymmetrical, axo-dendritic synaptic junction (arrow). Twenty one DIV. $\times 6000$

Ryc. 13. Dwa zakończenia aksonalne wypełnione małymi, okrągłymi pęcherzykami (Ax). Widoczna asymetryczna synapsa aksonalno-dendrytyczna (strzałka). Dwadzieścia jeden. DIV. Pow. 6000 \times

in the previously described type, synaptic vesicles (Fig. 14). Some distal swellings of neuronal processes containing few scattered, round, small vesicles and a long thin, spine-like appendage appeared to contact with the adjacent-lying axon terminals (Fig. 14). Nevertheless, no synaptic specialization of the membranes could be observed.

Another type of synaptic junction was characterized by a relatively large, electron lucent axon terminal containing a uniformly distributed, small quantity of clear, round vesicles, sometimes clustered near the presynaptic membrane (Fig. 15). The postsynaptic membrane was only slightly thickened. Rarely, axon terminals with many large, dense core vesicles intermingled with small and large round, clear vesicles (Fig. 16) were seen. The postsynaptic membrane belonged to the preterminal part of the dendrite. In the terminal part of dendrites devoid of microtubules and endoplasmic reticulum clusters of small round and few large dense core vesicles were observed although no synaptic junctions could be traced. Axo-somatic synapses were extremely seldom seen, being of symmetrical type. There were no mature, definite axo-axonic synapses,

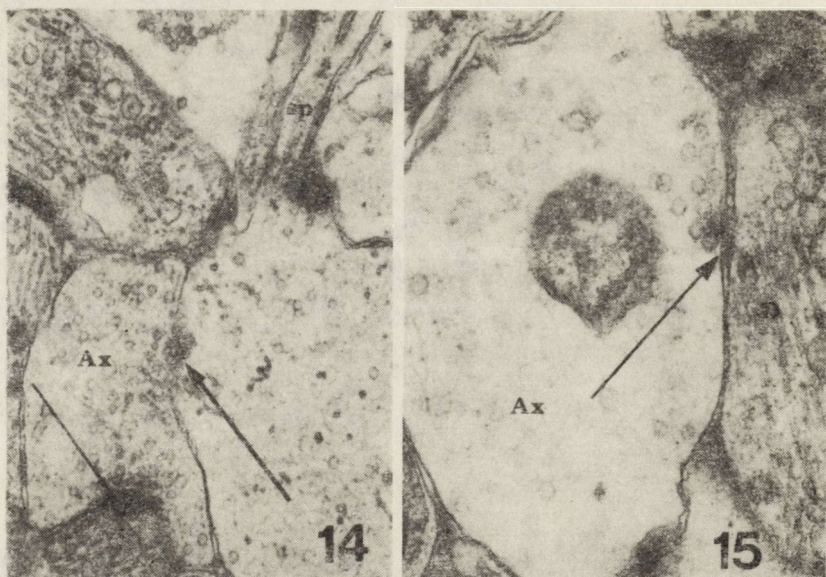


Fig. 14. Axon terminal containing round, large clear vesicles (Ax) contacting a small dendrite (D) (arrow). Neuronal process with thin, spine-like projection (sp) containing clusters of small vesicles near the cytoplasmic membrane (long arrow). Twenty one DIV. $\times 6000$

Ryc. 14. Zakończenie aksonalne zawierające okrągłe, duże jasne pęcherzyki (Ax) tworzące synapsę z małym dendrytem (D) (strzałka). Wypustka neuronalna z wąską, kolczystą wypustką (sp) ze zgrupowaniem małych pęcherzyków przy błonie komórkowej (długa strzałka). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 6000 \times

Fig. 15. Electron lucent axon terminal filled with few round vesicles (Ax) contacting a small dendrite (D) (arrow). Twenty one DIV. $\times 9000$

Ryc. 15. Elektronowo jasne zakończenie aksonalne zawierające nieliczne okrągłe pęcherzyki (Ax) tworzące synapsę na małym dendrycie (D) (strzałka). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 9000 \times



however, in many regions a close apposition of axonal terminals filled with synaptic vesicles could be seen. Some axonal endings exhibited alterations, being filled with unusually distended clear vesicles. The glial cells were not numerous, often appearing in perineuronal position.

DISCUSSION

The neurons of rat SN appear early in ontogeny, between the 14–16th day of gestation and at the same time they begin to synthesize dopamine and send terminals to the neostriatum (Lauder, Bloom 1974; Specht et al. 1981). The adult pattern of innervation in the neostriatum is reached after 3–4 weeks of life. Studies performed *in vivo* revealed, that the neurons of SN during the development period gradually acquire the ultrastructural characteristics typical for mature cells, increasing their cytoplasmic volume, dendritic and axonal arborization and synaptic organization (Tennyson et al. 1973; Tennyson 1976; Phelps, Adinolfi 1982). Our study in tissue culture gave an insight into the pattern of development of SN in *in vitro* conditions, when the neurons of this particular structure are devoid of any influences of structures *in vivo* functionally connected with them. Although, in 14 and 21 DIV examined cultures, the ultrastructural features of neurons were similar to those observed *in vivo*, some morphological characteristics of neurons in 7 DIV cultures differed from the *in vivo* observations. These neurons exhibited many features of immaturity such as a great number of ribosomes and a paucity of cytoplasmic organelles. This might be caused by a specific condition of tissue culture, due to axotomy and loss of physiological interactions with their target neurons. However, these neurons, even at this stage of development, possessed dopaminergic properties as they were positive for catecholamine histofluorescence (Whetsell et al. 1981; Kida et al. 1982). Moreover, the presence of neuron-specific target cells is not, as suggested by Hemmedinger et al. (1981) and Coyle et al. (1973), necessary for formation of a normal pattern of neuronal processes *in vitro*. This has been proven in dissociated primary culture of mesencephalic dopaminergic neurons by Berger et al. (1982). Evidence of this was also supplied in our investiga-

Fig. 16. Axon terminal with many large dense core vesicles intermingled with clear vesicles (long arrow). Dendritic terminal (D) with small round and single large dense core vesicles in the distal part (thick arrow) and a long filopodial process (short arrows). Twenty one DIV. $\times 6000$

Ryc. 16. Zakończenie aksonalne z pęcherzykami typu „dense core” i jasnymi (długa strzałka). Zakończenie dendrytyczne (D) zawierające małe, okrągłe i pojedyncze typu „dense core” pęcherzyki w części końcowej (gruba strzałka) oraz długą wypustkę w części przedkońcowej (krótkie strzałki). Dwadzieścia jeden DIV. Pow. 6000 \times

tion, since the neurons of SN after the initial stages of immaturity rapidly reached the ultrastructural features described in the development of SN neurons in the *in vivo* studies.

Earlier report on the ultrastructural properties of rat SN revealed the presence of 3 types of neurons: of large, medium and small size (Gulley, Wood 1971). The medium sized neurons were supposed to be dopaminergic in nature (Sotelo, Riche 1975). Domesick et al. (1983) introduced a new classification, proposing to distinguish two main types of neurons in the SN, based on the amount and pattern of organization of granular endoplasmic reticulum, and not on the size or shape of the cell body. Those neurons, with prominent and organized into a Nissl body cisternae of granular endoplasmic reticulum, called "dark neurons", owing to the great amount of ribosomes, possessed dopaminergic properties. Our observations seem to be in accordance with his study, because we could also distinguish similar types of neurons in the tissue culture at the electron microscopic level. However, the problem of cell typing of the SN neurons might be even more complex as mentioned also by Domesick et al. (1983), and probably other subtypes of SN neurons exist, as suggested by the results of immunohistochemical and biochemical studies (Agnati et al. 1980; Hökfelt et al. 1980). The third type of neurons rarely encountered in culture, might reflect either a more immature stage of a neuron or an interneuron.

The synaptic organization of the SN examined *in vivo* is not entirely clarified. Different types of synaptic junctions were distinguished in previously performed studies on various species (Bak 1967; Gulley, Smithberg 1971; Hajdu et al. 1973; Wilson et al. 1977; Phelps, Adinolfi 1982). Although the origin of many axonal endings in the SN is still obscure, it seems proven, that symmetrical axo-dendritic synapses, containing in the presynaptic bouton large, pleomorphic vesicles, represent the terminals from the neostriatum (Pinvik, Grofova 1970; Hajdu et al. 1973). This type of synaptic junction was not present in our material. Also type II of synapses according to Hajdu et al. (1973), containing in the presynaptic bouton flattened vesicles was not seen in our culture of SN. The most commonly observed type of synaptic profiles present in our material, as well as in the study performed in tissue culture by West (1982) was an asymmetrical, axo-dendritic synapse with presynaptic ending filled with small, round; clear vesicles, corresponding to type III of synapses of Hajdu et al. (1973). This junction probably originates from axon terminals of large SN neurons. Synapses similar to type IV, V and VI of Hajdu et al. (1973) could also be encountered, however, extremely rarely in our material. West (1982) who could not find the type VI of synapses according to Hajdu et al. (1973) suggested that this synaptic junction was of extrinsic character, originating probably from serotonergic neurons. However, in our cultures also this

type of synaptic contacts, containing in the axon terminal many large dense core vesicles was also observed. This finding may contribute to the supposition of the intrinsic character of that synapse. Another type of synaptic profiles observed *in vivo*, not encountered in our material was a dendro-dendritic synapse (Hajdu et al. 1973; Phelps, Adinolfi 1982). Wilson et al. (1977) disclosed that the presynaptic dendrite in this synaptic contact was dopaminergic in nature, as it was labelled with 5-OH dopamine. In our cultures, some dendritic terminals contained numerous small, round vesicles and few large, dense core vesicles, but no synaptic specialization of the membranes could be found. Neither did we observe the "en passant" synapses and mature axo-axonal synapses. The latter type might be formed in the later stages of SN development, as it was more frequently seen in older animals (Phelps, Adinolfi 1982). The presence in the tissue culture of substantia nigra of different types of synaptic junctions reflects undoubtedly the existence of very complex interactions and influences between particular neurons of this structure.

Glial cells were not numerous in the cultures, appearing mainly in perineuronal position. The glial processes, especially in the younger cultures, ensheathed the neurons and their processes, but they were not so commonly observed as in *in vivo* studies. Glycogen particles were very often seen in the neuronal bodies and their processes, a feature similar to the observation *in vivo*. The particles gradually became less conspicuous in later stages of growth *in vitro*.

We can conclude, that the development and maturation of SN in the organotypic culture disclosed some differences as compared with *in vivo* studies. The organotypic culture of SN retained, however, the main features typical for this structure *in vivo*.

OBRAZ ULTRASTRUKTURALNY ISTOTY CZARNEJ SZCZURA W ORGANOTYPOWEJ HODOWLI TKANKOWEJ

Streszczenie

Celem pracy była ocena obrazu ultrastrukturalnego istoty czarnej uzyskanej od 16–17 dniowych płodów szczura rasy Wistar, w warunkach organotypowej hodowli tkankowej. Po początkowym okresie wzrostu *in vitro*, cechującym się występowaniem wielu niedojrzałych i nisko zróżnicowanych komórek nerwowych, wyróżniono dwa główne typy neurocytów istoty czarnej różniących się przede wszystkim ilością oraz organizacją kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej. Jednocześnie z procesem różnicowania i dojrzewania komórek nerwowych obserwowano proces tworzenia się połączeń synaptycznych. Najczęściej spotykanym typem synapsy była asymetryczna synapsa aksonalno-dendrytyczna zawierająca w zakończeniu przedsynaptycznym małe, okrągłe pęcherzyki synaptyczne. Inne typy połączeń synaptycznych występowały bardzo rzadko.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА КРЫСЫ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Резюме

В работе дается оценка электронно-микроскопической картины черного вещества, полученного от 16–18-дневных эмбрионов крыс расы Уистар в условиях органотипической культуры ткани. После начального этапа роста *in vitro*, характеризующегося появлением многочисленных недоразвитых и слабо дифференцированных нервных клеток, выделились два основных типа нервных клеток черного вещества, отличающихся прежде всего количеством и организацией канальцев зернистой эндоплазматической сетки. Наряду с процессом дифференциации и созревания нервных клеток, наблюдался процесс создания синапсов. Чаще всего выступает асимметричный аксонодендритный синапс, в пресинаптическом окончании которого имеются мелкие круглые синаптически пузырьки. Другие виды синаптических соединений наблюдались очень редко.

REFERENCES

1. Agnati L. F., Fuxe K., Andersson K., Benfenati F., Cortelli P., D'Alessandro R.: The mesolimbic dopamine system: evidence for a high amine turnover and for a heterogeneity of the dopamine neuron population. *Neurosci. Lett.*, 1980, 18, 45–51.
2. Bak I. J.: The ultrastructure of the substantia nigra and caudate nucleus of the mouse and the cellular localization of catecholamines. *Exp. Brain Res.*, 1967, 3, 40–57.
3. Berger B., Di Porzio U., Daguet 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.
4. Coyle J. T., Jacobowitz D., Klein D., Axelrod J.: Dopaminergic neurons in explants of substantia nigra in culture. *J. Neurobiol.*, 1973, 4, 461–470.
5. Domesick V. B., Stinus L., Paskevich P. A.: The cytology of dopaminergic and nondopaminergic neurons in the substantia nigra and ventral tegmental area of the rat: a light and electron-microscopic study. *Neuroscience*, 1983, 8, 743–765.
6. Gulley R. L., Smithberg M.: Synapses in the rat substantia nigra. *Tissue and Cell*, 1971, 3, 691–700.
7. Gulley R. L., Wood R. L.: The fine structure of the neurons in the rat substantia nigra. *Tissue and Cell*, 1971, 3, 675–690.
8. Hajdu F., Hassler R., Bak I. J.: Electron microscopic study of the substantia nigra and the strio-nigral projection in the rat. *Z. Zellforsch.*, 1973, 146, 207–221.
9. Hemmedinger L., Garber B. B., Hoffmann P. C., Heller A.: Target neuron-specific process formation by embryonic mesencephalic dopamine neurons *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, 78, 1264–1268.
10. Hökfelt T., Skirboll L., Rehfeld J. F., Goldstein M., Markey K., Dann C.: A subpopulation of mesencephalic dopamine neurons projecting to limbic area contains a cholecystokinin-like peptide: evidence from immunohistochemistry combined with retrograde tracing. *Neuroscience*, 1980, 5, 2093–2124.
11. Kida E., Renkawek K., Victorov I.: Ocena dojrzewania istoty czarnej w hodowli organotypowej. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 355–363.
12. Lauder J. M., Bloom F. E.: Ontogeny of monoamine neurons in the locus

- coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. I. Cell differentiation. *J. comp. Neurol.*, 1974, 155, 469—482.
13. Le Beux Y. J.: An ultrastructural study of a cytoplasmic filamentous body, termed nematosome, in the neurons of rat and cat substantia nigra. *Z. Zellforsch.*, 1972, 133, 289—325.
 14. Mytilineou C., Cohen G., Dembiec-Cohen D., Van Woert M., Hwang E.: Explant cultures of dog substantia nigra and striatum: a model for the study of nigro-striatal dopamine neurons. *J. Neural Trans.*, 1983, suppl. 19, 37—51.
 15. Phelps P. E., Adinolfi A. M.: The postnatal development of the substantia nigra: a light and electron microscope study. *J. comp. Neurol.*, 1982, 209, 123—138.
 16. 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.
 17. Rinvik E., Grofova I.: Observations on the fine structure of the substantia nigra of the cat. *Exp. Brain Res.*, 1970, 11, 229—248.
 18. Schwyn R. C., Fox C. A.: The primate substantia nigra: a Golgi and electron microscopic study. *J. Hirnforsch.*, 1974, 15, 95—126.
 19. Sotelo C., Riche D.: Ultrastructural identification of nigral dopaminergic cells in the rat. *Exc. Med. Int. Congress Series*, 1975, 359, 425—431.
 20. Specht L. A., Pickel V. M., Joh T. H., Reis D. J.: Light microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. I. Early ontogeny. *J. comp. Neurol.*, 1981, 109, 233—253.
 21. Tennyson V. M., Mytilineou C., Barret R.: Fluorescence and electron microscopic studies of the early development of the substantia nigra and area ventralis tegmenti in the fetal rabbit. *J. comp. Neurol.*, 1973, 149, 233—258.
 22. Tennyson V. M.: Development of the substantia nigra, pars compacta and neostriatum. In: *Progress in Neuropathology*. Ed. H. M. Zimmerman, Grune and Stratton, London 1976, v. 3, 359—381.
 23. West N. R.: Ultrastructural study of neurons and synapses in long term cultures of rat substantia nigra. *Anat. Rec.*, 1982, 202, 202 A.
 24. Whetsell W. O., Mytilineou C., Shen J., Yahr M. D.: The development of the dog nigro-striatal system in organotypic culture. *J. Neural Trans.*, 1981, 52, 149—161.
 25. Wilson C. J., Groves P. M., Fifkova E.: Monoaminergic synapses, including dendro-dendritic synapses in the rat substantia nigra. *Exp. Brain Res.*, 1977, 30, 161—174.

Author's address: Department of Neuropathology, Medical Research Centre, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa

ELŻBIETA KIDA, KRYSZYNA RENKAWEK,
ILIA VICTOROV, NATALIA SZASZKOVA

MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT SUBSTANTIA NIGRA
INDUCED *IN VITRO* BY SERUM FROM PATIENTS
WITH PARKINSON'S DISEASE

Department of Neuropathology, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw
Institute of Brain, Academy of Medical Sciences, Moscow

Substantia nigra is a target structure in the central nervous system undergoing severe morphological changes in Parkinson's disease (PD). Although recently the mechanism of this disease became clearer after the experiments with N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), a selective neurotoxin for substantia nigra neurons (Renkaweck 1985), the pathogenicity of this disease is still unknown. Both exogenous and endogenous factors are postulated (Cohen 1983; Calne, Langston 1983). The aim of our study was to examine rat substantia nigra in organotypic culture treated with serum from Parkinson's disease patients for 7 days.

Substantia nigra exhibited severe neuronal changes suggesting the presence of a damaging factor(s) in the patients' serum.

MATERIAL AND METHODS

The exact method of organotypic culture of substantia nigra was described in the previous paper (Kida 1986). The pieces of midbrain with the area of substantia nigra were taken from 16—17-day-old Wistar rat embryos and kept in a Carrel flask or a Maximov double-cover slip assembly. For the first four days, the cultures were grown in standard medium containing serum from healthy individuals. At the age of 4 days *in vitro* (DIV) the cultures were exposed to the experimental medium consisting of 30% PD patients serum, 70% Earle's balanced salt solution, supplemented with 600 mg% glucose and 100 U/ml penicillin. The sera from patients were stored at -20°C . After the next

3 days, the medium was renewed with the same amount of serum from the same PD patient. The cultures remained in the experimental medium for a total period of 7 days, and thereafter they were fixed for electron microscopy examination according to the method described elsewhere (Kida, Renkawek 1985). Control cultures consisted of equal-aged cultures growing in standard conditions. Sister cultures from particular experimental and control groups were processed for fluorescence histochemistry of catecholamine (Victorov et al. 1985). Control and experimental cultures were fixed and incubated in a mixture of glyoxylic acid and paraformaldehyde in salt solution.

Sera from seven patients, exactly neurologically examined and classified as a typical clinical picture of Parkinson's disease according to the commonly accepted signs and symptoms (Selby 1968) were used in the experiments.

RESULTS

Under the light microscope the first cells outgrowing from the explants were observed 24 h after explantation. Most of the cells were of glial type, but also some neurons were seen at the edge of the explants. On the following days the explants became flattened and were surrounded by abundant glial cells and neuronal and glial processes. After 3 days of PD patients serum treatment, distinct degenerative changes of some glial cells were seen. At this time, the control cultures, growing in a medium with serum from healthy individuals were unchanged. After 7 days in experimental medium these degenerative changes became more advanced. In the glial cells a disruption of cell processes and fragmentation of cell bodies could be seen. Some of the neuronal processes were also damaged. In some cultures, neuronal and glial processes in the outgrowing zone were only sporadically seen. The explants in these cultures were not so severely destroyed as the cells in the outgrowth zone.

Under the electron microscope, in the cultures treated with PD patients serum for 7 days, both glial cells and neurons showed intensive degenerative changes of the cell organelles. In the neuronal cytoplasm most susceptible were mitochondria. In some cells mitochondria with granular matrix were observed. The cristae often were not visible. In the cells dilated channels of smooth endoplasmic reticulum and numerous microtubules were observed. Another change, typical for cultures treated with experimental serum was accumulation of membrane-bound lipid bodies, sometimes of enormous size. Accumulation of numerous residual bodies was also seen (Fig. 1). Ribosomes were very seldom encountered, and only in a dispersed form. In a certain number of cells,

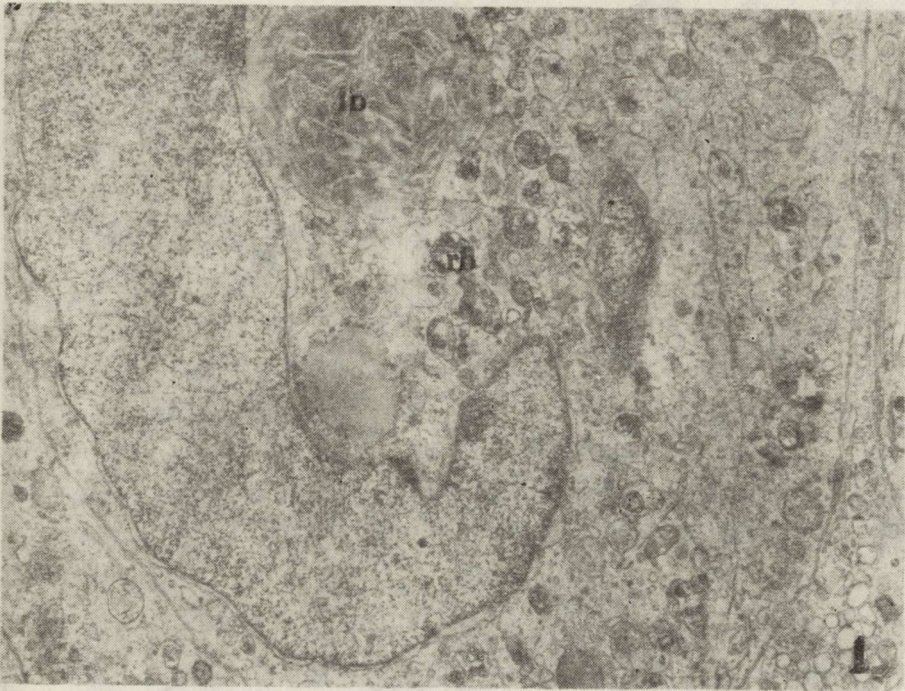


Fig. 1. Neuron with large, membrane-bound lipid body (lb), lysosomes and many residual bodies (rb) in the cytoplasm. Four DIV, 7 days in experimental medium. $\times 4800$

Ryc. 1. Komórka nerwowa zawierająca dużą obłonioną kulę tłuszczu (lb), lizosomy oraz liczne ciała resztkowe (rb) w cytoplazmie. Hodowla czterodniowa, 7 dni w medium doświadczalnym. Pow. 4800 \times

edematous and degenerative changes were pronounced, whereas other cells showed only moderate alterations expressed by mitochondrial abnormalities and lipid accumulation. In cells undergoing severe degeneration the hyaloplasm of low electron density was deprived of most of the organelles. Nevertheless, the microtubules and filaments were well preserved, but mitochondria showed a different picture of damage or destruction. The cytoplasm of these cells contained lipid bodies and very few dispersed ribosomes. Several neurons exhibited more advanced degenerative changes. In these cells chromatin was randomly distributed in the nucleus, the cytoplasm was devoid of organelles, or contained altered mitochondria, lipid bodies, a few dilated granular endoplasmic reticulum channels and dispersed ribosomes (Fig. 2). The neuropil showed severe degenerative changes of cell organelles and deprivation of ribosomes of reticulum channels, as well (Fig. 3). Moreover, synaptic junctions were only sporadically seen. Control cultures exhibited well preserved morphological cell characteristics.

Fluorescence histochemistry revealed in the control cultures typical

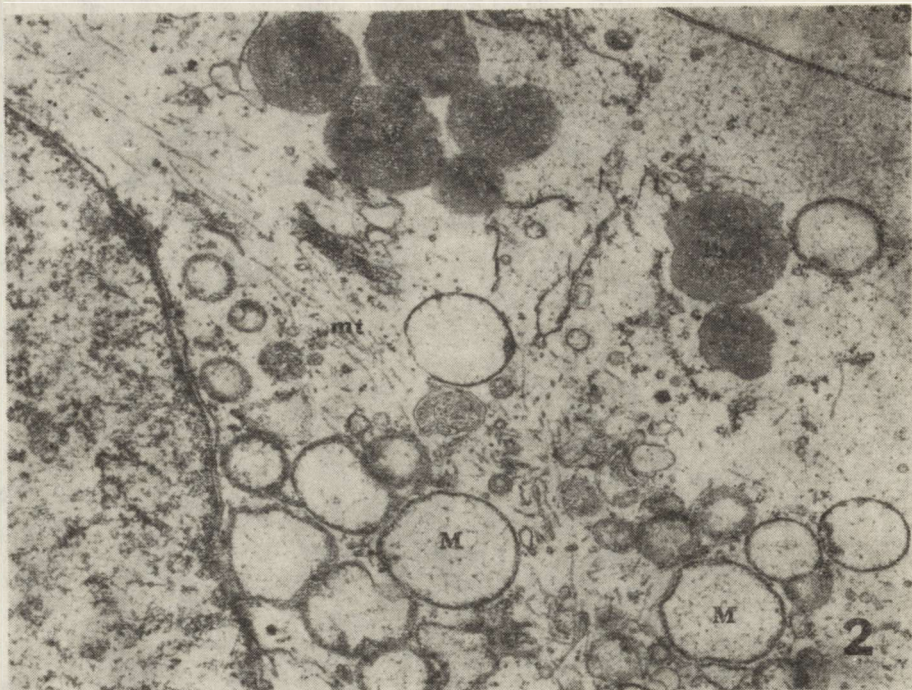
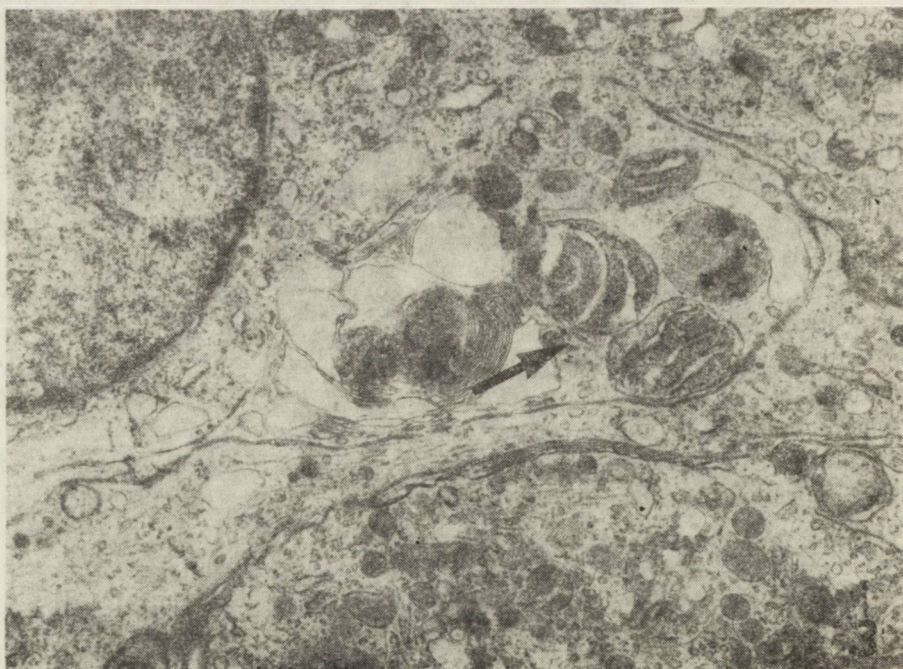


Fig. 2. Neuron with edematous cytoplasm containing swollen or damaged mitochondria (M), lipid bodies (lb) and many neurotubules (mt) arranged around the nucleus. Four DIV, 7 days in experimental medium. $\times 9000$

Ryc. 2. Komórka nerwowa wykazująca cechy obrzęku z obrzmiałymi lub uszkodzonymi mitochondriami (M), kulami tłuszczu (lb) oraz licznymi neurotubulami (mt) skupionymi wokół jądra. Hodowla czterodniowa, 7 dni w medium doświadczalnym. Pow. 9000 \times



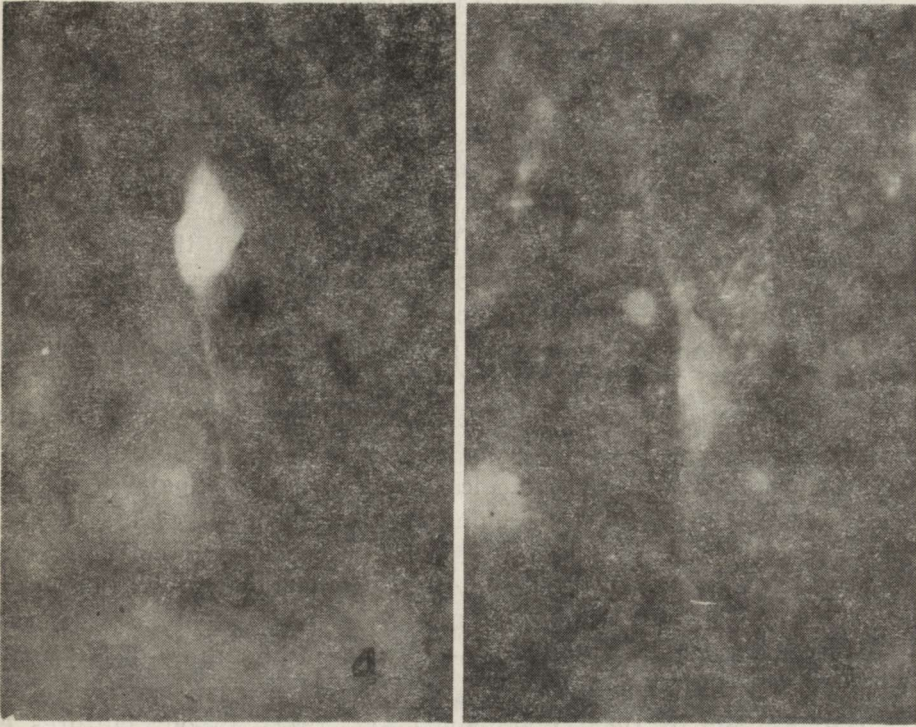


Fig. 4. Neuron from the control group. Catecholamine histofluorescence. Seven DIV. $\times 1000$

Ryc. 4. Komórka nerwowa z kontrolnej hodowli. Fluorescencja katecholamin. Siedem dni *in vitro*. Pow. $1000 \times$

Fig. 5. Catecholaminergic neuron of substantia nigra. Four DIV, 3 days in experimental medium. $\times 1000$

Ryc. 5. Neuron katecholaminergiczny istoty czarnej. Hodowla czterodniowa, 3 dni w medium doświadczalnym. Pow. $1000 \times$

for catecholaminergic neurons bright green fluorescence (Fig. 4). After 3 days of PD patients serum treatment many cells still showed positive fluorescence properties of the neuronal bodies and cell processes, however some of them exhibited a slightly weaker fluorescence as compared with the control cultures (Fig. 5). After 7 days of experimental medium in many cultures fluorescence of neurons was not observed. In the explants numerous small granules of pale green material lying free among the cells could be observed. In the cell bodies and processes a bright yellow fluorescence typical for lipids was visible.

Fig. 3. Degeneration of organelles in neuropil. Accumulation of lipid bodies and damaged mitochondria. Degeneration of endoplasmic reticulum (arrow). Four DIV, 7 days in experimental medium. $\times 3000$

Ryc. 3. Zmiany zwyrodnieniowe w neuropilu. Nagromadzenie ciał tłuszczowych i uszkodzonych mitochondriów. Zwyrodnienie siateczki śródplazmatycznej (strzałka). Hodowla czterodniowa, 7 dni w medium doświadczalnym. Pow. $3600 \times$

DISCUSSION

In cultures of rat substantia nigra some alterations of the neurons and glial cells were observed after PD patients serum treatment as compared with the control cultures growing in a medium with serum from healthy individuals. Degenerative changes differed in severity from cell to cell independently of the case studied. The observed degeneration of cell organelles could be responsible for the gradual loss of catecholaminergic fluorescence or absence of fluorescence properties in the cultures. The alterations found in substantia nigra exposed to PD patients serum are also more pronounced than in striatal cultures treated with PD patients sera (Kida, Renkawek 1985). At any rate, these cellular changes are not specific. Similar in nature pathological changes of neurons and glia were observed in tissue culture of cerebellum exposed to other pathological conditions like anoxia (Renkawek, Herbaczyńska-Cedro 1985) or kainic acid (Renkawek et al. 1982).

Degenerative changes found in substantia nigra in culture cannot be compared with human pathology because of enhanced artificial changes observed in autopsy material (Forno 1982). The only characteristic ultrastructural abnormality described found in the literature seems to be a cytoplasmic inclusion known as a Lewy body (Duffy, Tennyson 1965; Roy, Wolman 1969; Watanabe et al. 1977). In our cultures exposed to PD patients sera these structures were not present. The mechanism and pathogenic factor inducing production of these inclusions remains obscure. There are some hypothetical theories that Lewy bodies may originate in part from degenerated protein containing sulphur (Kimula et al. 1983) or reflect an abnormal filamentous organization secondary to another primary metabolic abnormality (Goldman et al. 1983). Recently, Nakashima and Ikuta (1984) have suggested that in catecholaminergic neurons, tyrosine hydroxylase might play an important role in the production of this structure. Lewy bodies were described only in human material and they were never found in experimental models of PD in animals (Langston et al. 1984). It should be mentioned that intracerebral inoculation of a substantia nigra suspension, taken *post mortem* from PD patients, into various species of animals did not induce any clinical or morphological abnormalities (Bethlem, den Hartog Jager 1960).

The factors responsible for cell and synapse lesions in cultures after PD patients sera application are unknown. It has been postulated that both endogenous and exogenous factors could be responsible for cellular changes (Calne, Langston 1983; Elizan, Casals 1983; Marsden 1983; Duvoisin 1984). It may be supposed that in culture some toxic agent(s) might be released from the degenerated dopaminergic cells. Although the etiology of PD is unknown, a suggestion recently appeared of cell destruction in Parkinson's disease. Cohen (1983) proposed

that this disease is a result of two processes: abnormal production of hydrogen peroxide by monoamine oxidase accompanied by generation of superoxide free radicals and hydroxyl free radicals. Disturbances of balance between these products and dopamine content produces finally accelerated senescence of dopamine neurons. Moreover, the activity of enzymes connected with the protective role of cellular metabolism against abnormal autooxidation of dopamine is also reduced in PD patients (Ambani et al. 1975; Perry et al. 1982). According to this hypothesis, we could speculate that in PD patients serum there exists some an unknown factor(s) which is able to induce structural changes in substantia nigra cells growing *in vitro*.

**ZMIANY MORFOLOGICZNE ISTOTY CZARNEJ SZCZURA *IN VITRO*
PODDANEJ DZIAŁANIU SUROWIC UZYSKANYCH OD PACJENTÓW
Z CHOROBA PАРKINSONA**

Streszczenie

Hodowle organotypowe istoty czarnej szczura w wieku 4 dni *in vitro* poddano przez okres 7 dni działaniu medium zawierającego surowice uzyskane od pacjentów z chorobą Parkinsona. Stwierdzono obecność zmian zwyrodnieniowych zarówno w komórkach nerwowych, jak i glejowych. Pomimo że zmiany strukturalne nie miały charakteru specyficznego, ich wystąpienie sugeruje obecność czynnika toksycznego w badanych surowicach powodującego uszkodzenie komórek istoty czarnej.

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЧЕРНОГО ВЕЩЕСТВА КРЫСЫ,
ПОДВЕРГНУТОГО *IN VITRO* ВОЗДЕЙСТВИЮ СЫВОРОТОК, ПОЛУЧЕННЫХ
ОТ ПАЦИЕНТОВ, СТРАДАЮЩИХ БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА**

Резюме

Органотипические культуры черного вещества крысы четырехдневного возраста были подвергнуты в течение 7 дней *in vitro* воздействию среды, содержащей сыворотки, полученные от пациентов, страдающих болезнью Паркинсона. Обнаружено наличие дегенеративных изменений как в нервных, так и в глиальных клетках. Несмотря на то, что изменения не носили специфического характера, сам факт их существования свидетельствует о присутствии в исследуемых сыворотках токсического фактора, вызывающего повреждение черного вещества.

REFERENCES

1. Ambani L. M., Van Woert M. H., Murphy S.: Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease. Arch. Neurol., 1975, 32, 114—118.
2. Bethlem J., Den Hartog Jager W. A.: The incidence and characteristics of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans (Parkinson's disease). J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1960, 23, 74—80.
3. Calne D. B., Langston J. W.: Aetiology of Parkinson's disease. Lancet, 1983, II, 1457—1459.
4. Cohen G.: The pathobiology of Parkinson's disease: biochemical aspects of

- dopamine neuron senescence. *J. Neural Transmission*, 1983, suppl., 19, 89—103.
5. Duffy P. E., Tennyson V. M.: Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinson's disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1965, 24, 398—414.
 6. Duvoisin R. C.: Is Parkinson's disease acquired or inherited? *Can. J. Neurol. Sci.*, 1984, 11, 151—155.
 7. Elizan T. S., Casals J.: The viral hypothesis in Parkinsonism. *J. Neural Transmission*, 1983, suppl. 19, 75—88.
 8. Forno L. S.: Pathology of Parkinson's disease. In: *Movement Disorders*. Ed. C. D. Marsden, S. Fahn. Butterworth Scientific, 1982, 25—40.
 9. Goldman J. E., Yen Shu-Hui, Chiu Fung-Chow, Peress N. S.: Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science*, 1983, 221, 1082—1084.
 10. Kida E., Renkawek K.: The effect of serum and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease on ultrastructural properties of rat striatum *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1985, (in press).
 11. Kida E.: Ultrastructural properties of rat substantia nigra in organotypic culture. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 145—159.
 12. Kimula Y., Utsuyama M., Yoshimura M., Tomonaga M.: Element analysis of Lewy and adrenal bodies in Parkinson's disease by electron probe microanalysis. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1983, 59, 233—236.
 13. Langston J. W., Langston E. B., Irwin I.: MPTP-induced parkinsonism in human and non-human primates. Clinical and experimental aspects. *Acta Neurol. Scand.*, 1984, 70 (suppl. 100), 49—54.
 14. Marsden C. D.: Neuromelanin and Parkinson's disease. *J. Neural Transmission*, 1983, suppl., 19, 121—141.
 15. Nakashima S., Ikuta F.: Tyrosine hydrolase protein in Lewy bodies of parkinsonian and senile brains. *J. neurol. Sci.*, 1984, 66, 91—96.
 16. Perry T. L., Godin D. V., Hansen S.: Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.*, 1982, 33, 303—310.
 17. Renkawek K., Matyja E., Mossakowski M. J.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of rat cerebellum. *J. neurol. Sci.*, 1982, 53, 321—330.
 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.: Doświadczalny model choroby Parkinsona wywołany neurotoksyną N-metyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyną (MPTP). *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, (in press).
 20. Roy S., Wolman L.: Ultrastructural observations in parkinsonism. *J. Pathol.*, 1969, 99, 39—44.
 21. Selby G.: Parkinson's disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Eds. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. North Holland Publ. Co., Amsterdam, 1968, Vol. 6, 173—213.
 22. Victorov I., Szaszkowa N., Kida E., Renkawek K., Mossakowski M. J.: Maturation of dopaminergic neurons in dissociated cultures of mouse substantia nigra. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, (in press).
 23. Watanabe I., Vachal E., Tomita T.: Dense core vesicles around the Lewy body in incidental Parkinson's disease: an electron microscopic study. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1977, 39, 173—175.

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

<http://rcin.org.pl>

HALINA WEINRAUDER, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI,
IRINA V. GANUSZKINA

WPŁYW SUROWIC CHORYCH ZE ZWYRODNIENIEM
WĄTROBOWO-SOCZEWKOWYM LECZONYCH D-PENICYLAMINĄ
NA ROZWÓJ GLIOPATII WILSONOWSKIEJ *IN VITRO*

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa
Laboratorium Doświadczalnej Patologii Instytutu Neurologicznego
ANM ZSRR, Moskwa

Prowadzenie pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej w środowisku odżywczym, zawierającym surowicę chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym, prowadzi do uszkodzeń komórek gleju gwiazdzistego, typowych dla tzw. gliopatii wilsonowskiej. Nieprawidłowości komórkowe przyjmują postać uogólnionego przerostu indywidualnych astrocytów, któremu towarzyszą zmiany zwyrodnieniowe, wyrażające się przede wszystkim fragmentacją ich wypustek, prowadzące do pojawiania się amebowatych bezwypustkowych komórek. Na tle tych nieswoistych uszkodzeń występują zmienione komórki gwiazdziste znane pod nazwą komórek Alzheimera typu II oraz komórek Opalskiego, które obok komórek Alzheimera typu I stanowią najbardziej charakterystyczny komponent patologii gleju w chorobie Wilsona (Mossakowski i wsp. 1970; Mossakowski, Weinrauder 1984). Identyczne nieprawidłowości komórkowe uzyskano w pozaustrojowej hodowli tkanki nerwowej, prowadzonej w środowisku odżywczym, zawierającym surowicę zdrowych ludzi z dodatkiem egzogennych związków miedzi w ilości odpowiadającej jej stężeniu w mózgach ludzi z chorobą Wilsona. Spostrzeżenie to skłoniło do wysunięcia przypuszczenia, iż miedź gromadząca się w nadmiarze w ośrodkowym układzie nerwowym i podwyższona w surowicy krwi u chorych z zespołem zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego jest podstawowym czynnikiem lub jednym z czynników odpowiedzialnych za rozwój patologii gleju zarówno *in situ*, jak i *in vitro* (Mossakowski i wsp. 1970). Pośrednie potwierdzenie słuszności tej hipotezy przyniosła kolejna seria doświadczeń, w których do środowiska odżywczego hodowli, zawierającego surowicę chorych z nieleczonym zespołem zwyrod-

nienia wątrobowo-soczewkowego lub egzogenne związki miedzi podawano d-penicylaminę, stanowiącą podstawowy lek współczesnej terapii choroby Wilsona. Podawanie d-penicylaminy w tych warunkach zapobiegało rozwojowi gliopatii wilsonowskiej, a przede wszystkim pojawianiu się komórek Alzheimerera typu II i komórek Opalskiego (Mossakowski i wsp. 1977).

W tym świetle wydawało się celowe prześledzenie wpływu surowic od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym, leczonych d-penicylaminą na rozwój oraz obraz morfologiczny i immunohistochemiczny doświadczalnej gliopatii wilsonowskiej *in vitro*. Terapia d-penicylaminą prowadzi do wydatnego obniżenia poziomu miedzi w surowicy krwi chorych, nie wpływając istotnie na zawartość i aktywność ceruloplazminy stanowiącej alfa-2-glikoproteinę surowicy, syntetyzowaną w wątrobie i wiążącą w trudno dysocjujący związek jony miedzi. Zawartość ceruloplazminy oraz jej zdolność wiązania miedzi stanowi czynnik decydujący o proporcji tzw. miedzi związanej, tworzącej z nią trwałą związek, oraz miedzi wolnej, pozostającej w łatwo dysocjującym związku z albuminami surowicy. Do badań celowo użyto surowic chorych o różnym czasie trwania procesu chorobowego ze zróżnicowanym okresem stosowania terapii d-penicylaminą.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na organotypowych hodowlach mózdzku noworodków szczurzych, prowadzonych we flaszках Carrela według metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Środowisko odżywcze hodowli, zmieniane dwa razy w tygodniu, zawierało 50% surowicy krwi ludzi zdrowych, 40% zbuforowanego płynu wieloelektrolitowego (Wytwórnia Surowic i Szczepionek, Lublin) i 10% wyciągu z zarodków kurzych. Uzupełniano je glukozą do końcowego stężenia 600 mg%, a jego pH doprowadzano do 7,0—7,3.

W 14—16 dniu *in vitro* do wybranych hodowli w miejsce prawidłowej surowicy ludzkiej podawano surowicę od leczonych chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym, przetrzymując je w tych warunkach przez okres 3—4 dni. Hodowle kontrolne przez cały okres doświadczenia prowadzono w rutynowym środowisku odżywczym. Hodowle kontrolowano codziennie w mikroskopie fazowo-kontrastowym. Po upływie założonego czasu doświadczenia używano je do badań histologicznych i immunomorfologicznych.

Do badań histologicznych hodowle utrwalano w płynie Carnoya i barwiono je błękitem toluidyny. Hodowle przeznaczone do badań immunomorfologicznych płukano trzykrotnie po 15 min w zbuforowanym fizjologicznym roztworze chlorku sodu (PBS), suszono i utrwalano w zimnym acetonie (-20°C) przez okres 4 min. Utrwalone hodowle inkubowano następnie w temperaturze pokojowej przez okres 30 min w su-

rowicy odpornościowej zawierającej przeciwciała przeciwko kwaśnemu białku włókienek glejowych (GFAP), rozcieńczonej w stosunku 1:100. Surowica odpornościowa pochodziła z Protein Laboratory Copenhagen University (dr E. Bock). Po inkubacji hodowle płukano trzykrotnie po 15 min w PBS, a następnie poddawano je drugiej inkubacji z użyciem fragmentu F/ab₂ antykróliczej immunoglobuliny IgG, skoniugowanej z fluoresceiną (Boehring, R.G. RFN). Po wypłukaniu szkieł z nadmiaru surowicy montowano je w zbuforowanej glicerynie i oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym f-my Leitz. Kontrolę swoistości odczynu fluorescencyjnego przeprowadzano zastępując surowicę odpornościową surowicą nieimmunizowanych królików.

Do doświadczeń użyto surowice od 3 chorych z klinicznie i biochemicznie zweryfikowanym zespołem zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego.

Chory W., mężczyzna l. 19 z akinetyczno-hipertoniczną postacią choroby Wilsona i 6-letnim wywiadem chorobowym. Od lat 2 otrzymywał leczenie d-penicylaminą. Krew pobrano bezpośrednio po zakończeniu serii leczenia. Zawartość miedzi w surowicy 2,4 mg⁰/. Aktywność oksydazowa ceruloplazminy 2,4 j.m.

Chory D., mężczyzna l. 26 z typowym zespołem choroby Wilsona i 2-letnim wywiadem chorobowym. Po raz pierwszy leczony d-penicylaminą. Poprzednio leczony Kuprenilem. Krew pobrana w środku kuracji. Zawartość miedzi w surowicy — 13,6 mg⁰/. Aktywność ceruloplazminy — nieoznaczalna.

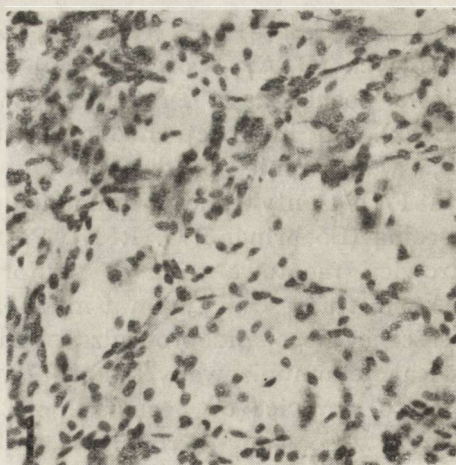
Chora B., kobieta l. 16 z typowym zespołem klinicznym choroby Wilsona, z 1-rocznym wywiadem chorobowym. Początkowo leczona Kuprenilem, wobec braku poprawy zastosowano leczenie d-penicylaminą. Krew pobrana bezpośrednio po zakończeniu pierwszej kuracji. Zawartość miedzi w surowicy krwi — 13,6 mg⁰/. Aktywność ceruloplazminy — 1 j.m.

WYNIKI

Obraz morfologiczny

Obraz morfologiczny hodowli z surowicami od wszystkich chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym różnił się istotnie od spostrzeganych w materiale kontrolnym (ryc. 1), wykazując ponadto uchwytne różnice w zależności od zastosowanej surowicy.

Podstawową różnicę materiału doświadczalnego w stosunku do kontroli stanowiło znaczne bogactwo komórek glejowych zarówno w eksplantacie, jak i w strefie wzrostu hodowli. Występując w hodowlach ze wszystkimi surowicami zjawisko to było najbardziej zaznaczone w przypadkach surowic pacjentów z krótszym wywiadem chorobowym (chory D. i B.). W obu tych przypadkach obecne były ponadto liczne powiększone jądra glejowe z niezwykle bogatą zawartością chromatyny (ryc. 2, 3). Widoczne były również komórki glejowe z cechami prze-



Ryc. 1. Hodowla kontrolna, 18 dni *in vitro*. Typowy obraz mieszanej astrocytarno-oligodendroglejowej strefy wzrostu. Błękit toluidyny. Pow. 200 \times

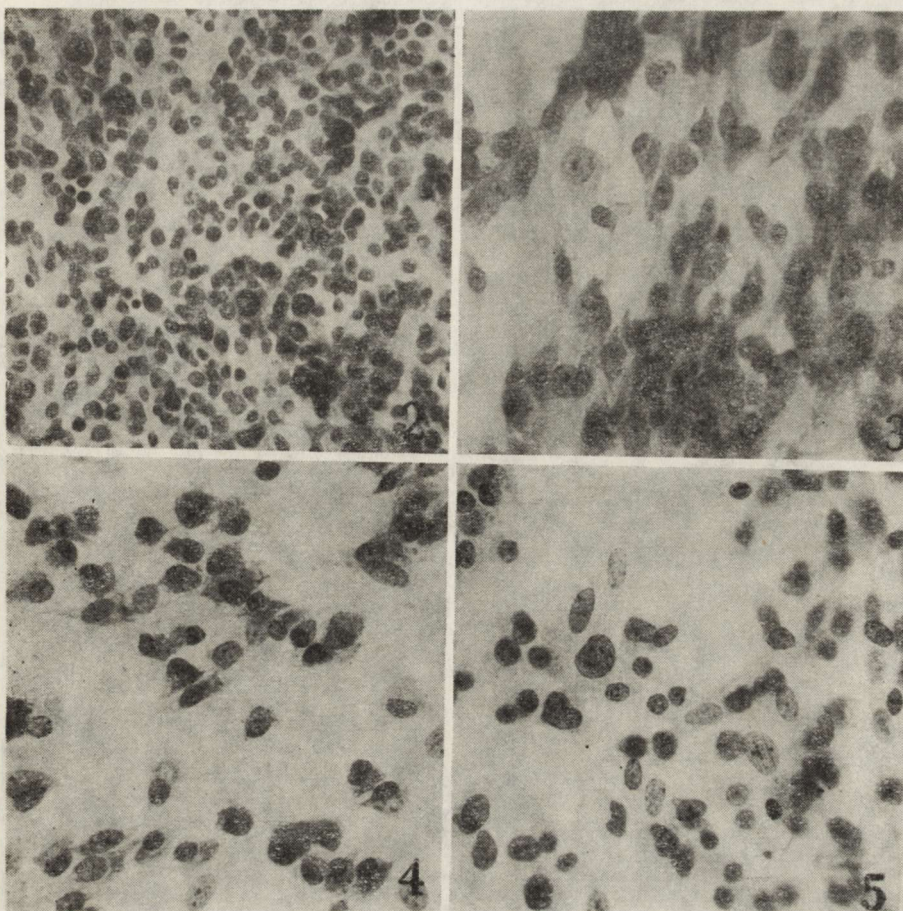
Fig. 1. Control culture, 18 days *in vitro* (DIV). Typical picture of mixed astrocytic-oligodendrocytic outgrowth zone. Toluidine blue. \times 200

rostu, przypominające typowe gemistocyty, różniące się jedynie od nich stosunkowo dobrze zachowanymi wypustkami (ryc. 4). Nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe astrocytów, polegające na nagromadzeniu wodniczek w cytoplazmie, zatarciu zarysów błon cytoplazmatycznych i rozpadzie wypustek były na ogół mniej zaznaczone. Były stosunkowo nieliczne w przypadku surowicy chorej B. z najkrótszym okresem trwania procesu chorobowego (ryc. 5), a nieco obfitsze z surowicą od chorego D. z dwuletnim wywiadem chorobowym (ryc. 6). Były natomiast najsilniej wyrażone przy użyciu surowicy pacjenta W. z najbardziej zaawansowanym i najdłuższym przebiegiem choroby (ryc. 7). Tę samą zależność stwierdzono w stosunku do częstości występowania i obfitości komórek Alzheimerera typu II. Występując pojedynczo w przypadku B., nieco częściej w przypadku D., stanowiły zjawisko dość pospolite w przypadku surowicy W. (ryc. 8). Komórki Opalskiego w całym materiale występowały sporadycznie. Podobnie jak nagie jądra, spotykano je najczęściej w przypadku surowicy chorego W. (ryc. 9). W pozostałych przeważały komórki przejściowe między uformowanymi komórkami Opalskiego a przerośniętymi astrocytami.

Obraz immunomorfologiczny

Odczyn immunohistochemiczny wykazywał wyraźną zależność od charakteru i nasilenia nieprawidłowości strukturalnych komórek glijowych. W hodowlach z przewagą procesów przerostowych był on silniejszy, a znacznie słabszy przy nasileniu zmian zwyrodnieniowych.

Najsilniejszą fluorescencję stwierdzano w dużych, przerośniętych astrocytach z obfitą cytoplazmą i dobrze zachowanymi wypustkami. Ja-



Ryc. 2. Hodowla doświadczalna, surowica D., 18 dni *in vitro*. Obfita populacja glejowa z licznymi dużymi hiperchromatycznymi jądrami. Pobrzeże strefy wzrostu i eksplantatu. Błękit toluidyny. Pow. 200 ×

Fig. 2. Experimental culture, serum D., 18 DIV. Dense glial population from the explant periphery with numerous, enlarged, hyperchromatic nuclei. Toluidine blue. × 200

Ryc. 3. Hodowla doświadczalna, surowica B., 18 dni *in vitro*. Wśród typowego astrocytarnego utkania strefy wzrostu widoczne gniazda komórek z hiperchromatycznymi jądrami. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

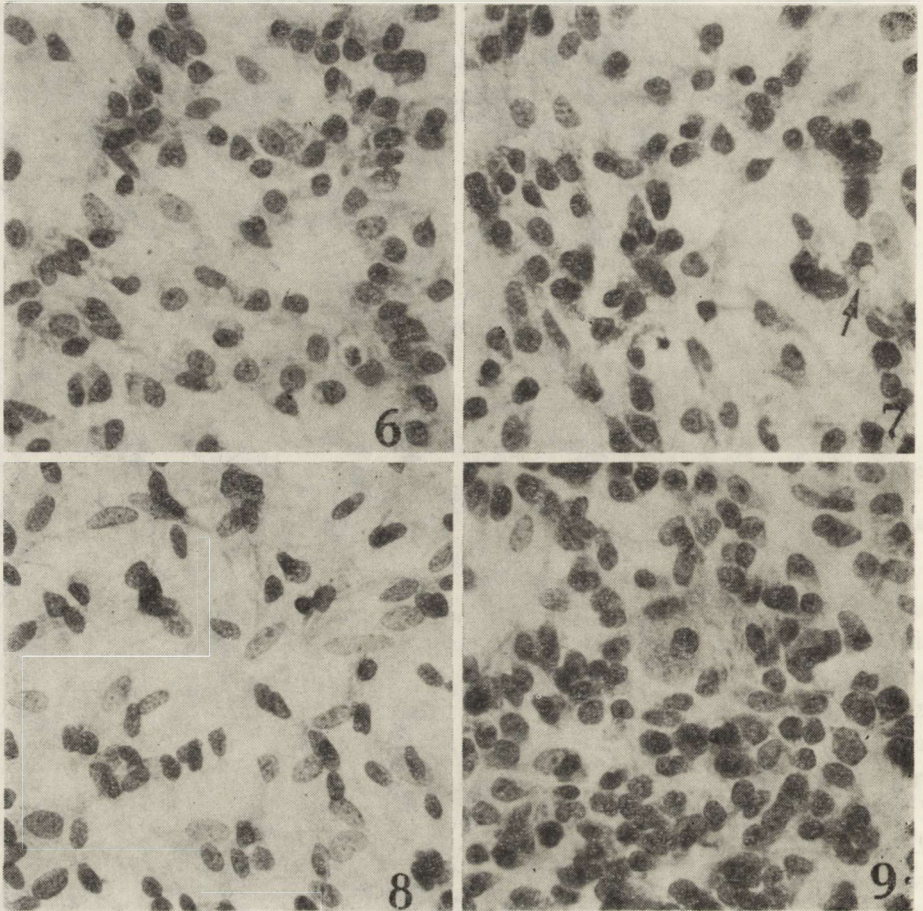
Fig. 3. Experimental culture, 18 DIV, serum B. In typical astrocytic population of the outgrowth zone, nests of hyperchromatic nuclei are visible. Toluidine blue. × 400

Ryc. 4. Hodowla doświadczalna, surowica D., 18 dni *in vitro*. Gemistocytopodobne komórki glejowe w strefie wzrostu. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

Fig. 4. Experimental culture, 18 DIV, serum D. Gemistocyte-like glial cells from the outgrowth zone. Toluidine blue. × 400

Ryc. 5. Hodowla doświadczalna, surowica B., 19 dni *in vitro*. Astrocyty strefy wzrostu ze słabo widoczną cytoplazmą, w znacznej części pozbawione wypustek. Widoczne pojedyncze nagie jądra. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×

Fig. 5. Experimental culture, serum B., 19 DIV. Astrocytes from the outgrowth zone with hardly visible contours of cytoplasm and processes. Some naked nuclei are present. Toluidine blue. × 400



Ryc. 6. Hodowla doświadczalna, surowica D, 18 dni *in vitro*, surowica D. Astrocyty strefy wzrostu ze słabo widocznymi zarysami cytoplazmy, w większości pozbawione wypustek. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

Fig. 6. Experimental culture, serum D., 18 DIV. Most of the astrocytes from outgrowth zone deprived of cytoplasm and processes. Toluidine blue. \times 400

Ryc. 7. Hodowla doświadczalna, surowica W., 17 dni *in vitro*. Ciężko uszkodzone komórki strefy wzrostu. Niektóre z widocznymi wodniczkami w cytoplazmie (strzałka). Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

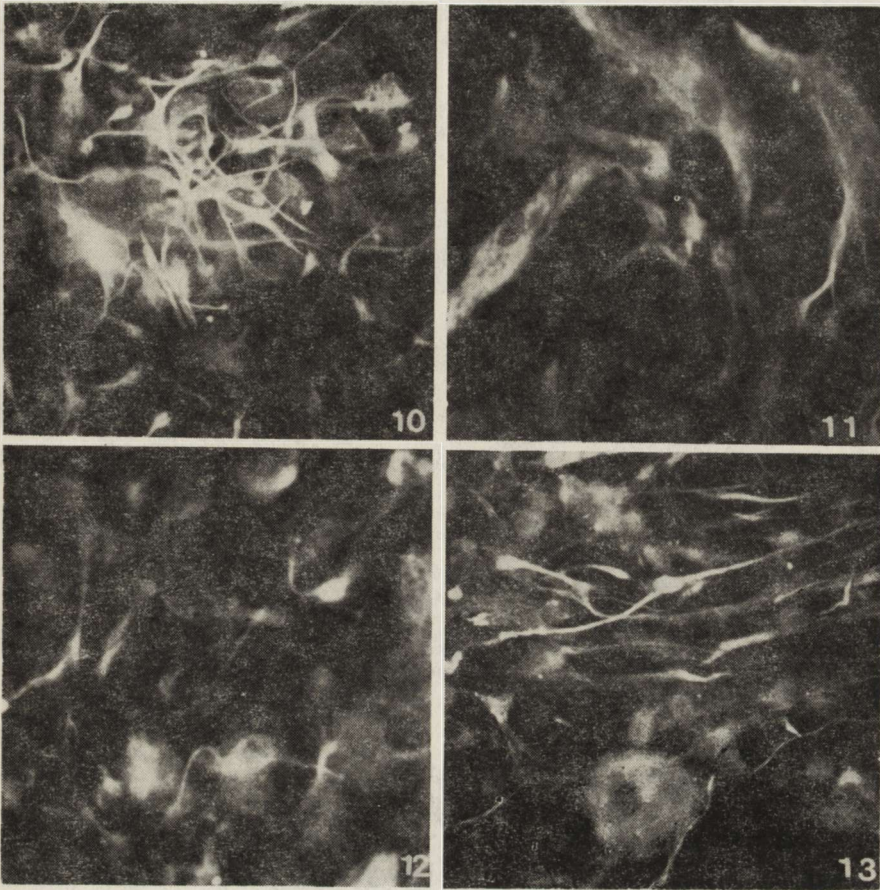
Fig. 7. Experimental culture, serum W., 17 DIV. Severely damaged astrocytes from outgrowth zone; some of them with intracytoplasmic vacuoles (arrow). Toluidine blue. \times 400

Ryc. 8. Hodowla doświadczalna, surowica W., 18 dni *in vitro*. Obficie nagromadzone komórki Alzheimer'a typu II w strefie wzrostu hodowli. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

Fig. 8. Experimental culture, serum W., 18 DIV. Abundant accumulation of Alzheimer, type II cells in the outgrowth zone. Toluidine blue. \times 400

Ryc. 9. Hodowla doświadczalna, surowica W., 19 dni *in vitro*. Komórka Opalskiego wśród obficie nagromadzonych komórek strefy wzrostu. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times

Fig. 9. Experimental culture, serum W., 19 DIV. Opalski cell in the outgrowth zone. Toluidine blue. \times 400



Ryc. 10. Hodowla doświadczalna, surowica B., 18 dni *in vitro*. Intensywna fluorescencja przerosłych astrocytów strefy wzrostu. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 10. Experimental culture, serum B., 18 DIV. Intense immunofluorescence reaction in hypertrophied astrocytes within outgrowth zone. GFAP. × 400

Ryc. 11. Hodowla doświadczalna, surowica D., 18 dni *in vitro*. Odczyn immunofluorescencji w przerosłych astrocytach, wykazujący związek z włóknistymi strukturami cytoplazmatycznymi. GFAP. Pow. 800 ×

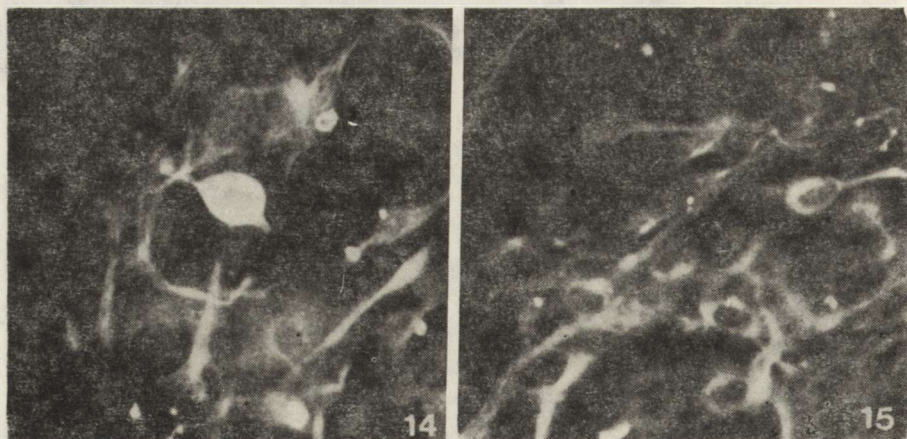
Fig. 11. Experimental culture, serum D., 18 DIV. Immunofluorescence reaction in hypertrophied astrocytes, connected with intracytoplasmic fibrillary structures. GFAP. × 800

Ryc. 12. Hodowla doświadczalna, surowica B., 19 dni *in vitro*. Słaby odczyn immunofluorescencyjny w uszkodzonych astrocytach pozbawionych wypustek. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 12. Experimental culture, serum B., 19 DIV. Weak immunofluorescence in damaged astrocytes deprived of cellular processes. GFAP. × 400

Ryc. 13. Hodowla doświadczalna, surowica W., 19 dni *in vitro*. Umiarkowany odczyn immunofluorescencyjny w komórce Opalskiego. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 13. Experimental culture, serum W., 19 DIV. Moderate immunofluorescence in Opalski cell. GFAP. × 400



Ryc. 14. Hodowla doświadczalna, surowica B., 19 *in vitro*. Silna fluorescencja w komórce przejściowej. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 14. Experimental culture, serum B., 19 DIV. Strong immunofluorescence in a transitory cell. GFAP. × 400

Ryc. 15. Hodowla doświadczalna, surowica W., 18 dni *in vitro*. Zmienne natężenie odczynu immunofluorescencyjnego w komórkach Alzheimerera typu II. GFAP. Pow. 400 ×

Fig. 15. Experimental culture, serum W., 18 DIV. Immunofluorescence reaction of varying intensity in Alzheimer type II cells. GFAP. × 400

skrawa fluorescencja ostro obrysowywała kontury perykarionalnej cytoplazmy i grubych wypustek (ryc. 10). W licznych hipertroficznym komórках gwiaździstych stwierdzało się związek świecenia z siatkowatymi lub pasmowatymi włóknistymi strukturami śródplazmatycznymi (ryc. 11). W przypadku komórek z cechami zwyrodnienia, a zwłaszcza z fragmentacją wypustek, odczyn immunofluorescencyjny był znacznie słabszy i bardziej zróżnicowany od wyraźnego do ledwie dostrzegalnego (ryc. 12). Komórki Opalskiego charakteryzowały się żywą fluorescencją (ryc. 13), która była jednakże mniej intensywna niż w przerosłych astrocytach. Nieco żywszy odczyn, zawsze o charakterze dyfuzyjnym lub ziarnistym, występował w komórkach przejściowych między uformowanymi komórkami Opalskiego i hipertroficznymi astrocytami (ryc. 14). Wyróżniały się one w stosunku do typowych komórek Opalskiego mniejszymi rozmiarami i obecnością resztkowych wypustek. Charakter odczynu immunofluorescencyjnego w komórkach Alzheimerera typu II wykazywał znaczne zróżnicowanie od ledwie dostrzegalnego do żywego świecenia, o zmiennej szerokości, otaczającego powiększone, zazwyczaj owalne jądra komórkowe (ryc. 15).

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki wskazują, że zastosowanie surowic od leczonych d-penicylaminą chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym pozwala na uzyskanie uszkodzeń gleju typowych dla gliopatii wilsonow-

skiej. Różnią się one jednak od zmian stwierdzanych w hodowlach z surowicami od chorych nieleczonych (Mossakowski i wsp. 1970; Mossakowski, Weinrauder 1984). Podstawowa różnica polega na przewadze uogólnionych procesów rozplemowych i przerostowych, przy znacznie mniej nasilonych nieswoistych zmianach zwyrodnieniowych i rzadkim występowaniu nieprawidłowych postaci astrocytów, typowych dla choroby Wilsona, takich jak komórki Alzheimerera typu II i komórki Opalskiego. Ogólny wzorzec zmian przypomina pod tym względem bardziej obraz ostrej encefalopatii wątrobowej u ludzi (Mossakowski i wsp. 1983) oraz wczesnej fazy encefalopatii wątrobowej u zwierząt doświadczalnych (Norenberg i wsp. 1972, 1974; Hilgier i wsp. 1983), niż nieprawidłowości typowe dla zaawansowanej choroby Wilsona. Zwraca przy tym uwagę obecność przerośniętych, hiperchromatynowych jąder glejowych, niespotykanych w poprzednich badaniach nad encefalopatią wilsonowską *in vitro* (Mossakowski i wsp. 1970).

Wydaje się, że stosunkowo niski stopień uszkodzenia astrocytów w porównaniu ze zmianami obserwowanymi w przypadku surowic od chorych nieleczonych wiązać należy z obniżoną zawartością miedzi we wszystkich użytych surowicach, niższą niż wartości kontrolne u ludzi zdrowych (norma laboratoryjna 85—120 µg/100). Zwraca równocześnie uwagę drastyczne obniżenie we wszystkich przypadkach, niezależnie od leczenia, aktywności ceruloplazminy (w przypadku jednego chorego do wartości nieoznaczalnych). Wskazuje to na możliwość przesunięcia proporcji miedzy miedzią związaną i wolną w surowicy. W warunkach prawidłowych miedź związana stanowi około 98% jej ogólnej zawartości w surowicy, podczas gdy miedź wolna nie przekracza 2—5%. W zaawansowanej chorobie Wilsona miedź wolna sięga wartości 40–60%. W tej sytuacji wydaje się prawdopodobne, iż mimo obniżenia bezwzględnej zawartości miedzi w stosowanych surowicach, wobec znacznego spadku aktywności ceruloplazminy, zawartość miedzi wolnej mogła być wystarczająca dla wywołania uszkodzeń komórkowych, choć mniej nasilonych, niż w przypadku surowic chorych nie leczonych. Ich nasilenie i typowość nie wykazywały przy tym zależności od bezwzględnej zawartości miedzi, lecz bardziej od aktywności ceruloplazminy, mimo iż nie stanowi ona wskaźnika stopnia wiązania miedzi. W dwóch przypadkach o jednakowym poziomie miedzi w surowicy bardziej nasilone i typowe zmiany komórkowe występowały przy nieoznaczalnej aktywności ceruloplazminy. Zależność ta zbieżna była z czasem trwania choroby i stopniem jej zaawansowania. Najbardziej charakterystyczne nieprawidłowości astrocytów znamionowały surowicę od pacjenta z najdłuższym wywiadem chorobowym, najmniej nasilone — z najkrótszym.

Badania immunomorfologiczne potwierdziły poprzednie spostrzeżenia, iż zmienione komórki glejowe zachowywały antygenowe właściwości astrocytów (Mossakowski, Weinrauder 1984). Wszystkie ich postaci wyka-

zywały obecność kwaśnego białka włókienek glejowych uznanego za swoisty znacznik komórek gleju gwiaździstego (Eng i wsp. 1971; Bignami i wsp. 1972; Ludwin i wsp. 1976).

Intensywność odczynu immunofluorescencyjnego była zróżnicowana w zależności od charakteru zmian strukturalnych. Była ona najwyższa w przerośniętych astrocytach, wykazując tu wyraźny związek z włóknistymi strukturami cytoplazmatycznymi oraz w komórkach Opalskiego. Była znacznie mniejsza w komórkach gwiaździstych z cechami zwyrodnienia, a w komórkach Alzheimerera typu II znamionowało ją znaczne zróżnicowanie od wyraźnego do śladowego.

To ostatnie zjawisko wymaga odrębnego omówienia w świetle spostrzeżeń Sobela i wsp. (1981) oraz Kimury i Budki (1984), którzy w materiale encefalopatii wątrobowej u ludzi stwierdzili całkowity brak odczynu z surowicami anti-GFAP. Pierwsi z nich fakt ten skłonni są wiązać z uszkodzeniem przez podstawowy czynnik (lub czynniki) patogenezyczny procesów syntezy białek w zmienionych astrocytach. Za interpretacją taką przemawiać mogą badania Albrechta (1981), który metodami biochemicznymi stwierdził upośledzenie syntezy RNA w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Morfologiczny charakter badań własnych ogranicza możliwość dyskusji nad tym mechanizmem. Wydaje się, że odmienność naszych spostrzeżeń może być uwarunkowana przez cały szereg czynników, w tym przede wszystkim charakter materiału — pozaustrojową hodowlę tkanki nerwowej, w której nie mamy do czynienia z komórkami Alzheimerera typu II występującymi w warunkach *in situ*, a jedynie z komórkami do nich morfologicznie podobnymi. Drugim czynnikiem, który należy brać pod uwagę jest stosowana technika odczynu immunomorfologicznego — fluorescencyjna w naszym przypadku, metoda PAP (peroksydaza-antyperoksydaza) w materiale zarówno Sobela i wsp. (1981), jak i Kimury i Budki (1984). Uwzględnić należy również fakt, że badania ich, prowadzone na materiale ludzkim, a Albrechta (1981) na materiale doświadczalnym, dotyczyły encefalopatii wątrobowej, podczas gdy w doświadczeniach własnych stosowano surowicę od chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym. Mimo zasadniczego podobieństwa, jeśli nie identyczności morfologicznej komórek Alzheimerera typu II w obu procesach chorobowych, różnice etiologiczne i patogenetyczne mogą wpływać na odrębności biologiczne strukturalnie identycznych form komórkowych. Rola tego czynnika wydaje się jednak drugorzędna, ponieważ w poprzednich badaniach wykazano obecność dodatniego odczynu immunohistochemicznego w komórkach Alzheimerera, typu II, uzyskanych zarówno z surowicami od chorych ze śpiączką wątrobową, jak i ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (Mossakowski, Weinrauder 1984).

W świetle tych spostrzeżeń wydaje się uzasadnione zwrócenie uwagi na fakt, iż nagie jądra, stanowiące zmienione patologicznie astrocy-

ty, w obrazie mikroskopowo-elektronowym charakteryzują się bardzo znacznym zubożeniem organelli cytoplazmatycznych (Norenberg, Lapham 1974; Norenberg 1977; Mossakowski i wsp. 1984). Niekiedy przybierają one postać powiększonych, ubogochromatynowych jąder zawieszonych w wodnistej cytoplazmie, całkowicie pozbawionej struktur subkomórkowych (Ostenda i wsp. 1976). Przekształcenie astrocytu w komórkę Alzheimera typu II jest procesem postępującym, stąd też mogą obok siebie występować komórki o różnym stopniu uszkodzenia struktur cytoplazmatycznych, co tłumaczyłoby zróżnicowanie odczynu ujawniającego GFAP, aż do jego całkowitego zaniku. Na taką możliwość wskazują badania immunomorfologiczne, przeprowadzone na autopsyjnym materiale przypadku choroby Wilsona, w których wykazano, że wśród przeważającej populacji nagich jąder z ujemnym odczynem na GFAP występują również dodatnie immunomorfologicznie typowe komórki Alzheimera typu II (Mossakowski, Weinrauder 1986).

Wysoco prawdopodobne jest przy tym współistnienie obu czynników: metabolicznego i strukturalnego, a nawet ich wzajemny związek przyczynowy.

Autorzy dziękują dr Elisabeth Bock z Protein Laboratory, Copenhagen University, za dostarczenie surowicy do badań.

ВЛИЯНИЕ СЫВОРОТКИ БОЛЬНЫХ, СТРАДАЮЩИХ ГЕПАТО-ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ И ПРОШЕДШИХ КУРС ЛЕЧЕНИЯ ПЕНИЦИЛАМИНОМ НА РАЗВИТИЕ *IN VITRO* ВИЛЬСОНОВОЙ ГЛИОПАТИИ

Резюме

Авторы исследовали влияние сывороток, полученных от больных, страдающих гепато-церебральной дегенерацией и прошедших курс лечения пеницилламином, на морфологическую и иммуноморфологическую картину органотипических культур нервной ткани. Для данных сывороток характерно значительное понижение как содержания меди, так и активности церулоплазмينا. Обнаружены существенные различия между воздействием данных сывороток и сывороток больных, не прошедших курса лечения. Различия заключались в более высоком содержании глиальных клеток и в преобладании гипертрофии астроцитов над их неспецифической дегенерацией. Выступали также патологические формы астроцитов, характерные для Вильсоновой глиопатии, как например, клетки Альцгеймера II типа и клетки Опальского. Интенсивность дегенеративных изменений и обилие голых ядер зависели от стадии болезни и степени падения активности церулоплазмينا в сыворотке. Все формы астроцитов, как с признаками гипертрофии, так и дегенерации, а также клетки Альцгеймера II типа и клетки Опальского проявляли положительную иммунофлуоресцентную реакцию на сыворотку, содержащую антитела к кислому фибриллярному белку (GFAP).

Авторы выдвигают предположение, что меньшая интенсивность патологических изменений в астроцитах по сравнению с воздействием сывороток, полученных от больных, не прошедших курса лечения, связана с более низким содержанием меди в примененных сыворотках. Однако сопутствующее падение активности церулоплазмينا привело к нарушению равновесия между связанной и свободной медью. В этих условиях содержание последней могло быть достаточно высоким, чтобы вызвать характерные повреждения астроцитов.

INFLUENCE OF SERA FROM PATIENTS WITH HEPATO-LENTICULAR
DEGENERATION TREATED WITH D-PENICILAMINE
ON THE DEVELOPMENT OF WILSONIAN GLIOPATHY *IN VITRO*

Summary

Studies on the influence of sera from patients with Wilson's disease treated with d-penicilamine upon morphology and immunomorphology of astrocytes in organotypic cultures of newborn rat cerebella were performed. The pathological sera applied were characterized by significant reduction of both copper level and ceruloplasmine activity. Remarkable differences were found as compared with the influence of sera from untreated patients. They consisted in greater cellularity of cultures and predominance of astrocytic hypertrophy over nonspecific cellular degeneration. However, astrocytic abnormalities, typical for Wilsonian gliopathy such as Alzheimer cells, type II and Opalski cells were also present.

Intensity of degenerative changes of astrocytes and frequency of Alzheimer cells type II and Opalski cells appearance were correlated with the advancement of the disease process and degree of ceruloplasmine activity reduction. All abnormal astrocytes both showing features of hypertrophy and degeneration gave positive immunofluorescent reaction with anti-GFAP serum. So did Alzheimer cells, type II and Opalski cells.

The authors supposed that less severe astrocytic abnormalities as compared with those obtained with sera from untreated patients were due to lowered copper content in sera used in present experiments. However, disturbed proportion between bound and free copper in sera resulting from reduction of ceruloplasmine activity could be responsible for the appearance of Wilsonian gliopathy features, even under conditions of lowered general content of copper.

PISMIENNICTWO

1. Albrecht J.: Cerebral RNA synthesis in experimental hepatic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.*, 1981, 6, 555—558.
2. Bignami A., Eng L. F., Dahl D., Uyeda C. T.: Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, 1972, 43, 420—435.
3. Eng L. F., VanderHaegen J. S., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351—354.
4. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
5. Kimura T., Budka H.: GFA and S-100 proteins in degenerative and neoplastic glial disease: a comparison by immunocytochemistry. Second European Conference for Neuropathology. Abstracts. Warsaw, September 20—22. 1984, p. 39.
6. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
7. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S-100 and GFAP proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase labelled antibodies. *J. Comp. Neurol.*, 1976, 165, 179—208.
8. Mossakowski M. J., Borowicz J. W., Hilgier W.: Electron microscopy of hepatogenic encephalopathy in rats induced by thioacetamide intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 185—195.

9. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Wpływ D-penicylaminy na obraz gliopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 57—74.
10. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Olejnik Z.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego w ostrym wirusowym zapaleniu wątroby. *Przegląd. Epidemiem.*, 1983, 37, 219—230.
11. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1970, 16, 1—16.
12. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 161—178.
13. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Glial fibrillary acidic protein and S-100 in abnormal astrocytes in Wilson's disease. *Neuropat. Pol.*, 1986 (w druku).
14. Norenberg M. D.: A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. *Lab. Invest.*, 1977, 36, 618—627.
15. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscope study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 422—435.
16. Norenberg M. D., Lapham L. W., Eastland M. W., May A. G.: Diffusion of protoplasmatic astrocytes in acute experimental hepatic encephalopathy. *Am. J. Path.* 1972, 67, 403—411.
17. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—354.
18. Sobel R. A., DeArmond S. J., Forno L. S., Eng L. F.: Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. An immunohistochemical study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1981, 40, 625—632.

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

ANNA TARASZEWSKA

MORFOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA
ZŁOGÓW SUDANOFILNYCH WYSTĘPUJĄCYCH W PRZEBIEGU
NIEPRAWIDŁOWEJ MIELINIZACJI U KRÓLIKA PT

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

Królik pt jest mutantem, u którego występuje genetycznie uwarunkowane zaburzenie procesu mielinogenezy powodujące hipomielinizację ośrodkowego układu nerwowego. W badaniach morfologicznych wykazano, że w porównaniu z normalnym przebiegiem mielinizacji u zdrowych królików, mielinizacja włókien u mutantu pt rozwija się z opóźnieniem, postępuje wolniej i jest przedłużona, a liczba zmielinizowanych włókien i grubość osłonek mielinowych jest zmniejszona (Taraszewska 1983; Zelman, Taraszewska 1984; Taraszewska, Zelman 1985). Nieprawidłowościom w obrazie mieliny towarzyszy ogólnie wzmożona glejoza komórkowa oraz ograniczone występowanie sudanofilnych złogów w istocie białej mózdku (Taraszewska, Zelman 1981).

W patologii ludzkiej przypadki genetycznych zaburzeń mielinizacji z obecnością sudanofilnych złogów w istocie białej zaliczane są do grupy tak zwanych leukodystrofii sudanofilnych. Istnieje ogólny pogląd, że w tej grupie leukodystrofii gromadzenie sudanofilnych produktów jest następstwem rozpadu nieprawidłowo tworzonych osłonek mielinowych z zachowaniem normalnego katabolizmu mieliny do stadium tłuszczów obojętnych i tym samym jest wynikiem demielinizacji nakładającej się na proces dysmielinizacji (Poser 1968; Seitelberger 1981). Z drugiej strony wiadomo, że leukodystrofie sudanofilne stanowią niejednorodną grupę schorzeń dysmielinizacyjnych różniących się pod względem genetycznym, klinicznym i patologicznym, a ich klasyfikacja patogenetyczna pozostaje problemem otwartym.

Poniższe badania, dotyczące występowania sudanofilnych złogów u mutantu pt, wskazują na inny patomechanizm ich powstawania niż w klasycznych leukodystrofiach sudanofilnych. Celem niniejszej pracy jest morfologiczna ocena zjawiska gromadzenia sudanofilnych tłuszczów i ich znaczenia w patologii mielinizacji u królika pt.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 72 królikach pt w wieku od 2 tygodnia do 2 roku życia z typowymi objawami klinicznymi choroby oraz na 18 królikach kontrolnych zdrowych w tym samym przedziale wieku (tab. 1). Zwierzęta usypiano Eunarconem lub wodzianem chloralu i wykonywano perfuzję roztworem 10% formaliny w 0,9% NaCl, a w przypadkach przeznaczonych do badań mikroskopowo-elektronowych 3,9% aldehydem glutarowym w buforze fosforanowym. Po utrwaleniu materiału we wszystkich przypadkach pobierano wycinki z rdzenia, opuszki, półkul mózgu na poziomie torebki wewnętrznej oraz z półkul mózdzku. Skrawki mrozkowe barwiono sudanem III i sudanem czarnym B. Część skrawków zawierających materiał sudanofilny barwiono dodatkowo błękitem Nilu oraz błękitem alcjanowym z odczynem PAS.

Do badań w mikroskopie elektronowym pobrano materiał z istoty białej mózdzku od 10 królików pt w wieku od 6 tygodni do 3 miesięcy życia. Materiał utrwalony aldehydem glutarowym i czterotlenkiem osmu przeprowadzono w sposób standardowy przez alkohole i zatapiano w Eponie 812. Półcienkie skrawki eponowe barwiono 1% błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Skrawki ultracienkie kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu oraz fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM-100B lub JEM-7A.

WYNIKI

Na skrawkach barwionych sudanem III i sudanem czarnym B u większości królików pt w wieku od 4 tygodni do 4 miesięcy życia stwierdzono obecność licznych sudanofilnych złogów w istocie białej mózdzku (tab. 1, ryc. 1). Złogi te barwiły się również błękitem Nilu, natomiast nie barwiły się błękitem alcjanowym i metodą PAS. W innych obszarach mózgu sudanofilny materiał nie występował wcale lub znajdowano tylko nieliczne, pojedynczo rozsiane krople lipidowe w niektórych strukturach istoty białej, jako konary mózdzku dolne, pasmo rdzeniowe n. V, torebka wewnętrzna i *centrum semiovale*. U królików kontrolnych zdrowych barwienia sudanem były negatywne w całym badanym materiale.

Częstość występowania sudanofilnych złogów w istocie białej mózdzku królików pt była różna w zależności od wieku zwierząt. Z danych przedstawionych w tabeli 1 wynika, że złogi te znajdowano u pojedynczych królików 2-tygodniowych, natomiast u królików 4-tygodniowych występowały one we wszystkich badanych przypadkach, a u królików w wieku od 1 do 4 miesiąca życia były obecne w około 80% przypadków. U dorosłych królików pt powyżej 1 roku życia nie stwierdzono sudanofilnych produktów w istocie białej mózdzku, natomiast u królików

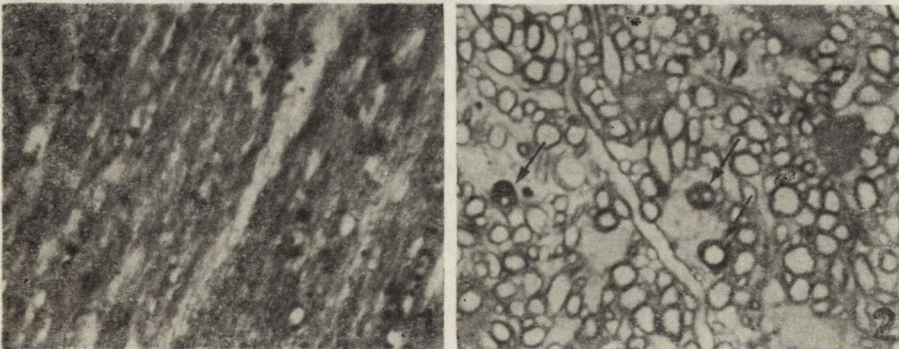
Tabela 1. Częstość występowania złogów sudanofilnych w istocie białej mózdzku królików pt w zależności od wieku zwierząt

Table 1. Occurrence of sudanophilic deposits in cerebellar white matter of pt rabbits depending on animals' age

Wiek Age	Króliki pt pt rabbits			Króliki kontrolne Control rabbits	
	liczba przypadków number of cases	przypadki ze złogami sudanofilnymi cases with sudanophilic deposits	liczba number %	liczba przypadków number of cases	przypadki ze złogami sudanofilnymi cases with sudanophilic deposits
2-3 tyg. weeks	8	2 (2)*	25	4	—
4 tyg. weeks	7	7 (3)	100	2	—
>1-4 mies. months	40	32 (10)	80	6	—
6-12 mies. months	7	2 (2)	28,5	3	—
>1 rok year	10	—	0	3	—
Ogółem Total	72	43	60	18	0

* W nawiasach podano liczby przypadków, w których złogi sudanofilne były nieliczne i słabo barwiły się sudanem III

* In parentheses number of cases is given, in which sudanophilic deposits were not numerous and weakly stained with Sudan III

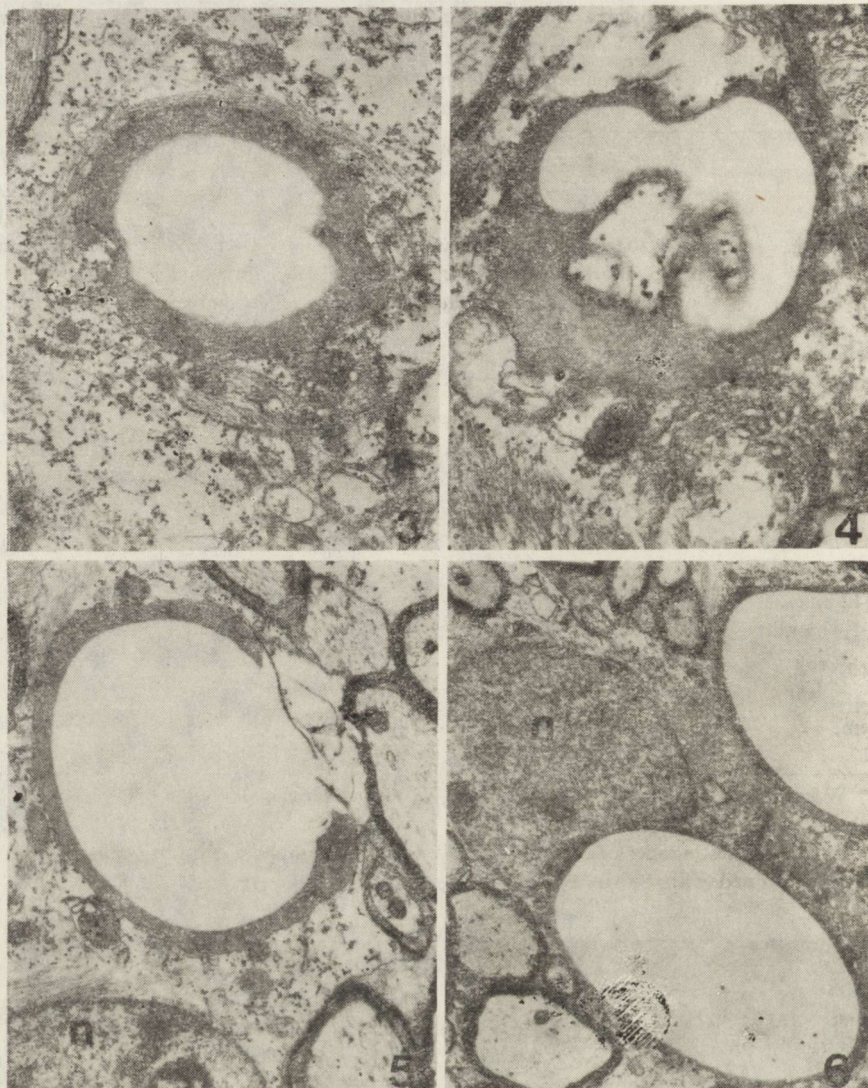


Ryc. 1. Złogi sudanofilne w istocie białej mózdzku u 2-mies. królika pt. Skrawek mrozikowy. Sudan czarny B. Pow. 200 ×

Fig. 1. Sudanophilic deposits in cerebellar white matter in 2-month-old pt rabbit. Frozen section. Sudan black B. × 200

Ryc. 2. Duże wielkości włókien nerwowych, krople lipidowe w pobliżu jądra komórki astrocytarnej i wśród włókien istoty białej mózdzku (strzałki). Skrawek eponowy. Błękit toluidyny. Pow. 1200 ×

Fig. 2. Lipid droplets with the size as large as that of nerve fibres near astrocyte nucleus and among nerve fibres (arrows) in cerebellar white matter. Epon section. Toluidine blue. × 1200



Ryc. 3. Kropla lipidowa o średnicy 4 μm w poszerzonej wypustce astrocytarnej. Widoczna warstwa homogennej substancji o średniej gęstości elektronowej na obwodzie kropli i optycznie pusta część środkowa. Pow. 13.500 \times

Fig. 3. Lipid droplet with the diameter of 4 μm in enlarged astrocytic process. The droplet consists of an outer layer of moderately electron-dense homogenous substance and of empty-looking inner part. \times 13 500

Ryc. 4. Kropla lipidowa o średnicy 2,5 μm w wypustce astrocytarnej zawierającej liczne organelle cytoplazmatyczne. Obwodowa warstwa homogennej substancji nierówna z nieregularnymi odnogami wewnątrz optycznie pustej przestrzeni środkowej. Pow. 23 000 \times

Fig. 4. Lipid droplet with the diameter of 2.5 μm in astrocytic process rich in cytoplasmic organellae. Outer layer of homogeneous substance irregular with extensions into empty-looking inner part of the droplet. \times 23 000

Ryc. 5. Kropla lipidowa o średnicy 5 μm w części perykariarnej astrocyta. Na obwodzie kropli półkolistą nieciągłą warstwą substancji lipidowej. N — jądro komórkowe. Pow. 10 000 \times

w wieku od 6 do 12 miesiąca życia znaleziono skąpy i słabo barwiący się materiał lipidowy tylko w 2 przypadkach na 8 przebadanych.

Częstość występowania sudanofilnych złogów w grupie królików w wieku od 1 do 4 miesiąca życia była różna w zależności od nasilenia klinicznych objawów choroby (tab. 2). Sudanofilny materiał stwierdzono

Tabela 2. Częstość występowania złogów sudanofilnych w istocie białej mózdzku u królików pt w zależności od nasilenia objawów klinicznych

Table 2. Occurrence of sudanophilic deposits in cerebellar white matter of pt rabbits depending on severity of clinical symptoms

Wiek Age	Objawy kliniczne clinical symptoms	Liczba przypadków number of cases	Króliki ze złogami sudanofilnymi Rabbits with sudanophilic deposits	
			liczba number	%
mies. >1-4 months	porażenia paralysis	24	22	91,7
mies. >1-4 months	niedowłady paresis	16	10	62,5
	Ogółem Total	40	32	80,0

u ponad 90% zwierząt z ciężkim przebiegiem klinicznym choroby, charakteryzującym się rozwojem porażen spastycznych oraz w 62% przypadków bez porażen, a tylko z niedowładami kończyn.

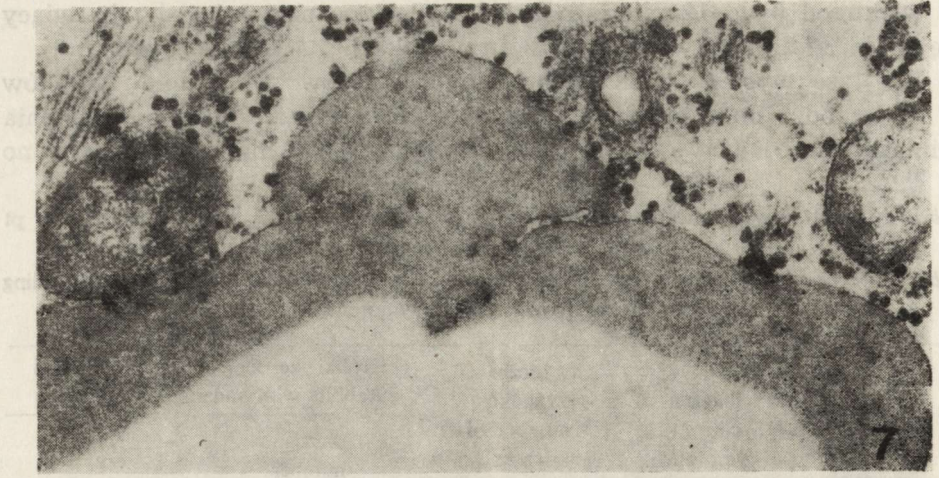
Dziesięć królików z porażeniami kończyn użyto do badań mikroskopowo-elektronowych. We wszystkich tych przypadkach barwienie sudanem III i sudanem czarnym B wykazało obecność sudanofilnych złogów w istocie białej mózdzku (ryc. 1). Na półcienkich skrawkach eponowych złogi te wybarwiały się intensywnie błękitem toluidyny i miały wygląd dużych, częściowo wypłukanych kropli lipidowych, rozmieszczonych między włóknami nerwowymi lub w komórkach astrogleju (ryc. 2).

W obrazie mikroskopowo-elektronowym znajdowano je wyłącznie w cytoplazmie astrocytów włóknistych, zarówno w wypustkach, jak i w części perykaryalnej komórek, gdzie występowały pojedynczo lub

Fig. 5. Lipid droplet with the diameter of 5 μm in perikaryal part of the astrocyte. At the droplet periphery semicircular layer of lipid substance. N — cell nucleus. $\times 10\ 000$

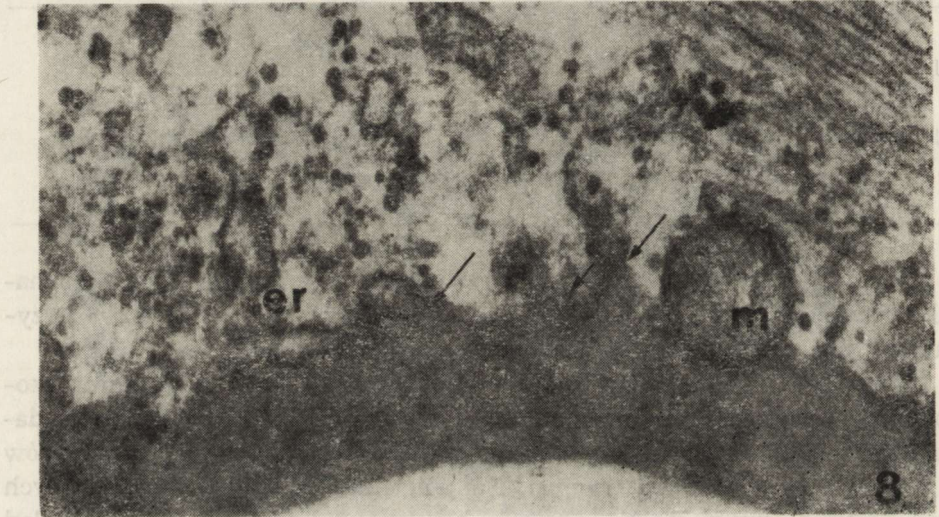
Ryc. 6. W części perykaryalnej astrocyta dwie krople lipidowe o średnicy około 7 μm , z bardzo wąską obwodową warstwą substancji lipidowej. W cytoplazmie duże zagęszczenie włókienek glejowych. N — jądro komórkowe. Pow. 5 400 \times

Fig. 6. In perikaryal part of astrocyte two lipid droplets with the diameters of about 7 μm , with very narrow outer layer of lipid substance. In the cytoplasm great density of glial filaments. N — cell nucleus. $\times 5\ 400$



Ryc. 7. Homogenna drobnoziarnista substancja tworząca obwodową warstwę kropli lipidowej. Na jej powierzchni cytoplazmatycznej widoczne cienkie pasemko o zwiększonej gęstości elektronowej, brak natomiast otaczającej błony plazmatycznej. Pow. 50 000 \times

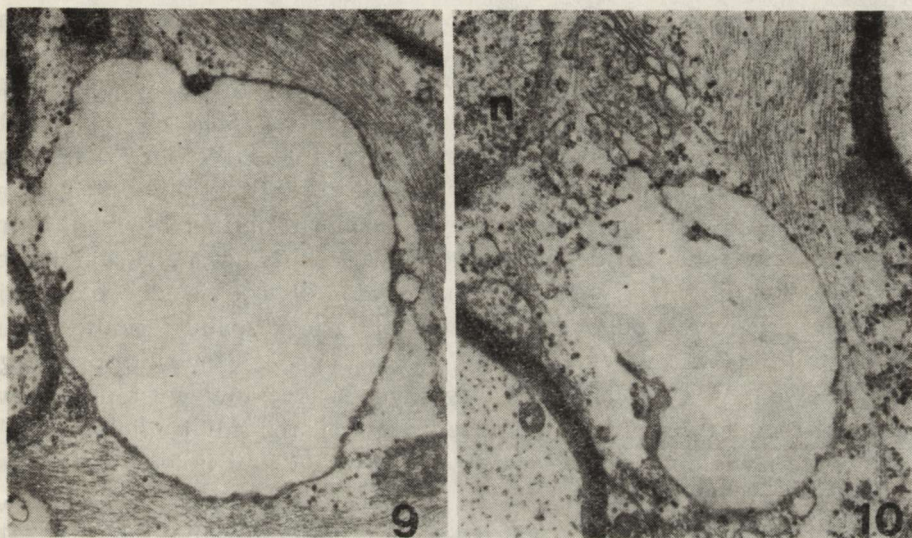
Fig. 7. Homogenous fine-granular substance of the outer layer of a lipid droplet. On its cytoplasmic surface thin strip with higher electron density, but there is not limited plasma membrane. \times 50 000



Ryc. 8. Ziarnista siateczka śródplazmatyczna (er), mitochondrium (m) i ziarna glikogenu (g) przylegają bezpośrednio do powierzchni substancji lipidowej. Widoczne wypustki kształtem przypominające kanały siateczki śródplazmatycznej oraz połączenie substancji lipidowej z siateczką śródplazmatyczną (strzałki). Pow. 72 000 \times

Fig. 8. Granular endoplasmic reticulum (er), mitochondrium (m) and glycogen granules (g) adjoining directly the surface of lipid substance. Extensions of this surface have configuration similar to endoplasmic reticulum channels and join the endoplasmic reticulum (arrows) \times 72 000

po kilka obok siebie (ryc. 3, 4, 5, 6). Wielkość ich dochodziła do kilku μm średnicy i często dorównywała wielkości jądra komórkowego (ryc. 5, 6). Część zewnętrzną kropli lipidowych stanowiła homogenna, drobnoziarnista substancja o średniej gęstości elektronowej, tworząca różnej grubości, mniej lub bardziej regularną warstwę wokół optycznie pustej przestrzeni środkowej (ryc. 3, 4). Substancja lipidowa tworzyła ciekłą warstewkę o zwiększonej gęstości elektronowej, graniczącą bezpośrednio z cytoplazmą, nie była natomiast otoczona błoną plazmatyczną (ryc. 7, 8). Mitochondria, kanały siateczki śródplazmatycznej, włókienka glejowe i ziarna glikogenu przylegały bezpośrednio do powierzchni kropli lipidowych (ryc. 3 i 7). Niekiedy obserwowano połączenie ziarnistej siateczki śródplazmatycznej z substancją lipidową (ryc. 8).



Ryc. 9. W wypustce astrocytarnej zawierającej liczne włókienka glejowe widoczna optycznie pusta przestrzeń otoczona wąskim rąbkiem homogennej substancji lipidowej. Pow. 19 200 \times

Fig. 9. Empty-looking space surrounded by narrow rim of homogenous lipid substance in astrocytic process with great density of glial filaments. \times 19 200

Ryc. 10. Wąski rąbek homogennej substancji lipidowej wokół optycznie pustej przestrzeni w cytoplazmie astrocyta. N — jądro komórkowe. Pow. 19 200 \times

Fig. 10. Narrow rim of homogenous lipid substance around empty-looking space in cytoplasm of an astrocyte. N — cell nucleus. \times 19 200

U 3-miesięcznych królików ilość zachowanej substancji lipidowej zmniejszała się i w wielu kroplach lipidowych widoczny był bardzo wąski jej rąbek wokół optycznie pustej szerokiej przestrzeni środkowej (ryc. 9, 10). Warstwa homogennej substancji zajmowała często tylko część obwodu wypłukanych kropli lipidowych, które przedstawiały się jako optycznie pusta przestrzeń w cytoplazmie (ryc. 10). W całym ba-

danym materiale królików pt astrocyty włókniste wykazywały przerost cytoplazmy, zarówno części perykariowej, jak i wypustek komórkowych i bogatą zawartość organelli cytoplazmatycznych, ziaren glikogenu i włókienek glejowych (ryc. 3, 4, 5). Szczególnie duże pomnożenie i zagęszczenie włókienek glejowych w cytoplazmie astrocytów obserwowano u królików 3-miesięcznych (ryc. 6, 9, 10).

OMÓWIENIE

Złogi sudanofilne obserwowane u królików pt w astrocytach istoty białej mózdzku przedstawiają typowy obraz śródcytoplazmatycznego gromadzenia tłuszczów obojętnych w postaci elektronowo-jasných, częściowo wypłukanych kropli lipidowych, leżących wolno w cytoplazmie bez otaczającej błony plazmatycznej. Morfologicznie nie różnią się one od drobnych kropli lipidowych powstających w wyniku fagocytozy produktów rozpadu mieliny w różnych komórkach istoty białej, w tym także i w astrocytach włóknistych (Vaughn, Pease 1970; Vaughn i wsp. 1970). W niektórych doświadczalnych modelach zwyrodnienia Wallera stwierdzano bardzo dużą aktywność fagocytarną astrocytów (Fernando 1973; Goncerzewicz 1982) z obecnością w ich cytoplazmie kropli lipidowych, które osiągają niekiedy bardzo duże rozmiary (Lassmann i wsp. 1978), podobnie jak krople lipidowe w naszym materiale. Uważa się, że pojawienie się kropli lipidowych odpowiada końcowej fazie rozpadu lipidów mieliny do stadium estrów cholesterolu, jednak proces ten nie przebiega jednocześnie w cytoplazmie reaktywnych astrocytów występują równocześnie różne typy wtrętów z fragmentami rozpadłej mieliny, ciała blaszkowate i wielopostaciowe ciała gęste z wakuolami lipidowymi (Lassmann i wsp. 1978).

W badanym materiale królików pt nie obserwowano tego rodzaju produktów rozpadu mieliny towarzyszących bezpośrednio kroplom lipidowym. Z przedstawionych badań wynika natomiast, że występowanie sudanofilnych złogów u mutantów pt czasowo wiąże się z okresem mielinizacji i jest najczęstsze u królików 1-miesięcznych, utrzymuje się w wysokim odsetku przypadków do 4 miesiąca życia, a następnie wyraźnie zmniejsza się i zanika u zwierząt powyżej 6 miesiąca życia, tj. po okresie aktywnego rozwoju i dojrzewania mieliny, który u normalnych królików kończy się około 5 miesiąca życia (Almeida, Pearse 1958).

U królika pt zmiany występujące w czasie mielinizacji aksonów polegają na osłabieniu procesu tworzenia i przyrostu osłonek mielinowych (Taraszewska 1983; Taraszewska, Zelman 1985) oraz na obniżeniu zawartości lipidów mieliny i zmniejszeniu syntezy glikolipidów (Domańska-Janik i wsp. 1984). W tym okresie zaburzeń mielinizacji pojawiają się też złogi tłuszczowe, które następnie zanikają wraz z zaawansowaniem i ustaniem czynnego procesu tworzenia mieliny. Powstawanie ich nie

może być więc traktowane jako wynik rozpadu mieliny lecz wydaje się związane przyczynowo z upośledzeniem mielinogenezy. Zaburzenie procesu mielinizacji u mutantu pt charakteryzuje różny stopień nasilenia zmian w obrazie mieliny u poszczególnych zwierząt, któremu odpowiada zróżnicowany przebieg kliniczny choroby (Zelman, Taraszewska 1984). Obecne badania wskazują również na indywidualne różnice w ilości i występowaniu sudanofilnych złogów oraz na zależność między częstością ich występowania a nasileniem klinicznych objawów choroby.

Przedstawione wyniki przemawiają więc za istnieniem związku między nieprawidłowym przebiegiem mielinizacji i gromadzeniem sudanofilnych tłuszczów u królików pt. Pochodzenie tłuszczów odkładanych w cytoplazmie astrocytów i przyczyny wybiórczego nasilenia tego procesu w istocie białej mózdzku nie są znane. Nie wiadomo, czy tłuszcze te stanowią materiał niewykorzystany w procesie upośledzonej mielinogenezy czy wtórny produkt zmienionej aktywności metabolicznej odczynowych astrocytów. W obrazie ultrastrukturalnym wykazują one cechy substancji wytwarzanej lub metabolizowanej śródkomórkowo (Fawcett 1966), przypuszczalnie przy udziale ziarnistej siateczki śródplazmatycznej, która łączy się niekiedy bezpośrednio z kroplami lipidowymi (ryc. 8). Vaughn i wsp. (1970) również zwracają uwagę na powiązanie ziarnistej siateczki śródplazmatycznej z kroplami lipidowymi występującymi w zwyrodnieniu Wallera i sugerują, że może to świadczyć o pośrednim tworzeniu kropli lipidowych z kwasów tłuszczowych syntetyzowanych przez komórki z produktów rozpadu tkanki.

Gromadzenie sudanofilnych tłuszczów, niezwiązane z procesami fagocytozy, występuje w istocie białej mózgu we wczesnym okresie mielinogenezy u człowieka (Mickel, Gilles 1970; Jellinger i wsp. 1971) oraz w mózgach normalnie rozwijających się szczurów (Ferrer, Sarmiento 1981). Mickel i Gilles (1970) uważają, że przejściowa obecność sudanofilnych kropli w nie zróżnicowanych komórkach glejowych mózgu u człowieka jest fizjologicznym zjawiskiem związanym z lipidogenezą mieliny. Krople te, zawierające estry cholesterolu, mogą stanowić ważne źródło kwasów tłuszczowych dla syntezy lipidowych kompleksów mieliny. Materiał lipidowy niewykorzystany do syntezy mieliny jest gromadzony okołonaczyniowo i stopniowo zanika po 6 miesiącach życia (Jellinger i wsp. 1971). W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono danych o występowaniu podobnego zjawiska u królika, natomiast w badaniach własnych obecność sudanofilnych tłuszczów stwierdzano wyłącznie u chorych królików pt w okresie mielinizacji aksonów. Występowały one w komórkach astrogleju z wybiórczym nasileniem w istocie białej mózdzku. Wydaje się, że obecność kropli lipidowych w komórkach astrogleju ma inne znaczenie niż opisane również u królika pt komórki tzw. trzeciego typu neurogleju obładowane kroplami tłuszczowymi (Taraszewska 1983).

W materiale ludzkim patologiczne odkładanie sudanofilnych tłuszczów

w istocie białej niedojrzałych mózgow opisywano jako tzw. tłuszczowe zmiany neurogleju (neuroglial fatty metamorphosis) (Leech, Alvord 1974; Schneider i wsp. 1976). Schneider i wsp. (1976) w badaniu ultrastrukturalnym wykazali, że krople tłuszczowe gromadzone są głównie w komórkach astrogleju charakteryzujących się cechami przerostu. Zmiany te mogą być odwracalne, występują wybiórczo tylko w niektórych obszarach istoty białej i przypuszczalnie stanowią wykładnik zaburzeń metabolicznych wywołanych wczesnym uszkodzeniem niedojrzałych komórek astrogleju. Wymienieni autorzy nie dopatrują się związku między gromadzeniem tych tłuszczów a procesem mielinizacji, ale stwierdzają częste występowanie tłuszczowych zmian gleju w *leucoencephalopathia perinatalis telencephalica*, co tłumaczą przez pośredni wpływ tych zmian na proces różnicowania i dojrzewania oligodendrocytów.

Sudanofilne złogi u mutantu pt mają wiele cech typowych dla zmian tłuszczowych gleju. Przedstawione badania sugerują równocześnie zależność przyczynową między opisanymi zmianami i zaburzeniami mielinizacji, nie wyjaśniają natomiast czy zmiany w astrocytach są pierwotne czy wtórne do zaburzeń procesu mielinogenezy. Podobny rodzaj sudanofilnych złogów, odpowiadający zmianom tłuszczowym neurogleju opisano w astrocytach istoty białej w zespole mózgowo-wątrobowo-nerkowym Zellwegera u człowieka, zaliczanym do grupy leukodystrofii sudanofilnych (Liu i wsp. 1976; Agamanolis, Patre 1979). Określenie zmian metabolicznych w astrogleju, towarzyszących nieprawidłowej mielinogenezie u mutantu pt i prowadzących do odkładania sudanofilnych tłuszczów w ich cytoplazmie wymaga dalszych badań. Mogą one mieć również znaczenie dla lepszego poznania roli astrogleju w procesie prawidłowej mielinizacji.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СУДАНОФИЛЬНЫХ ОТЛОЖЕНИЙ НАБЛЮДАЮЩИХСЯ В ХОДЕ НЕПРАВИЛЬНОЙ МИЕЛИНИЗАЦИИ У КРОЛИКА pt

Резюме

У кролика pt с гипомиелинизацией центральной нервной системы обнаружены суданофильные отложения, скапливающиеся селективно в белом веществе мозжечка. Проведен анализ срезов белого вещества головного мозга, мозжечка и спинного мозга у кроликов pt с клиническим синдромом и у контрольных животных в возрасте от 2 недель до 2 лет. Окраска суданом III и чёрным суданом Б дала отрицательный результат у всего контрольного материала. У кроликов pt наличие суданофильных отложений зависело от возраста и интенсивности клинического синдрома. Отложения обнаружены у всех кроликов в возрасте 4 недель и у 80% — от 1 до 4 месяцев. У кроликов pt в возрасте 2 и 3 недель, а также от 6 месяцев до 1 года суданофильный материал присутствовал соответственно в 25% и 28% случаев. У кроликов pt старше 1 года суданофильный материал отсутствовал. Суданофильные отложения выступают в 91,7% случаев у кроликов в возрасте от 1 до 4 месяцев при тяжелых клинических формах заболевания и в 62,5% случаев у кроликов такого же возраста, но с более легким течением болезни.

Электронномикроскопические исследования показали присутствие в белом веществе мозжечка крупных липидовых капель, не ограниченных пленкой, свободно покоящихся в цитоплазме гипертрофических астроцитов. Ультраструктура капель типична для внутрицитоплазматического скопления нейтральных жиров.

На основании данных исследований можно высказать предположение о наличии причинной зависимости между скоплением суданофильных жиров в клетках астроглии и нарушениями миелиногенеза у кролика pt.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF SUDANOPHILIC DEPOSITS APPEARING IN THE COURSE OF ABNORMAL MYELINATION IN PT RABBIT

Summary

In rabbit pt, a mutant with the CNS hypomyelination sudanophilic deposits were encountered localized selectively in the cerebellar white matter.

Investigations were performed on sections from cerebral, and cerebellar white matter and spinal cord of rabbits pt in the age from 2 weeks up to 2 years and on control healthy rabbits of the same age.

Sudan III and sudan black B staining were negative in all control animals. Sudanophilic deposits were found in the cerebellar white matter of all examined 4-week-old pt rabbits and in 80% in the group of 1-4-month-old pt rabbits. In the 2- and 3-week old mutants and in pt rabbits from 6 months up to 1 year of age sudanophilic material was found in 25% and 28% of cases respectively. No sudanophilic deposits were found in pt rabbits older than 1 year of age.

Sudanophilic deposits were encountered in 91.7% of 1-4-month-old pt rabbits with severe course of the disease and in 62.5% of mutants in the same age in which clinical symptoms were less severe.

Electron microscopic study of the cerebellar white matter revealed the presence of large lipid droplets without limiting plasma membranes lying freely in the cytoplasm of the hypertrophic astrocytes. Ultrastructural features of the lipid droplets were typical of intracytoplasmic neutral fat accumulation.

The author suggests the relationship between accumulation of sudanophilic lipids in the astroglial cells and abnormal myelination in the pt rabbit.

PIŚMIENICTWO

1. Agamanolis D. P., Patre S.: Glycogen accumulation in the central nervous system in the cerebro-hepato-renal syndrome. Report of a case with ultrastructural studies. *J. Neurol. Sci.*, 1979, 41, 325—342.
2. Almeida D. F. de, Pearse A. G. E.: Comparative histochemistry of lipids in relation to myelination in rabbit brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 132—138.
3. Domańska-Janik K., Wikieł A., Zelman I., Strosznajder J.: Developmental changes in brain lipids of a myelin-deficient mutant pt rabbit. Annual Conference of Polish Neuropathologists and the joined meeting with the Association of Neuropathologists of the GDR, Kraków 3—5 Maj, 1984 (Abst.).
4. Fawcett D. W.: An atlas of the fine structure. The cell, its organelles and inclusions. Saunders, Philadelphia, 1966, pp. 308, 396—405.
5. Fernando D. A.: An electron microscopic study of the neuroglial reaction in Wallerian degeneration of the corticospinal tract. *Acta anat.* 1973, 86, 459—473.

6. Ferrer I., Sarmiento J.: Lipid inclusions in the telencephalic neuroglia of the developing rat. *J. Hirnforsch.*, 1981, 22, 307—312.
7. Goncerzewicz A.: Electron microscopic study of astrocytic reaction in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 47—60.
8. Jellinger K., Seitelberger F., Kozik M.: Perivascular accumulation of lipids in the infant human brain. *Acta neuropath.*, (Berl.) 1971, 19, 331—342.
9. Lassmann H., Ammerer H. P., Kulnig W.: Ultrastructural sequence of myelin degradation. I. Wallerian degeneration in the rat optic nerve. *Acta neuropath.*, (Berl.), 1978, 44, 91—102.
10. Leech R. W., Alvord E. C. Jr.: Glial fatty metamorphosis — An abnormal response of the premyelin glia frequently accompanying periventricular leukomalacia. *Am. J. Path.*, 1974, 74, 603—612.
11. Liu H. M., Bangaru B. S., Kidd J., Boggs J.: Neuropathological considerations in cerebro-hepato-renal syndrome (Zellweger's syndrome). *Acta neuropath.* (Berl.), 1976, 34, 115—123.
12. Mickel H. S., Gilles F. H.: Changes in glial cells during human telencephalic myelinogenesis. *Brain*, 1970, 93, 337—346.
13. Poser C. M.: Diseases of the myelin sheath. The leukodystrophies. In: *Pathology of the nervous system*. Ed. J. Minckler, New York. Mc Grav-Hill Book Co., 1968, vol. 1. s. 767—821.
14. Schneider H., Sperner J., Dröszus J. U., Schachinger H.: Ultrastructure of the neuroglial fatty metamorphosis (Virchow) in the perinatal period. *Virchows Arch. A. Path. Anat. and Histol.*, 1976, 372, 183—194.
15. Seitelberger F.: Dysmyelination and leukodystrophy in early age. *Proc. of International symp. on the leucodystrophy and allied disease*. Kyoto, Sept., 19—20, 1981 (odbitka).
16. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt na podstawie badań rdzenia kręgowego w mikroskopie elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 327—342.
17. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka topografii zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441—459.
18. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 219—227.
19. Vaughn J. E., Hinds P. L., Skoff R. P.: Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. I. The multipotential glia. *J. Comp. Neurol.*, 1970, 140, 175—206.
20. Vaughn J. E., Pease D. C.: Electron microscopic studies of Wallerian degeneration in rat optic nerves. II. Astrocytes, oligodendrocytes and adventitial cells. *J. Comp. Neurol.*, 1970, 140, 207—226.
21. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mielin u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205—218.

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

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAŁMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
ALEKSANDER PIECHOWSKI, JANINA STANISŁAWSKA,
DANUTA TALKOWSKA, JADWIGA PANKRAC

EFFECT OF TET INTOXICATION ON THE PATTERN
OF MYELIN LIPIDS IN RATS KEPT DURING
THE DEVELOPMENT ON A DIET WITH VARIOUS AMOUNTS
OF LIPIDS *

Department of Neurology, Medical School, Poznań

Qualitative or quantitative dietary lipid deficiencies during development, essentially due to the shortage of polyunsaturated fatty acids, caused a delayed maturation of the central nervous system and also some irreversible changes in various cerebral structures including myelin sheaths (White et al. 1971; Wiggins et al. 1978). Lately Fuller and Wiggins (1984) have found that brain proteolipid synthesis and its subsequent incorporation into the myelin membrane is greatly depressed in the case of postnatal undernourishment of rats, indicating that undernutrition, by inhibition of synthesis of brain myelin proteins and lipids, results in myelin deficit.

In our earlier studies (Wender et al. 1983a, c) we found that a fatty acid deprived diet during the development of rat produces a reduction of some myelin lipids with an altered composition of their fatty acids. Thus, in these experimental conditions a chemically malformed myelin membrane developed, with an aberrant pattern of fatty acids in individual lipid fractions. An overdue supply of fatty acids in the diet, in the course of development, leads to production of a myelin membrane only slightly overloaded with lipid components and without any changes in the pattern of fatty acids of the individual myelin lipids (Wender et al. 1983b, 1985b). The studies of Bourre et al. (1984) demonstrated that the influence of a diet devoid of n-3 fatty acids is very generalized, producing alterations in the fatty acid composition of rat brain cells

* Investigations were supported by the Research Grant 10.4.06.3.2 of Polish Academy of Sciences.

(neurons, astrocytes and oligodendrocytes) and also of some subcellular fractions (myelin and synaptosomes).

The problem of the effect of modifications in the chemical pattern of the myelin membranes evoked by an unsuitable diet on the susceptibility of myelin to the action of noxious agents and subsequently on the course of demyelinating processes in the central nervous system is almost unknown. Our studies (Wender et al. 1985a) have shown, that the changed lipid composition of myelin induced by the undue or overdue content of fatty acids in the diet during development of animals decreases the immunological reactivity to encephalitogenic antigen, decreasing the incidence of EAE. We have further found that these changes in the diet during brain maturation influence only insignificantly the reaction of myelin lipids to cyanide intoxication (Wender et al. 1986).

Following this experimental line we have performed experiments with triethyltin sulfate intoxication, provoking selective lesions of the white matter, with formation of spongy changes inside the myelin sheaths.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white Wistar rats of both sexes, weighing 200–250 g. Experimental animals were injected intraperitoneally, with 4 mg triethyl tin sulfate (TET) per kg of body weight. The animals were sacrificed 5 hrs, 24 hrs and 28 days following TET administration, respectively.

The above mentioned experiments were performed: with animals fed a normal, a lipid-deficient and a lipid-enriched diet. Pregnant females were divided into three groups, one was fed a specially composed diet containing 0.12% of rape seed oil (artificial fat-deficient diet), the second group was fed the same diet supplemented with 20% of rape seed oil (artificial fat-enriched diet), and the third one, serving as the control group 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 nursing 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 six animals each.

The myelin fraction was isolated by 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 the procedure described by Folch-Pi et al. (1957) and then further separated by means of combined column and thin layer chromatography. Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated by the method described by Svennerholm (1964), and phospholipids by the techniques of Singh and al. (1971). Thereafter, cholesterol was estimated by the method of Sperry and Webb (1950), cerebrosides and sulfatides were quantitated by the techniques of Radin and al. (1965). Phosphorus content was determined by the method of Bartlett (1959).

Results were evaluated by the statistical methods in Student's t-test.

Histological methods. Morphological evaluation of the experimental disease was based on histological slides obtained from material embedded in celloidin and stained with hematoxyline-eosine, and according to Nissl or Woelcke methods.

RESULTS

Clinical observations did not reveal any differences between the experimental groups of animals immediately after TET injection as well as in the following period. In experimental animals a clinical syndrom

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
Caseine 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

Table 2. Influence of TET intoxication on composition of myelin lipids in rats fed during development diets containing various amounts of lipids (in mmol/100 g of dry tissue)

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

Lipids Lipidy	Control Norma	5 hours after TET intoxication 5 godz. po zatruciu TET			24 hours after TET intoxication 24 godz. po zatruciu TET			28 days after TET intoxication 28 dni po zatruciu TET		
		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	27.1±1.0	30.3±1.6	35.4±1.8	32.5±0.6	25.2±2.1	26.9±2.2	28.0±1.9	28.8±0.8	30.7±2.0
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.2±0.02	0.2±0.04	0.2±0.05	0.7±0.1	0.3±0.02	0.4±0.08	1.3±0.2	0.5±0.05	0.4±0.2	0.5±0.01
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	25.8±1.2	19.4±1.1	17.9±1.2	21.3±1.4	18.5±1.0	17.2±1.4	18.4±1.2	14.7±1.0	14.0±1.4	17.7±1.3
Cerebrosides Cerebrozydy	22.0±1.2	15.9±0.3	14.9±0.8	17.8±0.7	15.2±0.7	14.7±0.5	15.0±0.8	12.2±0.5	12.3±0.5	14.5±0.8

Sulfatides	3.8±0.1	3.4±0.2	3.0±0.2	3.5±0.1	3.3±0.2	2.5±0.3	3.4±0.4	2.5±0.3	2.3±0.2	3.2±0.4
Sulfatydy										
Total phospholipids	25.3±3.0	24.6±2.2	32.2±2.3	27.5±1.8	29.9±2.6	29.2±2.3	36.2±3.0	24.5±2.0	29.3±2.8	27.2±2.2
Całkowite fosfolipidy										
Sphingomyelins	2.4±0.1	1.9±0.1	2.2±0.3	3.0±0.4	2.7±0.2	3.4±0.3	3,5±0.3	2.8±0.3	2.4±0.2	2.3±0.3
Sfingomieliny										
Phosphatidylcholine	7.5±0.3	7.1±0.5	9.4±1.0	7.9±0.3	10.5±0.7	8.9±0.8	11.5±0.8	7.0±0.2	8.5±0.4	8.7±0.8
Fosfatydylocholina										
Lysophosphatidylcholine	0.7±0.09	1.4±0.3	1.9±0.2	2.1±0.3	0.9±0.1	2.2±0.1	2.3±0.4	1.9±0.3	2.5±0.5	1.5±0.2
Lizofosfatydylocholina										
Phosphatidylserine+										
+phosphatidylinositide	2.5±0.4	2.2±0.3	2.2±0.4	0.7±0.2	0.7±0.1	2.4±0.2	1.4±0.2	2.3±0.4	2.5±0.2	1.1±0.04
Fosfatydyloseryna+										
+fosfatydyloinozytol										
Phosphatidylethanolamine	3.6±0.3	3.4±0.4	3.7±0.3	4.2±0.9	3.4±0.1	4.2±0.4	4.9±0.5	3.4±0.6	3.7±0.3	2.8±0.3
Fosfatydyloetanoloamina										
Plasmalogen	8.6±0.6	8.6±0.4	12.9±1.2	9.6±0.5	11.8±0.8	9.2±0.5	12.7±0.5	7.2±0.7	9.8±0.6	10.8±0.9
Plazmalogen										

Significant differences displayed

Różnice istotne podkreślono

Mean±SE

Średnia±SE

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

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

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

Lipids Lipidy	Control Norma	5 hours after TET intoxication 5 godz. po zatruciu TET			24 hours after TET intoxication 24 godz. po zatruciu TET			28 days after TET intoxication 28 dni po zatruciu TET		
		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	38.2±1.9	38.0±1.0	37.6±0.9	41.7±1.7	40.0±0.9	35.0±2.3	32.5±1.1	41.3±1.4	39.4±0.3	40.3±1.3
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.9±0.2	0.4±0.1	0.6±0.1	1.6±0.1	0.8±0.1	0.6±0.1	0.7±0.6
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	31.1±2.0	27.1±0.7	22.2±1.6	25.0±0.6	22.8±0.9	23.8±0.5	22.3±0.7	21.7±0.9	20.0±0.6	23.2±1.4
Cerebrosides Cerebrozydy	26.5±1.9	22.3±0.6	18.5±1.4	20.9±0.6	18.7±0.8	20.4±0.5	18.1±0.3	18.0±0.7	16.8±0.5	19.0±1.3

Sulfatides	4.6±0.3	4.8±0.3	3.7±0.2	4.1±0.1	4.1±0.2	3.4±0.3	4.2±0.5	3.7±0.2	3.2±0.2	4.2±0.3
Sulfatydy										
Total phospholipids	30.4±3.1	34.6±1.0	39.9±1.8	32.4±1.5	36.8±1.0	40.6±2.3	43.6±1.3	36.2±1.0	40.0±0.7	35.8±1.5
Całkowite fosfolipidy										
Sphingomyelins	2.8±0.2	2.7±0.2	2.7±0.3	3.6±0.4	3.3±0.2	3.3±0.3	4.2±0.2	4.1±0.2	3.3±0.5	3.0±0.2
Sfingomielin										
Phosphatidylcholine	9.1±0.3	9.9±0.5	11.6±0.8	9.3±0.3	12.9±0.7	12.3±1.2	13.9±0.6	10.4±0.3	11.6±0.3	11.4±0.4
Fosfatydylocholina										
Lysophosphatidylcholine	0.9±0.1	2.1±0.3	2.4±0.3	2.4±0.2	1.1±0.1	3.0±0.1	2.8±0.3	2.7±0.1	3.3±0.5	2.0±0.2
Lizofosfatydylocholina										
Phosphatidylserine+										
+ phosphatidylinositide	3.0±0.6	3.2±0.3	2.7±0.5	0.9±0.2	0.8±0.1	3.4±0.3	1.6±0.1	3.4±0.3	3.4±0.2	1.5±0.1
Fosfatydyloseryna+										
+ fosfoinozytol										
Phosphatidylethanolamine	4.4±0.4	4.7±0.4	4.6±0.3	4.9±0.7	4.2±0.1	5.8±0.6	5.8±0.4	5.0±0.2	5.0±0.3	3.8±0.2
Fosfatydyloetanolamina										
Plasmalogen	10.2±0.6	12.0±0.8	15.9±1.1	11.3±0.7	14.5±0.6	12.8±0.8	15.3±0.8	10.6±0.4	13.4±0.8	14.1±0.8
Plazmalogen										

Significant differences displayed
Różnice istotne podkreślono

Mean±SE
Średnia±SE

Number of animals in each group: 6
Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

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

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

Phospholipids Fosfolipidy	Control Norma	5 hours after TET intoxication 5 godz. po zatruciu TET			24 hours after TET intoxication 24 godz. po zatruciu TET			28 days after TET intoxication 28 dni po zatruciu TET		
		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	7.8±0.6	6.8±0.8	11.1±1.2	9.0±0.7	8.4±0.6	9.6±0.5	11.3±0.3	8.3±1.1	8.6±0.5
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	29.8±7.2	28.6±1.2	29.1±2.0	28.7±1.7	35.1±1.3	30.0±1.5	31.9±0.9	28.7±1.5	29.0±0.8	31.8±1.2
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	2.9±1.0	6.1±0.7	6.0±0.5	7.4±0.6	3.0±0.3	7.4±0.4	6.4±0.9	7.5±0.5	8.3±1.3	5.6±0.5
Phosphatidylserine+ phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna+ +fosfatydyloinozytol	9.9±1.4	9.2±0.8	6.8±0.9	2.7±0.4	2.2±0.4	8.4±0.5	3.7±0.2	9.4±0.9	8.5±0.6	4.2±0.2
Phosphatidylethanolamine Fosfatydylostanoloamina	14.4±1.6	13.6±0.9	11.5±0.9	15.2±1.6	11.4±0.5	14.3±0.5	13.3±1.1	13.8±0.8	12.5±0.8	10.6±0.4
Plasmalogen Plazmalogen	33.7±1.2	34.7±1.9	39.8±2.3	34.9±1.6	39.3±1.0	31.5±1.9	35.1±2.0	29.3±1.7	33.4±1.4	39.2±0.9

Significant differences displayed
Różnice istotne podkreślono

Mean±SE
Średnia±SE

Number of animals in each group: 6
Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

<http://rcin.org.pl>

developed, corresponding to that described by Magee et al. (1957) as typical for TET-induced cerebral edema.

Histological examination disclosed in the experimental animals diffuse spongy changes in the white matter in the form of numerous irregular and sharply delineated empty spaces. The changes were seen both in the early and in the late period following intoxication without striking differences between the experimental groups, that is in animals fed on normal, fat-deficient and fat-enriched diets. No glial or mesenchymal reaction could be observed in the edematous white matter.

The studies of myelin lipids in the group of animals kept on normal diet showed an increase of lysophosphatidylcholine, significant in the early phase after TET intoxication (5 hours) and also in the later stage after intoxication (28 days after TET injection). In the late period of the experiment were found also an increase of the amount of cholesterol esters and a significant drop of galactolipids, both cerebrosides and sulfatides were also noted. The results are presented in detail in Table 2 (absolute values), in Table 3 (relative percentage to total lipid content) and in Table 4 (relative percentage of particular phospholipids to total phospholipid content).

Comparison of the effect of TET intoxication on the pattern of myelin lipids between the groups of animals fed a fat-deficient and a normal diets demonstrates some accentuation of the above described changes in rats fed the lipid-deficient diet, over a period ranging from the last week of intrauterine life to their sacrifice. The pattern of changes noticed in the group of animals kept on the fat-enriched diet was characterized additionally by an early increase of cholesterol ester content and a drop of the content of phosphatidylserine and phosphatidylinositide fractions (see Tab. 2—4).

DISCUSSION

In our experimental approach we studied the effect of very complex system of external factors acting on the myelination process. First of all we produced the demyelination by the dietary deficit of fatty acids during maturation of the brain or we overloaded slightly the central myelin with lipid components by a fat-enriched diet. The next step was the production of toxic changes of myelin by the action of the alkyl tin compound (triethyltin sulfate).

Acute or chronic TET intoxication produces intramyelin vesiculation by the splitting of myelin lamellae occurring at the intraperiod line followed by accumulation of perivascular edematous fluid, indicating some impairment of the permeability of the endothelium (Aleu et al. 1963; Hirano et al. 1968; Leow et al. 1979). TET when applied chronically produces both spongy changes of the myelin and necrosis of ner-

ve fibers followed by phagocytosis of the resulting myelin debris by reactive astroglial cells (Wender et al. 1982). From the molecular components of the intraperiod line high molecular weight proteins constitute the target molecule for the toxic action of TET. In TET intoxication the metabolism of brain protein is also abnormal. Biochemical studies demonstrated a pronounced reduction of labelled leucine incorporation in the white matter. Reduction of incorporation of proline was not so marked, although also significant, in the white matter (Wender et al. 1974). Smith and Benjamins (1977) have shown a biphasic course of disturbances of leucine incorporation into the protein fraction, corresponding to myelin proteins.

The myelin lipids in TET-intoxicated animals showed in the early period of experimental disease an increase of lysophosphatidylcholine. This phenomenon we have often seen in several demyelinating processes, however, mainly in the later period of myelin decomposition (Wender et al. 1978a,b, 1979). This compound is well known for its high surface activity, therefore, it is interesting to note that it does not produce decay of myelin membranes in TET-intoxicated animals. In the later period of the experiment we have also noticed enhanced esterification of cholesterol and a significant decrease of galactolipids content of the myelin fraction, what seems to testify that in this phase of the experiment some demyelination takes place.

Rats developing on the fat-deficient diet exhibited after TET-intoxication, a general pattern of lipid changes in the myelin, similar to that of normally fed animals, but with an obvious tendency to greater accentuation of the observed deviations. It is not easy to judge if this is the result of the greater susceptibility of the myelin of animals developing in conditions of fat-deficient diet to the action of TET, or simply the result of overlapping of both external factors. More interesting seems to be the observation that animals developing in conditions of fat-enriched diet show in the early period after TET-intoxication the enhanced cholesterol esterification and some involvement of phospholipids (decrease of phosphatidylserine and phosphatidylinositide), what was not noticed under the influence of only one of the experimental external agents. That is why it seems possible to interpret these findings as proof that the myelin of animals maturing on a fat-enriched diet is more sensitive to the action of the alkyl-tin compound than the normal one.

Comparison of three experimental demyelinating processes: immunologically evoked disease (EAE), hypoxia induced by cyanide intoxication and myelin lesions provoked by TET-intoxication, in animals developing on an unappropriate diet demonstrated significant differences. Changes in fatty acid content in the diet decrease significantly the incidence rate of EAE induced by sensitisation with rat cerebral white matter in

complete Freund's adjuvant (Wender et al. 1985). The dietary effect on the reaction of central myelin to cyanide intoxication is only insignificant, since the myelin lipid spectrum showed only a slight tendency to weaker changes in the experimental conditions of incorrect diet during brain maturation. In contrast to this, an excess of fatty acids during brain maturation leads to an increase of sensitivity to the action of alkyl tin sulfate. The general conclusion from the performed studies is that an unsuitable diet during maturation of the brain influences the susceptibility of central myelin to the action of noxious agents.

CONCLUSIONS

1. Deficit of fatty acid during brain maturation leads to some accentuation of lipidic changes in myelin in the course of TET-intoxication.
2. A fat-enriched diet during development enhanced the susceptibility of cerebral myelin to the action of triethyltin.
3. An unsuitable diet during maturation of the brain influences the susceptibility to the action of noxious agents, leading to myelin lesions.

WPŁYW ZATRUCIA TET NA OBRAZ LIPIDÓW MIELINY SZCZURÓW ŻYWIANYCH W CZASIE ROZWOJU DIETĄ Z RÓŻNĄ ZAWARTOŚCIĄ LIPIDÓW

Streszczenie

U szczurów rasy Wistar wykonano badania lipidów mieliny po podaniu do-otrzewnowo 4 mg siarczanu trójetylku cyny (TET) na kg masy ciała, w grupach zwierząt żywionych w czasie rozwoju dietą normalną, z niedoborem oraz nadmiarem lipidów.

Badania doprowadziły do następujących wniosków:

1. Niedobór kwasów tłuszczowych w czasie dojrzewania mózgu prowadzi do nasilenia zmian lipidowych w mielinie w czasie zatrucia TET.
2. Dieta wzbogacona w tłuszcze podawana w czasie rozwoju nasila wrażliwość mieliny ośrodkowego układu nerwowego na działanie TET.
3. Niewłaściwa jakościowo dieta w czasie dojrzewania mózgu zmienia wrażliwość na działanie czynników szkodliwych, prowadzących do uszkodzenia mieliny.

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ TET НА СОСТАВ ЛИПИДОВ МИЕЛИНА КРЫС, В ПИТАНИИ КОТОРЫХ ВО ВРЕМЯ РАЗВИТИЯ СОДЕРЖАЛОСЬ РАЗЛИЧНОЕ КОЛИЧЕСТВО ЛИПИДОВ

Резюме

В работе представлены исследования миеллина у крыс породы Уистар после введения внутрибрюшинно 4 мг TET на 1 кг массы тела. Эксперимент проводился на трех группах животных, рацион которых отличался нормальным содержанием липидов, их недостатком или избытком.

На основании исследований можно сделать следующие выводы:

1. Недостаток жирных кислот в период созревания мозга приводит к интенсификации липидовых изменений в миелине под воздействием отравляющего вещества ТЕТ.
2. Рацион, содержащий избыток жиров, вызывает в период развития повышенную чувствительность миелина центральной нервной системы к ТЕТ.
3. Неправильное питание во время созревания мозга влияет на чувствительность к вредным факторам, вызывающим повреждение миелина.

REFERENCES

1. Aleu F., Katzman R., Terry R.: Fine structure and electrolyte analyses of cerebral edema induced by alkyl tin intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1963, 22, 403—412.
2. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466—468.
3. Bourre J., Pascal G., Durand G., Masson M., Dumont D., Piciotti M.: Alterations in the fatty acid composition of rat brain cells (neurons, astrocytes, and oligodendrocytes) and of subcellular fractions (myelin and synaptosomes) induced by a diet devoid of n-3 fatty acids. *J. Neurochem.*, 1984, 43, 342—348.
4. Folch-Pi J., Lees 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.
5. Fuller G., Wiggins R.: Brain hypomyelination during postnatal undernourishment: a comparison of proteolipid protein synthesis versus assembly into membrane. *Exp. Neurol.*, 1984, 84, 306—313.
6. Hirano A., Zimmerman H., Levine S.: Intramyelinic and extracellular spaces in triethyltin intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 571—580.
7. Leow A., Anderson R., Little R., Leaver D.: A sequential study of changes in the brain and cerebrospinal fluid of the rat following triethyl poisoning. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1979, 47, 117—121.
8. Magee P., Stoner H., Barnes J.: The experimental production of edema in the central nervous system of the rat by triethyl-tin compounds. *J. Path. Bact.*, 1957, 73, 107—124.
9. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brains: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—767.
10. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determination of cerebroside. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789—796.
11. Singh M., Spritz N., Geyer B.: Studies of brain myelin in the quaking mouse. *J. Lipid Res.*, 1971, 12, 473—481.
12. 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, 447—488.
13. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97—108.
14. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 838—859.
15. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z.: Effect of a fatty acid enriched diet on myelin lipids of the developing rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983b, 21, 353—362.
16. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Goncerzewicz A.: Myelin lipids in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. *Exp. Path.*, 1979, 17, 334—339.

17. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Goncerzewicz A.: The influence of unappropriate diet during development on the susceptibility, to experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropat. Pol.*, 1985a, 23, 129—144.
18. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Mularek O., Sędzik J., Pankrac J.: Myelin lipids in the brain after transplacental intoxication with ethylnitrosourea. *Exp. path.*, 1978a, 15, 105—110.
19. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acid deficient diet on myelin lipids of the rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983a, 21, 35—43.
20. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1978b, 16, 153—162.
21. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Knitter B., Talkowska D., Pankrac J.: The influence of cyanide intoxication on the composition of myelin lipids in rats fed during development a diet containing various amounts of lipids. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 43—56.
22. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żórawski A.: Fatty acid composition of myelin lipids in developing rats kept on a fat deficient diet. *Neuropat. Pol.*, 1983b, 21, 363—376.
23. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żórawski A.: Effect of a fatty acid enriched diet on the composition of fatty acids in lipids of cerebral myelin during development. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 119—127.
24. Wender M., Śniatała-Kamasa M., Piechowski A.: Myelin of the optic nerve in rats chronically intoxicated with triethyl tin sulfate (TET). *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 223—238.
25. Wender M., Zgorzalewicz B., Piechowski A.: Cell free protein synthesis by rat brain in triethyl tin intoxication. *Acta Neurol. Scand.*, 1974, 50, 103—107.
26. White H. Jr., Galli C., Paoletti R.: Brain recovery from essential fatty acid deficiency in developing rats. *J. Neurochem.*, 1971, 16, 869—882.
27. Wiggins R., Miller J., Benjamins J., Krigman M., Morell P.: Myelin synthesis during postnatal nutritional deprivation. *Brain Res.*, 1976, 107, 257—264.

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

TERESA E. BUGERA, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

ZMIANY PATOMORFOLOGICZNE W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM SZCZURA W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA OCTANEM KOBALTAWYM I NIEDOKRWIENIA MÓZGU

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Zatrucie szczura octanem kobaltawym z równoczesnym niedokrwieniem mózgu prowadzi do wystąpienia zespołu pozapiramidowego z akinezją, wzmożonym napięciem mięśni grzbietu i kończyn oraz okresowym drżeniem żuchwy i głowy (Bugera i wsp. 1985a). Na ujawnienie się zaburzeń neurologicznych istotny wpływ ma stopień niedokrwienia mózgu. Zespół pozapiramidowy obserwowano tylko u tych szczurów poddanych zatruciu octanem kobaltawym, u których podwiązano równocześnie obie tętnice szyjne wspólne, natomiast w przypadku zamknięcia tylko jednej z nich zatrucie przebiegało bezobjawowo (Bugera i wsp. 1985a). U zwierząt doświadczalnych klinicznym objawem zatrucia, przypominającym objawy występujące w chorobie Parkinsona i zespołach parkinsonowskich u człowieka, towarzyszyło obniżenie poziomu dopaminy i spadek stosunku ilościowego dopamina/GABA, który był również zależny od znacznego zmniejszenia ogólnej puli GABA (Bugera i wsp. 1985b).

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat zmian morfologicznych w OUN w takim modelu zatrucia kobaltem, w którym występują zaburzenia pozapiramidowe. W chorobie Parkinsona, której podłożem jest zaburzenie przemiany dopaminy, zespół patomorfologiczny charakteryzuje postępujące zwyrodnienie i zanik neuronów barwnikonośnych pnia mózgu, przede wszystkim istoty czarnej (Meyer 1963; Bernheimer i wsp. 1973). Równocześnie przyjęty jest pogląd, że uszkodzenie głównych szlaków układu dopaminergicznego (nigrostriatalnego i mezolimbicznego) i innych struktur tego układu, jak również szlaków innych układów neuroprzekaznikowych może prowadzić do wystąpienia różnorodnych zespołów chorobowych i zróżnicowanych zaburzeń biochemicznych (Costall, Naylor 1973; Ladinsky i wsp. 1976; Pycoc, Norton 1976).

Kobalt należy także do grupy pierwiastków padaczkorodnych, wywołujących miejscowe obniżenie poziomu GABA (Seidel i wsp. 1981). Stwierdzono, że ognisko uszkodzenia w korze mózgu zwierząt doświadczalnych w wyniku bezpośredniego nałożenia tlenku kobaltu stanowi przyczynę napadów drgawkowych z charakterystycznym dla padaczki zapisem EEG (Calasanti i wsp. 1982; Mutani i wsp. 1982; Hocherman, Reichenthal 1983). Badania morfologiczne mózgow zwierząt z tego typu napadami padaczkowymi wykazały ogniskowy obrzęk kory mózgowej, opustoszenia komórkowe, często martwicę skrzepową z rozbiórką makrofagową i odczynem glejowym (Willmore, Rubin 1982), a także uszkodzenie osłonek mielinowych (Verhamme 1973).

Istotnym czynnikiem uwzględnianym w mechanizmie toksycznego działania kobaltu jest jego duże powinowactwo do białek układów błonowych i wywoływanie zaburzeń w aktywnym transporcie glukozy, neuroprzekazników i innych substancji chemicznych biorących udział w przemianach komórkowych (Shimizu, Yamamoto 1982; Washio 1982; Miyamoto 1983). Webb i wsp. (1964) wykazali hamujące działanie jonów kobaltowych na aktywność niektórych enzymów związanych z układem red-ox z możliwością rozwoju niedotlenienia cytotoksycznego.

Biorąc pod uwagę złożony charakter działania kobaltu na OUN, a w naszym modelu zależność klinicznych objawów zatrucia kobaltem od nasilenia niedokrwienia OUN, postanowiono przeprowadzić ocenę histologiczną mózgow zwierząt doświadczalnych dla określenia ewentualnego podłoża obserwowanych zaburzeń pozapiramidowych.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 30 szczurów Wistar, samców o masie ciała 150—180 g. Zwierzęta podzielono na dwie grupy. W grupie I leżącej 12 szczurów, w uśpieniu gammabutyrolaktonem podanym dootrzewnowo w roztworze soli fizjologicznej w dawce 500 mg/kg masy ciała, wstrzykiwano do tętnicy szyjnej wspólnej lewej octan kobaltu w roztworze soli fizjologicznej w ogólnej objętości 50 μ l i bezpośrednio po wstrzyknięciu podwiązywano tę tętnicę. Dawka wstrzykniętego każdorazowo kobaltu w przeliczeniu na Co^{++} wynosiła 1 mg. Czas przeżycia zwierząt tej grupy wynosił 5 i 30 dni. W drugiej grupie u 18 szczurów wykonano podobny zabieg operacyjny i dodatkowo podwiązano tętnicę szyjną wspólną prawą. Zwierzęta, które przeżyły uśmiercano po 5 dniach. W momencie kończenia doświadczenia po otwarciu klatki piersiowej wykonywano przezsercową perfuzję zubożonym 10% roztworem formaliny w 0,9% roztworze NaCl pod ciśnieniem 80—100 mm Hg. Do badań w mikroskopie świetlnym pobierano mózgowie, rdzeń kręgowy, wątrobę i nerkę. Po dotrwaleniu przez 24 godziny w płynie perfuzyjnym, mózgowie i rdzeń kręgowy krojono w płaszczyźnie czołowej na poziomie

skrzyżowania wzrokowego, w pełni rozwiniętych zwojów podstawy, śród-mózgowia, mostu wraz z mózdzkiem i opuszki oraz wszystkich odcinków rdzenia kręgowego. Bloki tkankowe przeprowadzano rutynowo do parafiny. Skrawki z OUN barwiono hematoksyliną i eozyną oraz według metody Klüvera—Barrery; skrawki z wątroby i nerki — hematoksyliną i eozyną.

Nie wykonywano oddzielnych badań na szczurach z jedno- i obustronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej wspólnej wykorzystując do tego celu materiał archiwalny Zakładu Neuropatologii CMDiK PAN, obejmujący mózgi szczurów w tym samym wieku i z takim samym czasem przeżycia.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

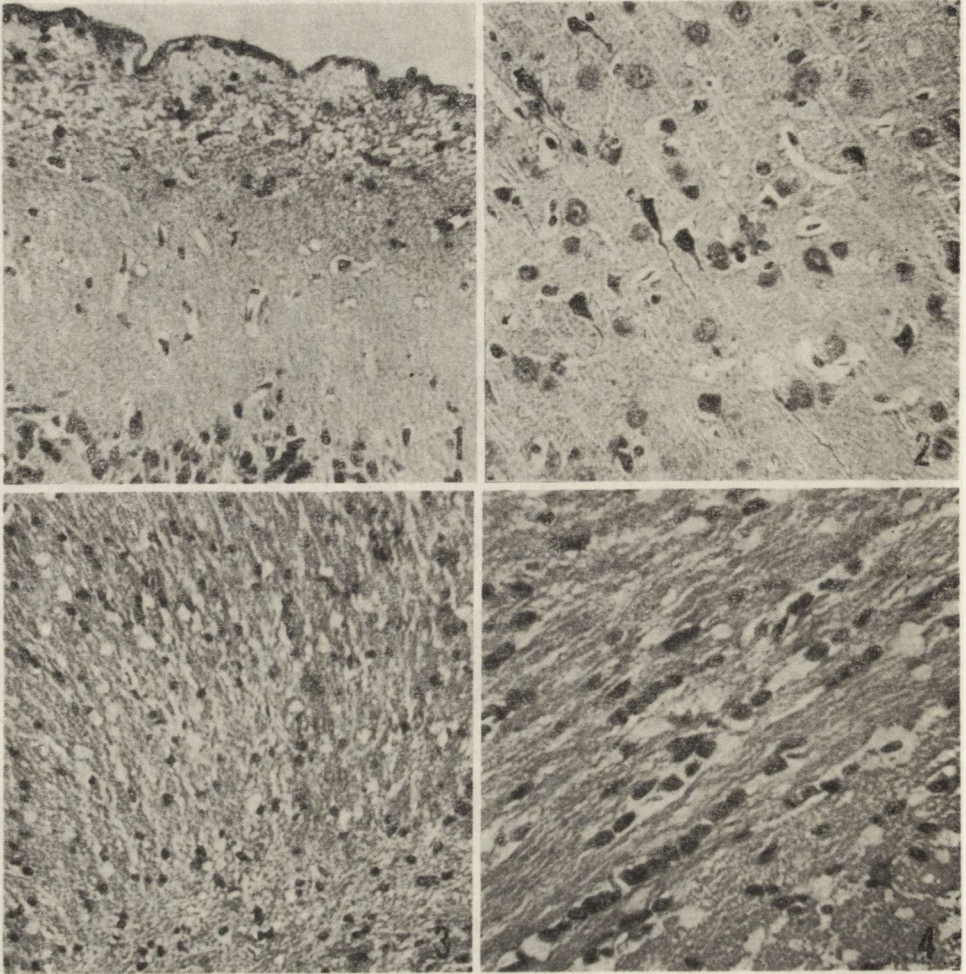
Z 12 szczurów grupy I, które zatrutowano octanem kobaltowym przy jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej, dwa szczury padły bezpośrednio po zabiegu z objawami obrzęku płuc. Pozostałe szczury po 24 godzinach od zabiegu operacyjnego wykazywały mniejszą ruchliwość, natomiast po 48 godzinach nie różniły się od zdrowych zwierząt. Szczury rosły i wykazywały przyrost masy ciała do końca obserwacji.

W grupie II spośród 18 szczurów poddanych zatruciu octanem kobaltowym przy podwiązaniu obu tętnic szyjnych wspólnych, 10 zwierząt padło bezpośrednio po zabiegu. U szczurów, które przeżyły po 24 godzinach obserwowano zmniejszenie aktywności ruchowej, wzmożenie napięcia mięśniowego i okresowe drżenia żuchwy oraz głowy. Objawy neurologiczne stopniowo narastały wraz z towarzyszącym obniżeniem łaknienia i postępującym spadkiem wagi ciała. Dwa szczury padły po 4 dniach od zabiegu.

W narządach wewnętrznych szczurów obu grup doświadczalnych nie stwierdzono makroskopowo uchwytanych zmian, również badanie mikroskopowe nerek nie ujawniło w nich zmian histologicznych. Natomiast badanie mikroskopowe wątroby wykazało u zwierząt obu grup doświadczalnych z 5-dniowym przeżyciem rozluźnienie układu beleczkowego zrazików oraz pojedyncze ogniska zwyrodnienia i rozpadu komórek wątrobowych, zarówno w części środkowej zrazików, jak i wokół przestrzeni bramnych. U szczurów grupy I z 30-dniowym przeżyciem obserwowano zwyrodnienie hepatocytów z zatarciem układu beleczkowego i budowy zrazikowej wątroby.

Badanie neuropatologiczne

U szczurów z zespołem piramidowym badanie mikroskopowe ujawniło nieprawidłowości we wszystkich strukturach białych oraz stosunkowo nieznaczne, rozsiane zmiany w strukturach szarych. W warstwie brzeż-



Ryc. 1. Zmiany gąbczaste w warstwie brzeżnej kory płata czołowego szczura z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 1. Spongy changes in the marginal layer of frontal cortex in rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 200

Ryc. 2. Pojedyncze obkurczone i nadbarwliwe neurony, niektóre z korkociągawatymi wypustkami w korze centralnej mózgu szczura z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 2. Shrunken and hyperchromatic neurons, some of them with korkscraw-like axons in the central cortex of rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 400

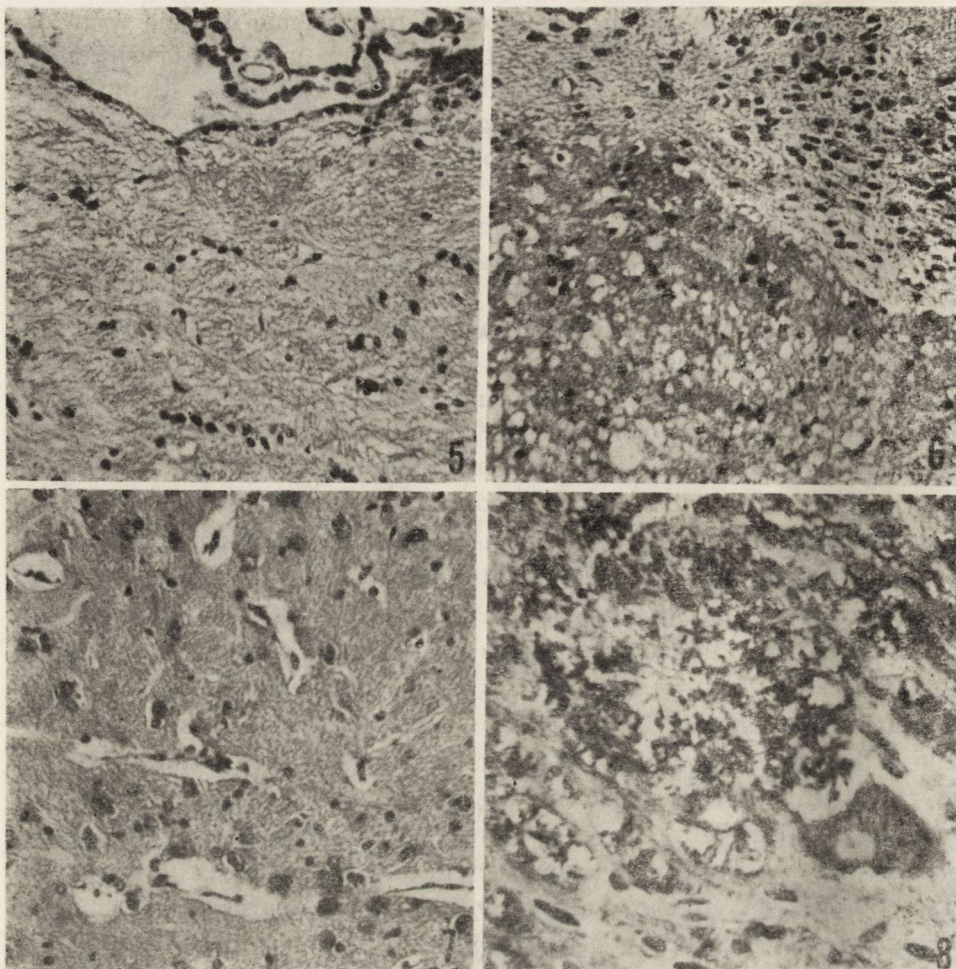
Ryc. 3. Liczne drobne jamki w istocie białej płata czołowego w mózgu u szczura z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 3. Numerous small cavities in the white matter of frontal lobe in rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 200

Ryc. 4. Spoidło wielkie z rozluźnionym układem włókien i poszerzonymi przestrzeniami wokół pasm komórek oligodendrogleju. Szczur z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 4. Loosening of fibers arrangement and dilated spaces around oligodendroglia cells in the corpus callosum of rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 400

nej kory półkul mózgowych obserwowano rozluźnienie utkania w związku z obecnością licznych okrągłych lub owalnych jamek, których nagromadzenie składało się na obraz podoponowego zgąbczenia tkanki (ryc. 1.), zmniejszającego się w kierunku głębszych warstw kory. Na pograniczu tych zmian spotykano wśród dobrze zachowanych komórek nerwowych rozsiane neurony obkurczone i nadbarwliwe, niekiedy z długimi wypustkami o korkociągowatym przebiegu (ryc. 2). Występowały one w sposób rozsiany nie tylko w korze nowej, ale także w zakręcie hipokampa, zwłaszcza w obrębie blaszki zębatej na pograniczu z istotą białą oraz w strukturach podkorowych, zwłaszcza w gałce bladej i we wzgórzu. Istota biała półkul mózgowych miała rozrzedzoną strukturę dzięki obecności licznych, różnej wielkości mikrojamek (ryc. 3). W ich obrębie czasami były widoczne ciemno zabarwione elementy morfotyczne, wśród których można było niekiedy rozpoznać obkurczone jądra komórek glejowych. W spoidle wielkim wśród porozsuwanych włókien obserwowano poszerzone przestrzenie wokół pasm jąder oligodendrocytów (ryc. 4). Podobne zmiany obserwowano również w obrębie sklepienia, przy czym zgąbczenie tkanki było szczególnie nasilone w sąsiedztwie komory III. Bardziej nasilona mikrowakuolizacja zaznaczała się także w otoczeniu komór bocznych (ryc. 5), zwłaszcza w obszarze przylegającym bezpośrednio do warstwy komórek wyściółki. W skrzyżowaniu wzrokowym zwracało uwagę zróżnicowanie wielkości mikrojamek (ryc. 6.), wśród których zdarzały się pojedyncze znacznie większe egzemplarze. Podobnie kształtowały się zmiany w torebce wewnętrznej oraz w pęczkach włókien strio-pallidarnych. W obrazie prądkowia zwracało uwagę bardzo znaczne poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych (ryc. 7), bardziej nasilone niż w pozostałych strukturach OUN. Zgąbczenie tkanki w obrębie pnia mózgu i opuszki było ogólnie bardziej nasilone niż w obrębie półkul mózgowych, jakkolwiek i w ich obrębie zróżnicowane w nasileniu w poszczególnych strukturach białych. W niektórych układach długich dróg mikrojamki charakteryzowały się znacznym zróżnicowaniem wielkości i kształtu. Widoczne były wśród nich również mikropęcherzyki o nieregularnych kształtach, powstałe z połączenia mikrojamek (ryc. 8). Niekiedy wewnątrz mikrojamek znajdowano owalne struktury, wolno leżące lub przylegające do osłonki mielinowej (ryc. 9) nie możliwe do zidentyfikowania nawet w powiększeniach imersyjnych. W obszarach największego zgąbczenia tkanki widoczne było współistniejące uszkodzenie włókien mieliniowych. Struktury szare pnia mózgu i opuszki nie wykazywały szczególnych uszkodzeń nawet w bezpośrednim sąsiedztwie nasilonych zmian gąbczastych. W obrębie istoty czarnej (ryc. 10), podobnie jak i w innych ugrupowaniach jądrowych, spotykano wśród nie zmienionej populacji komórek nerwowych mniej lub bardziej liczne hiperchromatyczne neurony. Nieprawidłowości w mózdzku miały podobny charakter, jak i w in-



Ryc. 5. Drobnojamkowe zwyrodnienie istoty białej w otoczeniu komory bocznej u szczura z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 5. Microcavities in the region of lateral ventricle in rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 200

Ryc. 6. Liczne jamki w skrzyżowaniu nerwów wzrokowych u szczura z zespołem pozapiramidowym. W jądrze nadwzrokowym liczne ciemne neurony. H—E. Pow. 200 ×

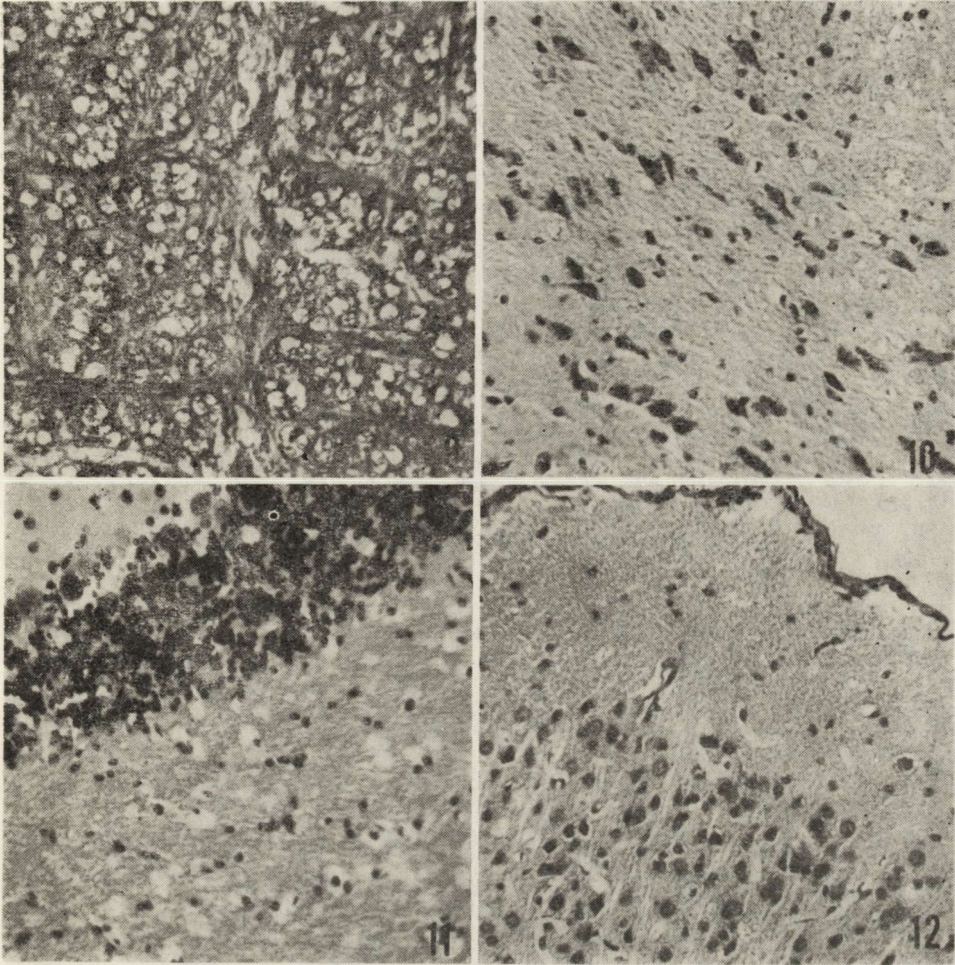
Fig. 6. Abundant microvacuolization in the optic chiasm of rat with extrapyramidal syndrome. In supraoptic nucleus numerous dark neurons are visible. H—E. × 200

Ryc. 7. Prążkowie. Znacznie poszerzone przestrzenie okołonaczyniowe i pojedyncze nadbarwliwe neurony u szczura z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 7. Striatum. Marked dilatation of perivascular spaces and single hyperchromatic neurons. Rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 400

Ryc. 8. Zwyrodnienie gąbczaste z uszkodzeniem włókien mielinowych w śródmózgowej części nerwu trójdzielnego szczura z zespołem pozapiramidowym. Klüver—Barrera. Pow. 400 ×

Fig. 8. Spongy changes with degeneration of myelin fibers in the midbrain part of trigeminal nerve in rat with extrapyramidal syndrome. Klüver—Barrera. × 400



Ryc. 9. Most. Zwyrrodnienie gąbczaste w obszarze szwu u szczura z zespołem pozapiramidowym. Klüver—Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 9. Pons. Spongy degeneration and myelin damage in the region of raphe. Klüver—Barrera. × 400

Ryc. 10. W większości dobrze zachowane neurony istoty czarnej śródmózgowia u szczura z zespołem pozapiramidowym. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 10. The majority of neurons of the substantia nigra well preserved, some of them hyperchromatic. Rat with extrapyramidal syndrome. H—E. × 200

Ryc. 11. Liczne rozsiiane jamki w istocie białej mózdzku u szczura z zespołem pozapiramidowym. Komórki Purkinjego i komórki warstwy ziarnistej zachowane. H—E. pow. 200 ×

Fig. 11. Numerous microcavities in the cerebellar white matter in rat with extrapyramidal syndrome. Granular and Purkinje cells preserved. H—E. × 200

Ryc. 12. Niewielkie rozluźnienie utkania w warstwie brzeżnej kory płata czołowego. W głębszych warstwach widoczne ciemne obkurczone neurony. Szczur bez objawów neurologicznych (po zatruciu octanem kobaltu i jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej). H—E. Pow. 200 ×

Fig. 12. Slight loosening of tissue structure in the marginal layer of frontal cortex. In the deeper cortical layers shrunken and hyperchromatic neurons are visible. Rat without neurological symptoms after cobaltous acetate intoxication and unilateral occlusion of the common carotid artery. H—E. × 200

nych strukturach OUN ze zgąbczeniem całej istoty białej i stosunkowo dobrze zachowanym obrazem kory oraz jąder mózdzku (ryc. 11). W badanych odcinkach rdzenia kręgowego wszystkie szlaki wstępujące i zstępujące przedstawiały obraz niemal jednolitego zgąbczenia. Neurony zarówno ruchowe, jak i czuciowe nie wykazywały istotnych zmian.

W mózgach zwierząt grupy I klinicznie bezobjawowych rozluźnienie tkanki w strukturach białych było słabo zaznaczone (ryc. 12), a w strukturach szarych tylko sporadycznie obserwowano obkurczone, nadbarwliwe komórki nerwowe.

OMÓWIENIE

Zmiany morfologiczne w mózgach szczurów z zespołem pozapiramidowym nie wykazują podobieństwa do zmian morfologicznych występujących w chorobie Parkinsona. Z patologii ludzkiej i prac doświadczalnych wiadomo, że zespoły parkinsonowskie występują w następstwie działania różnych czynników patogennych, a towarzyszący im obraz zmian tkankowych i ich topografia są zróżnicowane w poszczególnych procesach chorobowych. W zatruciu manganem u człowieka, w przebiegu którego występują również objawy pozapiramidowe, w obrazie zmian histopatologicznych przeważają zwyrodnienia i ubytki neuronalne w niektórych strukturach podkorowym oraz w korze mózgu (Neff i wsp. 1969; Jonderko 1970; Chandra 1972). Natomiast w modelu doświadczalnego zatrucia manganem bez objawów pozapiramidowych obserwowano nieprawidłowości przede wszystkim istoty białej mózgu ze stosunkowo niewielkim uszkodzeniem struktur szarych (Śmiałek, Mossakowski; Mossakowski i wsp. 1982, 1983). Z kolei w modelu zatrucia manganem szczura, przy zastosowaniu takiej samej drogi jego podania i takiej samej dawki jak w badanym modelu zatrucia kobaltem, uzyskano również przejściowe objawy pozapiramidowe (Kosicka i wsp. 1985), przy czym w obu modelach zespołowi pozapiramidowemu towarzyszyło obniżenie stosunku dopamina/GABA (Bugera i wsp. 1985b; Kosicka i wsp. 1985) w mózgach zwierząt doświadczalnych.

W patomechanizmie rozwoju zespołu pozapiramidowego u szczurów po zatruciu octanem kobaltowym należy uwzględnić możliwość udziału nieprawidłowości w istocie białej występujących we wszystkich jej formacjach. Z piśmiennictwa wiadomo, że włókna nerwowe mają dużą zdolność do wiązania jonów kobaltowych z przestrzeni międzykomórkowych (Iwaga, Inubushi 1983). Ponadto kobalt po wnikięciu do komórki ulega szybkiemu przemieszczeniu drogą transportu aksonalnego (Hackey, Altman 1982; Miyamoto 1983). Fakty te mogłyby tłumaczyć lokalizację i rozległość zmian strukturalnych obserwowanych u naszych zwierząt. Niewielkie zmiany morfologiczne w perykarionach komórek nerwowych

mogą między innymi wynikać z braku zdolności niektórych białek cytozolu do wiązania kobaltu w przeciwieństwie do szeregu innych metali (Waalkes i wsp. 1982). W naszym modelu doświadczalnym objawy pozapiramidowe mogą więc wiązać się z zaburzeniami w drogach łączących w OUN ośrodki dopaminergiczne. Uszkodzenie tych szlaków, podobnie jak i szlaków innych neuroprzekazników regulujących ich czynność, ma istotne znaczenie tak w chorobie Parkinsona, jak i zespołach parkinsonowskich (Pycock 1976).

Neurotoksyczne działanie kobaltu, znajdujące wykładnik morfologiczny w postaci mikrowakuolizacji istoty białej, może wiązać się z dużą zdolnością jonów kobaltowych do wbudowywania się w układy błonowe i wolne kanały wapniowe miejsc aktywnego transportu substancji biologicznie czynnych (Baker 1972; Meyer, Cooper 1983; Miyamoto 1983). W powiązaniu z wpływem na struktury błonowe komórki tłumaczono depolaryzację komórek glejowych po zadziałaniu jonami Co^{++} (Potapov 1983). Można przypuszczać, że zatrucie kobaltem szczura prowadzi do zaburzenia w przemianie komórek glejowych, głównie w gleju skąpowypustkowym, co w efekcie może prowadzić do rozwoju zmian strukturalnych obserwowanych w istocie białej.

Określenie wpływu niedokrwienia mózgu o odpowiednim nasileniu na ujawnienie się zespołu pozapiramidowego i rozwój charakterystycznych zmian morfologicznych w istocie białej w zatruciu kobaltem wymaga dalszych ukierunkowanych badań.

Autorzy dziękują Paniom Teresie Bok i Marii Raubo za staranną pomoc techniczną.

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КРЫС ВЫЗВАННОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ АЦЕТАТОМ КОБАЛЬТА И ИШЕМИЕЙ МОЗГА

Резюме

Оценивались патоморфологические изменения в центральной нервной системе крыс Вистар, которым после подвязки одной общей сонной артерии интраартериально (выше перевязки) впрыскивался ацетат кобальта в растворе физиологической соли, содержащий 1 мг Co^{++} . Животные из этой группы достигали возраста 5 и 30 дней. Крысы из второй группы подвергались такой же процедуре с добавочной перевязкой второй сонной артерии. Клинически у крыс I группы временно понижалась двигательная активность, а у крыс II группы усиливались экстрапирамидальные симптомы и уменьшалась масса тела.

В обеих экспериментальных группах были обнаружены рассеянные неспецифические нейрональные повреждения серных структур, более численные у крыс с экстрапирамидальным синдромом что по всей вероятности является результатом ишемии мозга. Во всех белых структурах был обнаружен спонгиоз ткани и микровакуализация, более значительно проявляющиеся у крыс с экстрапирамидальным синдромом.

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE CNS OF RAT FOLLOWING
COBALTOUS ACETATE INTOXICATION WITH SIMULTANEOUS
BRAIN ISCHEMIA

Summary

Morphological studies were performed on Wistar rats in which cobaltous acetate solution containing 1 mg of Co^{++} was injected into the left common carotid artery directly before its ligation. Animals of this group survived 5 or 30 days after operation. In the second group of rats similar operation was performed being followed by the ligation of the right common carotid artery. These animals survived 5 days. Rats of the first group exhibited only temporary decrease of the motor activity, whereas the animals of the second group developed progressive extrapyramidal syndrome with concomitant loss of the body weight. Histological examination revealed in the grey structures disseminate neuronal alterations, more numerous in rats with the extrapyramidal symptoms, probably resulting from cerebral ischemia. The most striking were microvacuolization and spongy changes in the all white structures far more pronounced in the second group of rats.

PIŚMIENICTWO

1. Baker P. F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1972, 24, 177—223.
2. Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F.: Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 20, 415—455.
3. Bugera T. E., Kosicka B., Kittel M., Śmiałek M.: Wpływ ostrego zatrucia octanem kobaltowym na wystąpienie zespołu pozapiramidowego oraz syntezę GABA w mózgowiu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1985a, 23, (w druku).
4. Bugera T. E., Kosicka B., Śmiałek M.: Wpływ ostrego zatrucia octanem kobaltowym na poziom dopaminy i stosunek stężeń DA/GABA w mózgowiu szczura. 1985b — w przygotowaniu do druku.
5. Calasanti B. K., Lindamood C., Craig C. R.: Effects of marihuana cannabinoids on seizure activity in cobalt-epileptic rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1982, 16, 573—578.
6. Chandra S. V.: Histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 29—38.
7. Costall B., Naylor R. J.: On the mode of action of a apomorphine. *Eur. J. Pharmacol.*, 1973, 21, 350—361.
8. Hackney C. M., Altman J. S.: Cobalt mapping on the nervous system: how to avoid artifacts. *J. Neurobiol.*, 1982, 13, 403—411.
9. Hoeherman S., Reichenthal E.: Introduction of semichronic epileptic foci using cobalt oxide. *Surg. Neurol.*, 1983, 20, 417—421.
10. Iwasa K., Inubushi T.: Co^{2+} and Mn^{2+} uptake by crab nerve fibers in resting state and potassium depolarization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, 16, 560—566.
11. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. Śląska Akademia Medyczna, Katowice 1970.
12. Kosicka B., Bugera T. E., Kittel M., Śmiałek M.: Badanie poziomu kwasu gammaaminomasłowego oraz aktywności dekarboksylazy glutaminianowej w os-

- trym zatruciu chlorkiem manganawym z zespołem pozapiramidowym u szczura. *Neuropat. Pol.*, 1985a, 23 (w druku).
13. Kosicka B., Bugera-Piecuch T. E., Śmiałek M.: Stosunek stężeń dopamina/GABA w mózgu szczura po zatruciu chlorkiem manganawym. 1985b — w przygotowaniu do druku.
 14. Ladinsky H., Consolo S., Bianchi S., Jori A.: Increase in striatal acetylcholine by picrotoxin in the rat: Evidence for a GABAergic-dopaminergic-cholinergic link. *Brain Res.*, 1976, 108, 351—361.
 15. Meyer A.: Intoxications. W: Greenfield's neuropathology. Red. W. Blackwood, W. H. McMenemey, A. Meyer, R. M. Norman, D. S. Russel. Arnold, London 1963.
 16. Meyer E. M., Cooper J. R.: Cobalt ions dissociate between calcium uptake through voltage-dependent sodium and calcium channels in synaptosomes. *Brain Res.* 1983, 265, 173—176.
 17. Miyamoto M. D.: Hg²⁺ causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na and Ca channels. *Brain Res.*, 1983, 267, 375—379.
 18. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. IX Intern. Congress of Neuropathol., Vienna, September 5—10, 1982. *Abstr.*, 78.
 19. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M. J.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 393—410.
 20. Mutani R., Durelli L., Piredda S., Sechi G. P., Traccis S.: Azione anticomiziale del pargapyranone in diverdi modelli di epilepsia sperimentale nel gatto. *Riv. Tatol. Nerv. Ment.*, 1982, 102, 193—200.
 21. Neff N. H., Barrett R. E., Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese administration in squirrel monkeys. *Experientia*, 1969, 25, 1140—1141.
 22. Potapov A. A.: Resistance of the slow potential and inhibition of afferent input of the frog olfactory bulb to hypoxia and blockade of synaptic transmission by manganese, cobalt and magnesium ions. *Neurofizjologia*, 1983, 15, 89—95.
 23. Pycock Ch.: Other neurotransmitters in Parkinson's disease. W: Neurotransmitter systems and their clinical disorders. Red. N. J. Legg. Acad. Press, London-New York-San Francisco 1976, 479—485
 24. Pycock C., Horton R. W.: Possible GABA-mediated control of dopamine-dependent behavioural effects from the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology*, 1976, 49, 173—179.
 25. Seidel J., Kastner I., Winkelmann E.: A loss of GABAergic hippocampus innervation in rats with cobalt-induced epilepsy demonstrated by Wolman's method. *Acta Histochem.*, 1981, 69, 249—254.
 26. Shimizu H., Yamamoto L.: Changes of local cerebral glucose utilization in rat cobalt epilepsy. *No To Shinkei*, 1982, 34, 115—121.
 27. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz neuropatologiczny mózgu szczura w zatruciu solami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.
 28. Verhamme E. N.: Contribution to the evaluation of the toxicity of cobalt. *Cobalt*, 1973, 3, 29—32.
 29. Waalkes M. P., Ress S. M., Craig C. R., Thomas J. A.: Induction of metallothionein in the rat brain by copper implantation but not by cobalt implantation. *Toxicol. Lett.*, 1982, 12, 137—142.
 30. Washio H.: A dual effect of cobalt ions on the spontaneous release of transmitter at insect motor nerve terminals. *J. exp. Biol.*, 1982, 98, 353—361.

31. Webb M.: The biological action of cobalt and other metals. IV. Inhibition of alpha-oxoglutarate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 89, 431—446.
32. Willmore L. J., Rubin J. J.: Formation of malonaldehyde and focal brain edema induced by subpial injection of FeCl_2 and CoCl_2 into rat isocortex. *Brain Res.*, 1982, 246, 113—119.

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

PAWEŁ P. LIBERSKI

GLIOCYTOSIS IN EXPERIMENTAL SCRAPIE
(263K STRAIN OF SCRAPIE) IN GOLDEN SYRIAN HAMSTERS

Department of Neurology, Medical Academy, Łódź

Natural scrapie in sheep and goats (Dickinson 1976), kuru (Gajdusek et al. 1966), Creutzfeldt-Jakob disease (Gibbs et al. 1968), transmissible mink encephalopathy (Marsh, Hanson 1979) and chronic wasting disease in mule deer and elk (Williams, Young 1982; Bahmanyar et al. 1985) are grouped together as transmissible spongiform encephalopathies. Because of the lack of spongiform changes in numerous cases infectious degenerative encephalopathies may be a better name for this group of diseases.

All these neurological disorders are characterized by a long incubation period lasting from months to decades. They follow a slow protracted course, are always fatal, and, from the neuropathological point of view, are "degenerative" diseases (Gajdusek 1977; Fraser 1976, 1979a,b,c; Kimberlin 1984).

The degenerative brain pathology of this group of disorders consists of neuronal loss, spongiform changes, and astrocytic reaction. All three phenomena are encountered to a different extent in various models of scrapie or its counterparts (Fraser 1976, 1979a,b,c; Liberski, Alwasiak 1983). The true nature of the astrocytic changes is only poorly understood (Fraser 1979a); it is not clear whether proliferation of astrocytes (hyperplasia) or only astrocytic hypertrophy are responsible for the apparent increase of the number of astrocytes observed under the light microscope.

In 1979 Fraser introduced the term "gliocytosis", later changed to "sclerosis" (Scott, Fraser 1984) to define proliferation of astrocytes accompanied by some changes in their morphology and a proliferation of rod-like microglial cells. Gliocytosis, described in murine scrapie is a very rare phenomenon, observed in about 1% of 50 000 mouse brains (different combination of scrapie-agent strains and mouse genotypes) by Fraser (1979a,b,c).

This aim of this contribution is to document the presence of gliocytosis in a model of hamster scrapie (263K strain), where this phenomenon is a more consistent feature of the neuropathological picture

MATERIAL AND METHODS

Strain of scrapie

The 263K strain of scrapie was used (kindly provided by Dr. R. H. Kimberlin, ARFC and MRC, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh, U.K.) after cloning by serial intracerebral passages at limiting dilution of inoculum. This strain was originally isolated by passage in hamsters of the Chandler isolate of murine scrapie (Kimberlin, Walker 1977, 1978), which, in turn, was primarily isolated in mice from "drowsy goats" (Chandler 1961).

Animals, inoculation, measuring of incubation period

Six week-old hamsters of both sexes from an outbred local colony (Medical Academy Łódź, Department of Oncology, head: prof. L. Woźniak) were used. The animals were injected with the supernatant after centrifuging (1600 g. 10—15 minutes) a 10% (w/v) scrapie brain homogenate in a 0.9% sodium chloride. 0.05 ml of the supernatant was injected into the right hemisphere under light ether anesthesia. The animals were inspected daily for unequivocal signs of scrapie—namely tremor, ataxia and ruffled fur. The incubation period was measured from the time of inoculation to the appearance of the first unequivocal signs of scrapie.

Histological procedures

The animals were decapitated under light ether anesthesia. The brains were immersion-fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. The four standard sections were cut coronally as described previously (Liberski, Alwasiak 1983) and stained with HE, and Masson's trichrome. The details of neuropathological examination are described elsewhere (Liberski, Alwasiak 1983).

Electron microscopic techniques

Animals were anesthetised with chloral hydrate and perfused through the heart with 50 ml of 1.25% glutaraldehyde and 1% paraformaldehyde in cacodylate buffer at pH 7.2, followed by 100 ml of 5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in cacodylate buffer at pH 7.2. The brains were removed immediately after perfusion and 1—2 cubic mm samples were dissected from the frontal and parietal lobes, the cerebellum, thalamus and brain-stem and left overnight in the second fixative. The samples were postfixed in 1% osmium tetroxide and embedded in Epon

812. Sections were cut using an LKB Ultratome III. Semithin sections were stained with methyl blue and ultrathin sections with lead citrate and uranyl acetate. These were examined using JEM 100C JEOL and Zeiss EM 109 electron microscopes.

RESULTS

Both astrocytic hypertrophy and hyperplasia were observed (Figs 1, 2). Brain stem, thalamus, hypothalamus and hippocampus were particularly affected in this order of severity and it seemed that proliferation of astrocytes correlated with spongiform changes but not with neuronal loss. In the hippocampus the astrocytic changes were seen both in the pyramidal cell (regions CA₁ and CA₄) and in the granular cell layers of the fascia dentata. The proliferation of astrocytes (true hyperplasia) was evident and different stages of mitoses recognized. Many astrocytes were similar to the "naked nuclei" of Alzheimer II cells; others containing lobulated and bizarre multiple nuclei were more reminiscent of reactive gemistocytes or transformed nuclei of progressive multifocal leukoencephalopathy (Figs 1, 2). Proliferation of glial fibers and formation of Rosenthal fibers were observed. Proliferation of astrocytes was accompanied by multiplication of rod-like microglial cells, in the manner described as gliocytosis by Fraser (1979a,b,c). It should be stressed, however, that gliocytosis was also observed when the cellular pattern of the hippocampus was undamaged.

Electron microscopic examination added to the picture of gliocytosis observed by light microscopy. The nuclei of astrocytes were characteristically pale with chromatin clumped beneath the nuclear membrane. The cytoplasm was filled with myriads of proliferating glial fibrils and contained numerous mitochondria (Fig. 3). In some areas, particularly in the brain stem, bundles of glial fibrils formed a complicated interwoven network, which virtually replaced other cellular elements (Fig. 4).

DISCUSSION

The 263K strain of scrapie emerged in a process of strain selection over the first 3—5 passages in hamsters (Kimberlin, Walker 1977, 1978). Because of this the description of the pathology of earlier passages were not typical of 263K although the presence of severe astrocytic hypertrophy was stressed (Marsh, Kimberlin 1975). In the present study the cloned 263K strain was used and both hyperplasia and hypertrophy of astrocytes were observed with the highest incidence in the brain stem, thalamus and hypothalamus. The overall incidence of gliocytosis, as defined by Fraser (1979) is much higher in hamsters infected with 263K

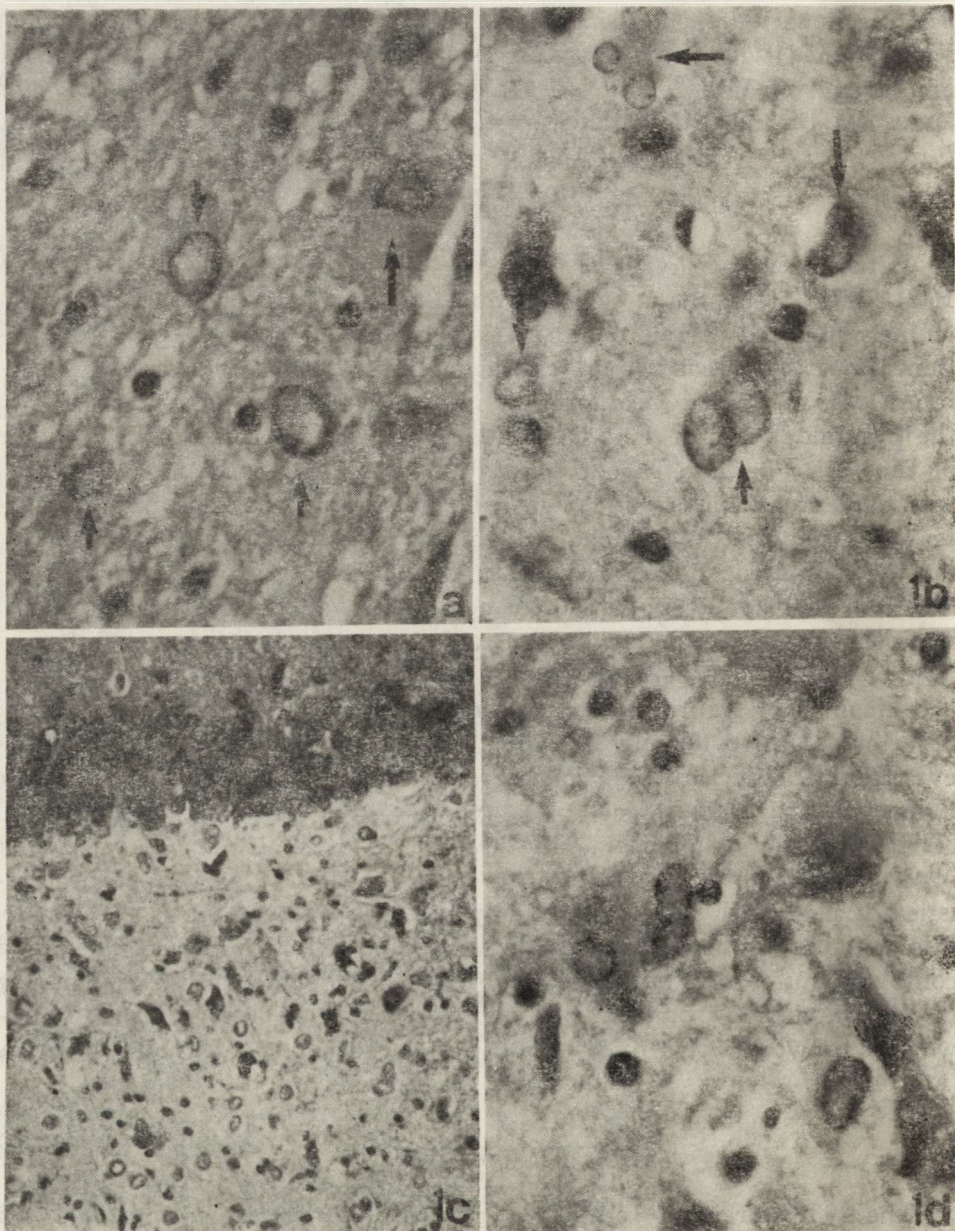


Fig. 1. Astrocytic proliferation (hyperplasia) in the hippocampus: *a* — Alzheimer II like cells. H—E $\times 400$; *b* — double astrocytic nuclei suggesting local mitosis (short arrow), Alzheimer II like cells (long arrows). H—E $\times 400$; *c* — numerous Alzheimer II like cells inside the fascia dentata. H—E $\times 160$; mitosis. H—E $\times 400$

Ryc. 1. Proliferacja astrocytów (hiperplazja) w hipokampie: *a* — komórki przypominające komórki Alzheimerera typu II. H—E, pow. 400 \times ; *b* — podwójne jądra astrocytów sugerujące mitozę (krótka strzałka) oraz komórki przypominające komórki Alzheimerera typu II (długie strzałki). H—E, pow. 400 \times ; *c* — liczne komórki przypominające komórki Alzheimerera typu II w obrębie fascia dentata. H—E, pow. 160 \times ; *d* — mitozę. H—E, pow. 400 \times

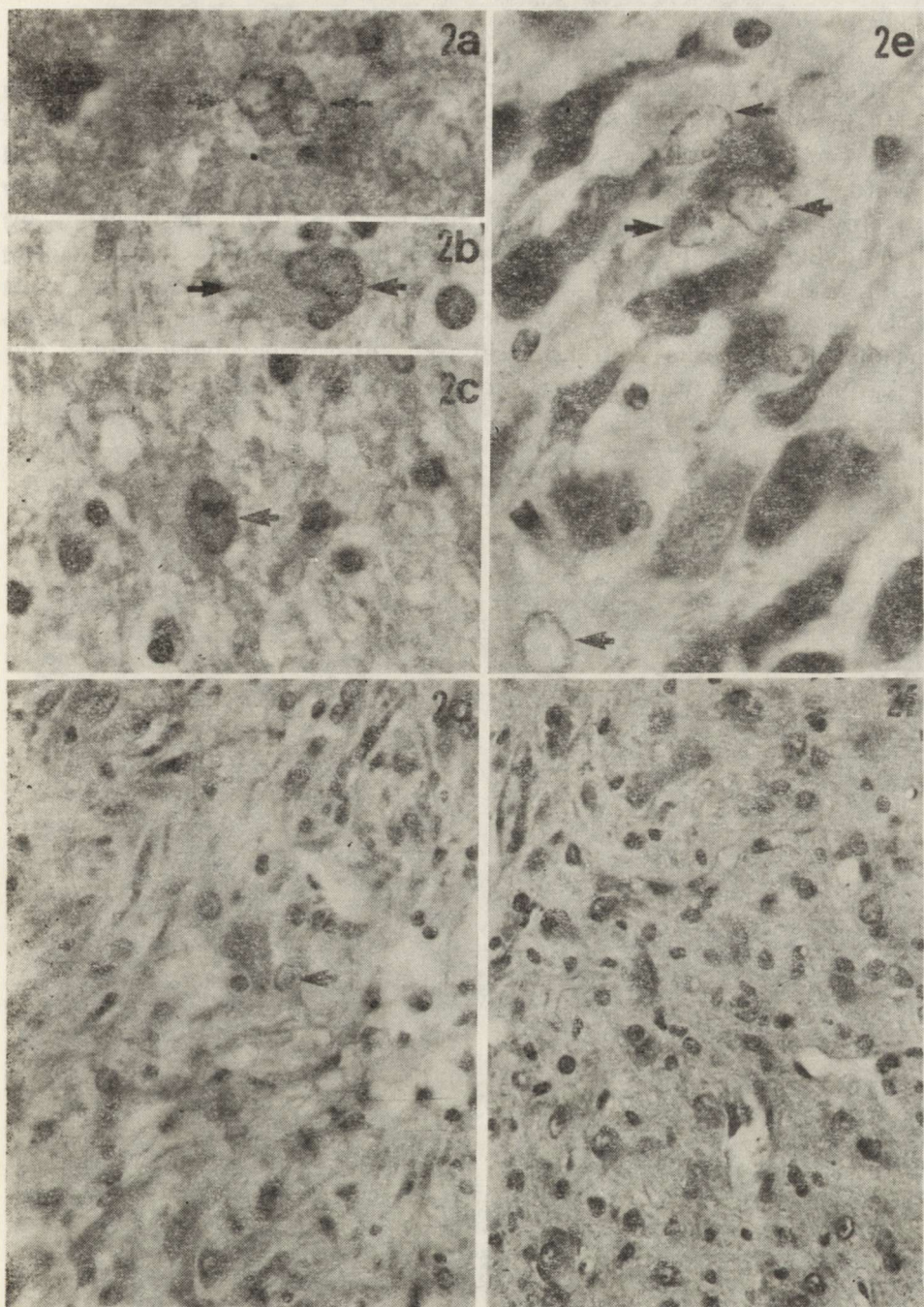


Fig. 2. Astrocytic proliferation in the hippocampus and the brain stem: *a, b, c* — bizarre, lobulated astrocytic nuclei. H—E $\times 400$; *e* — Alzheimer II like cells (arrows) in the CA₁ region of the pyramidal cells layer of the hippocampus. H—E, $\times 400$; *d, f* — proliferation of the astrocytes with abundant production of glial fibers in the brain stem. Masson's trichrome, $\times 160$

Ryc. 2. Rozplem astrocytów w formacji hipokampa i w pniu mózgu; *a, b, c* — dziwaczne kształty jąder astrocytów. H—E, pow. 400 \times ; *e* — komórki przypominające komórki Alzheimer'a typu II (strzałki) w rejonie CA₁ warstwy komórek piramidowych formacji hipokampa. H—E, pow. 400 \times ; *d, f* — proliferacja astrocytów z masywnym tworzeniem włókien glejowych w pniu mózgu. Met. trójbarwna Massona, pow. 160 \times

strain of scrapie than in murine scrapie (Fraser 1979a,b,c; Scott, Fraser 1984), in which gliocytosis is extremely rare. This difference of astrocytic reactivity according to species is interesting but whether it is a feature of hamsters or of strain 263K (or a contribution of the both) can only be decided by studying other scrapie strains in hamsters or by studying 263K in mice if passage in mice is ever achieved (Kimberlin, Walker 1977, 1978).

Despite the fact that astrocytic changes were recognized early as one of the hallmarks of transmissible spongiform encephalopathies, the background mechanism of this is only partly understood (Fraser 1976, 1979a,b,c). In two earlier studies performed in goats (Hadlow 1961) and

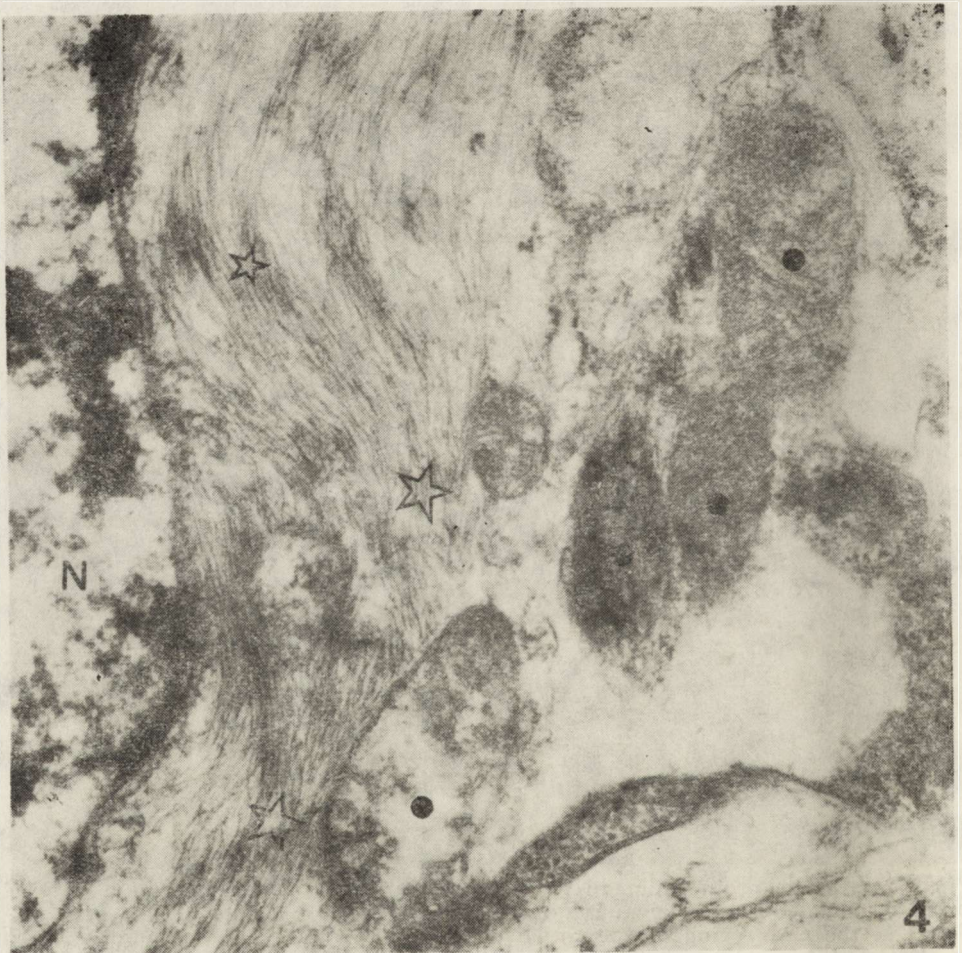


Fig. 3. Astrocytic cells. Abundant proliferation of glial fibrils (stars) and numerous mitochondria (dots). N — nucleus. $\times 26\ 000$

Ryc. 3. Komórka astrocytarna. Zwraca uwagę proliferacja gliofibryli (gwiazdki) oraz liczne mitochondria (ciemne kółka). N — jądro. Pow. $26\ 000 \times$

rats (Pattison 1965; Pattison, Jones 1967) the problem of hypertrophy versus hyperplasia of astrocytes was not settled. In the cited study Hadlow (1961) found both hypertrophy and hyperplasia of astrocytes, which paralleled spongiform changes. However, in some cases the intensity of the glial reaction was much more severe than that of spongiform changes and concomitant neuronal loss. Hadlow (1961) described also astrocytic nuclei reminiscent of "naked" nuclei of Alzheimer II cells. On the contrary, Pattison (1965) and Pattison and Jones (1967)

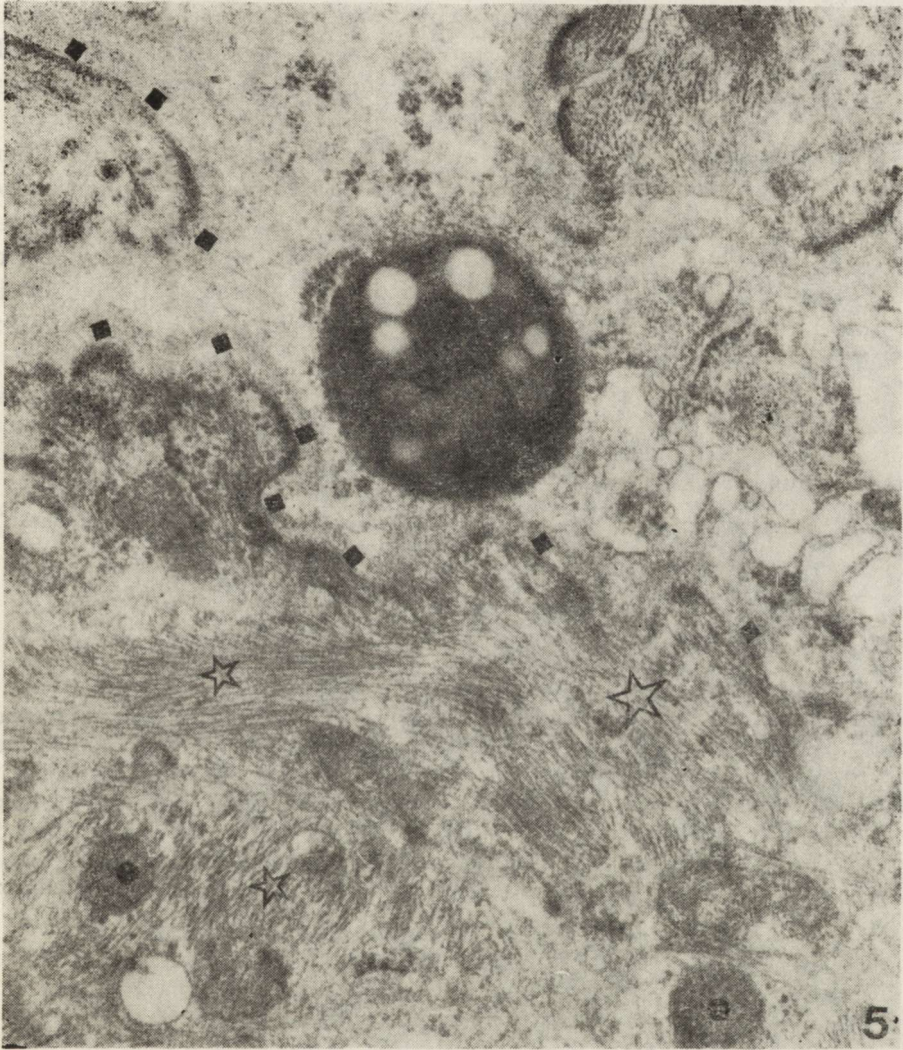


Fig. 4. Abundant proliferation of astrocytic processes containing glial fibrils (stars) and forming pseudomembrane structures (dark rectangles). Dots — mitochondria.
 × 26 000

Ryc. 4. Masywna proliferacja wypustek astrocytarnych zawierających gliofibryle (gwiazdki) i tworzących struktury pseudobłonowe (ciemne kwadraty). Pow. 26 000 ×

found marked hypertrophy but not hyperplasia of astrocytes and even suggested (Pattison 1965) that the astrocytes were the primary target of the disease; a view also shared by some other investigators of astrocytes (Mossakowski 1970).

The problem was partly settled by Fraser and his co-workers (1976, 1979a,b,c; Scott, Fraser 1984) who found that, in a limited proportion of the murine scrapie cases, the proliferation of the astrocytes (namely true hyperplasia) was evident. This group also re-emphasized the presence of Alzheimer II type cells and stressed that "gliocytosis" paralleled the severity or vacuolation as measured by the routine method used by the Edinburgh group (Fraser, Dickinson 1967, 1968), which in turn is dependent of the scrapie strain used in particular experiments (Dickinson, Fraser 1977, 1979).

Several conclusions can be drawn from the study presented here. Firstly, hyperplasia of the astrocytes was established as a phenomenon that may occur in scrapie. Secondly, the gliocytosis, which is extremely rare in mice, was common in hamsters infected with 263K. The presence of severe glial reaction in the hippocampus unaccompanied by intense spongiform changes and neuronal loss suggests that these two phenomena may evolve independently, at least to some extent.

Acknowledgements: The author wishes to express his thanks to Dr Richard H. Kimberlin, ARFC and MRC Neuropathogenesis Unit, Edinburgh, Scotland, for careful reading of the manuscript and a valuable discussion. The paper was supported by grant provided by the Polish Academy of Sciences (771-VI).

The author is the recipient of a gift from AGFA-GAEVERT, Brussels, Belgium.

GLIOCYTOZA W DOŚWIADCZALNEJ SCRAPIE (SZCZEP 263K) U ŻŁOTYCH CHOMIKÓW SYRYJSKICH

Streszczenie

Reakcja astrocytarna stanowi jeden z trzech (poza wakuolizacją i zanikami neuronalnymi) klasycznych wykładników neuropatologicznych encefalopatii gąbczastych. W szeregu modeli nie stwierdza się jednak rozplemu astrocytów, a jedynie ich przerost. W przedstawionym w pracy modelu scrapie (szczep 263K pa-sażowany przez złote chomiki syryjskie) stwierdzono zarówno proliferację, jak i zmiany przerostowe astrogliju. Nasilenie reakcji astrocytarnej osiągało stopień, odpowiadający zmianom określanym jako gliocytosis w niektórych modelach scrapie u myszy.

ГЛИОЦИТОЗ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ SCRAPIE (ШТАММ 263К) У СИРИЙСКИХ ЗЛОТИСТЫХ ХОМЯЧКОВ

Резюме

Реакция астроцитов — один из трех (наряду с вакуолизацией и атрофией нейронов) классических neuropatologicznych показателей спонгиозной (спонгиформной) энцефалопатии. Однако в целом ряде моделей наблюдается не пролиферация астроцитов, а всего

лишь их гипертрофия. В представленной модели scrapie (штамм 263К, носителем которого являются золотистые сирийские хомячки) обнаружены как пролиферация, так и гипертрофические изменения астроглии. Интенсификация реакции астроцитов достигла такого уровня, который соответствует изменениям, определяемым в некоторых моделях scrapie у мышей как глиоцитоз.

REFERENCES

1. Bahmanyar S., Williams E. S., Johnson F. B., Young S., Gajdusek D. C.: Amyloid plaques in spongiform encephalopathy of mule deer. *J. comp. Path.*, 1985, 95, 1—5.
2. Chandler R. L.: Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, 1961, 1, 1378—1379.
3. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. In: *Slow virus diseases of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin. North-Holland Publ. Company, Amsterdam 1976, 210—241.
4. Dickinson A. G., Fraser H.: Scrapie, pathogenesis in inbred mice: an assessment of host control and response involving many strains of agent. In: *Slow virus infections of the central nervous system*. Eds. C. Van ter Meulen, M. Katz, Springer, New York-Heidelberg-Berlin 1977, 3—14.
5. Dickinson A. G., Fraser H.: An assessment of genetics of scrapie in sheep and mice. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Ed. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Vol. 1., Academic Press, New York 1979, 367—386.
6. Fraser H.: Pathology of natural and experimental scrapie. In: *Slow virus diseases of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin, North-Holland Publ. Company, Amsterdam 1976, 267—305.
7. Fraser H.: Neuropathology of scrapie: the precision of lesion and their significance. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Ed. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Vol. 1., Academic Press, New York 1979a, 387—406.
8. Fraser H.: The pathogenesis and pathology of scrapie. In: *Aspects of slow and persistent virus infections*. Martinus Nijhoff Publishers, Hague-Boston-London 1979b, 30—58.
9. Fraser H.: Scrapie: a transmissible degenerative CNS disease. In: *Progress in neurological research with particular reference to motor neuron disease*. Eds. P. O. Behan, F. C. Rose. Pitman Medical, London 1979c, 194—210.
10. Fraser H., Dickinson A. G.: Distribution of experimentally induced scrapie lesions in the brain. *Nature*, 1967, 216, 1310—1311.
11. Fraser H., Dickinson A. G.: The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J. comp. Path.*, 1968, 78, 301—311.
12. Gajdusek D. C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 1977, 197, 943—960.
13. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M. P.: Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzee. *Nature*, 1966, 209, 794—796.
14. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers P. M., Beck E., Daniel P. M., Mathew W. B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy) transmission to chimpanzees. *Science*, 1968, 161, 383—389.
15. Hadlow W. J.: The pathology of experimental scrapie in the dairy goat. *Res. Vet. Sci.*, 1961, 2, 289—314.
16. Kimberlin R. H.: Scrapie: the disease and the infectious agent. *Trends Neurosci*, 1984, 7, 312—316.
17. Kimberlin R. H., Walker C. K.: Characteristic of short incubation model of scrapie in the golden hamsters. *J. Gen. Virol.*, 1977, 34, 295—304.

18. Kimberlin R. H., Walker C. K.: Evidence that the transmission of one source of agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J. Gen. Virol.*, 1978, 39, 487—496.
19. Liberski P. P., Alwasiak J.: Neuropathology of transmissible spongiform encephalopathy (263K strain of scrapie in golden syrian hamsters). I. Standard pathology and development of lesions. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 377—393.
20. Marsh R. F., Hansan R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Vol. 1, Academic Press, New York 1979, 451—461.
21. Marsh R. F., Kimberlin R. H.: Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J. Inf. Dis.*, 1975, 131, 104—110.
22. Mossakowski M. J.: Histochemistry of pathological glia. In: *VI Congrès international de neuropathologie*. Masson, Paris 1970, 366—376.
23. Pattison I. H.: Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. In: *Slow, latent, and temperate virus infections*. NINDB Monograph No. 2. Eds. D. C. Gajdusek, C. J. Gibbs Jr., M. Alpers. U. S. Department of Health, Education and Welfare, Washington 1965, 249—258.
24. Pattison I. H., Jones K. M.: The astrocytic reaction in experimental scrapie in rat. *Res. Vet. Sci.*, 1967, 8, 160—165.
25. Scott J. R., Fraser H.: Degenerative hippocampal pathology in mice infected with scrapie. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1984, 65, 62—68.
26. Williams H. M., Young S.: Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wild. Dis.*, 1982, 16, 89—98.

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

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO, PIOTR KOZŁOWSKI

KONFRONTACJA OBRAZÓW TOMOGRAFII KOMPUTEROWEJ Z MORFOLOGIĄ ZMIAN MÓZGOWYCH W CHOROBAH NACZYNIOWYCH OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa Zakład Neuro-
radiologii Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Tomografia komputerowa (tk) wprowadzona do badań klinicznych przez Hounsfielda w 1972 r., jako nieinwazyjna metoda diagnostyczna, wydaje się badaniem szczególnie przydatnym w rozpoznawaniu schorzeń naczyniopochodnych OUN (Davis i wsp. 1975; Harrison 1978; Kozłowski i wsp. 1980; Mariani i wsp. 1980; Gołąbek 1981). Interpretacja obrazów tk w OUN opiera się na pojawianiu się obrazów o odmiennym współczynniku pochłaniania, różnym od płynu mózgowo-rdzeniowego i tkanki nieuszkodzonej.

Zadaniem naszej pracy było przeprowadzenie konfrontacji wyników tk mózgu z obrazem morfologicznym rozmiękania i krwotoku celem ustalenia:

1) czy zasięg i umiejscowienie pól o zmienionej gęstości, hipo- lub hiperdensyjnych w obrazie tk, oddaje pełny zakres naczyniopochodnego uszkodzenia mózgu?

2) jakiego typu zmiany patologiczne w ognisku rozmiękania przyczyniają się do powstawania pól hipodensyjnych?

3) co wpływa na nieostre odgraniczenie obrazów obniżonej gęstości i ich niejednolity wygląd w obrazie tk?

4) co warunkuje, że obecne sekcyjnie naczyniopochodne uszkodzenie mózgu nie ujawnia się w badaniu tk?

5) czy inne procesy patologiczne mogą w obrazie tk naśladować naczyniopochodne uszkodzenie tkanki?

Uzyskane wyniki mogą stanowić przyczynek do oceny przydatności tk w chorobach naczyniopochodnych OUN, tym bardziej, że w dostępnym nam piśmiennictwie spotkaliśmy jedynie nieliczne prace korelacyjne zajmujące się głównie ewolucją obrazu tk (Davis i wsp. 1975; Luzatti i wsp. 1979; Crisi i wsp. 1984). Znajomość zaś umiejscowienia i rozległości ognisk niedokrwienia oraz ich liczebność mają istotne znaczenie w diagnostyce i w planowaniu postępowania terapeutycznego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał pochodzi ze zbiorów Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego i obejmuje 35 przypadków sekcyjnych chorych, u których w przebiegu rozmiękania (25 chorych) i krwotoku mózgu (10 chorych) wykonano dla celów diagnostycznych badanie tk mózgu bez podawania kontrastu przy zastosowaniu skanera Somatom-SF-Siemens. Badanie tk w przypadkach z rozmiękaniem mózgu wykonano w okresie od 1 do 7 dnia u 4 chorych, między 7 a 14 dniem u 5 chorych, między 2 a 4 tygodniem u 3 chorych, między 4 a 8 tygodniem u 4 chorych, a powyżej 8 tygodnia zbadano 9 chorych. W grupie przypadków z krwotokami u 1 chorego wykonano badanie tk w drugim dniu choroby, u 5 chorych między 7 a 14 dniem, a u 4 chorych między 2 a 4 tygodniem od udaru.

We wszystkich przypadkach po utrwaleniu mózgu w formalinie i przed pobraniem wycinków dokonano na przekrojach czołowych pomiaru liniowego małych ognisk naczyniopochodnego uszkodzenia OUN, nieujawniających się w obrazie tk, mierząc ich wymiar poprzeczny i podłużny. Do badania histopatologicznego pobierano wycinki obejmujące pole rozmiękania lub krwotoku wraz z otaczającą tkanką. Po zatopieniu w parafinie skrawki barwiono fioletem krezyłu, hematoksyliną-eozyną oraz według metody van Gieson, Spielmeijera i Bielschowskiego.

WYNIKI

W grupie przebadanych 35 przypadków było 23 mężczyzn i 12 kobiet w wieku od 35 do 88 lat. Średnia wieku wynosiła 67 lat. W wywiadzie u 19 chorych występowało nadciśnienie, 10 chorych leczyło się na cukrzycę, 16 chorych przeżyło zawał serca. U 12 chorych stwierdzono dwukrotny, u 4 chorych trzykrotny udar mózgu. U pozostałych 19 chorych pierwszy udar był śmiertelny. W okresie przedudarowym większość chorych (26 przypadków) narzekała na bóle i zawroty głowy oraz zaburzenia równowagi, czasami (2 przyp.) połączone z krótkotrwałymi napadami podwójnego widzenia.

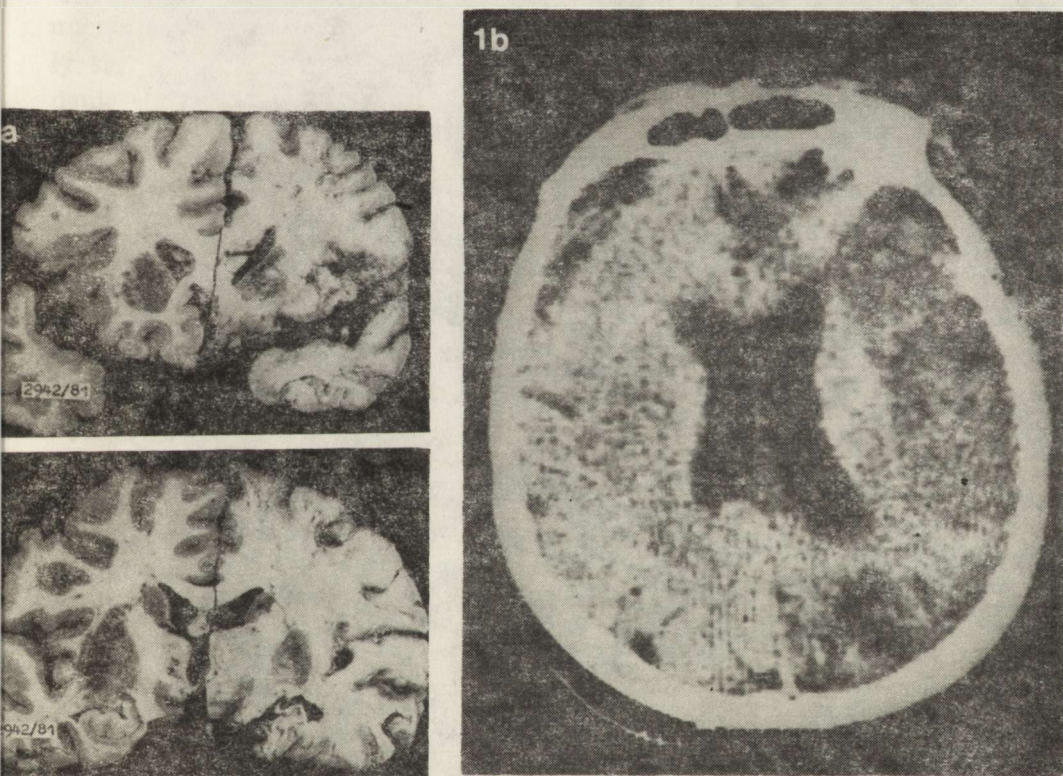
W trakcie rozwijającego się udaru 9 chorych odczuwało drętwienie połowicze kończyn, u 3 chorych w połączeniu z ogniskowymi napadami padaczkowymi. U 17 chorych w momencie udaru wystąpiła utrata przytomności. Najczęściej występowały objawy połowicze prawostronne z niemotą czuciową lub ruchową (16 przyp.), najrzadziej zespoły pniowe (3 przyp.). Okres przeżycia od wystąpienia ostatniego lub jedyne go udaru wahał się od 3 dni do 3 miesięcy.

Badania diagnostyczne

Wykonane u wszystkich chorych badanie płynu mózgowo-rdzeniowego wykazało u 8 z nich podwyższenie poziomu białka od 65 do 174 mg⁰/₀.

Badanie EEG tylko u 8 chorych wskazywało na ogniskowe uszkodzenie OUN przy istniejących rozlanych zmianach. Badaniem angiograficznym u 15 chorych stwierdzono bądź zwolnienie przepływu krwi (6 przyp.), bądź obecność zakrzepów (9 przyp.) w obrębie badanej tętnicy. Badanie scyntygraficzne mózgu u 14 chorych wskazywało na ogniskowe uszkodzenie OUN, u pozostałych 3 badanych chorych było prawidłowe.

Badanie makroskopowe mózgu wykazało proces zanikowy mózgu o znacznym nasileniu, zwłaszcza w obrębie płatów czołowych i ciemniowych w 20 przypadkach. Obrzęk mózgu stwierdzono w 22 przypadkach, a miażdżycę w naczyniach podstawy mózgu w 26 przypadkach. Zakrzepy zamykające światło tętnicy szyjnej wewnętrznej bądź tętnicy środkowej, przedniej lub tylnej mózgu, tętnicy podstawnej albo kręgowej stwierdzono w 12 przypadkach. Wielkość małych ubytków korowych i blizn wahała się od $0,5 \times 2$ cm do 2×3 cm. Wielkość jamek i blizn zlokalizowanych w jądrach podstawy wahała się od $0,2 \times 0,2$ cm do $0,5 \times 1,2$ cm, w istocie białej zaś dochodziła do rozmiarów $1,2 \times 1,5$ cm.

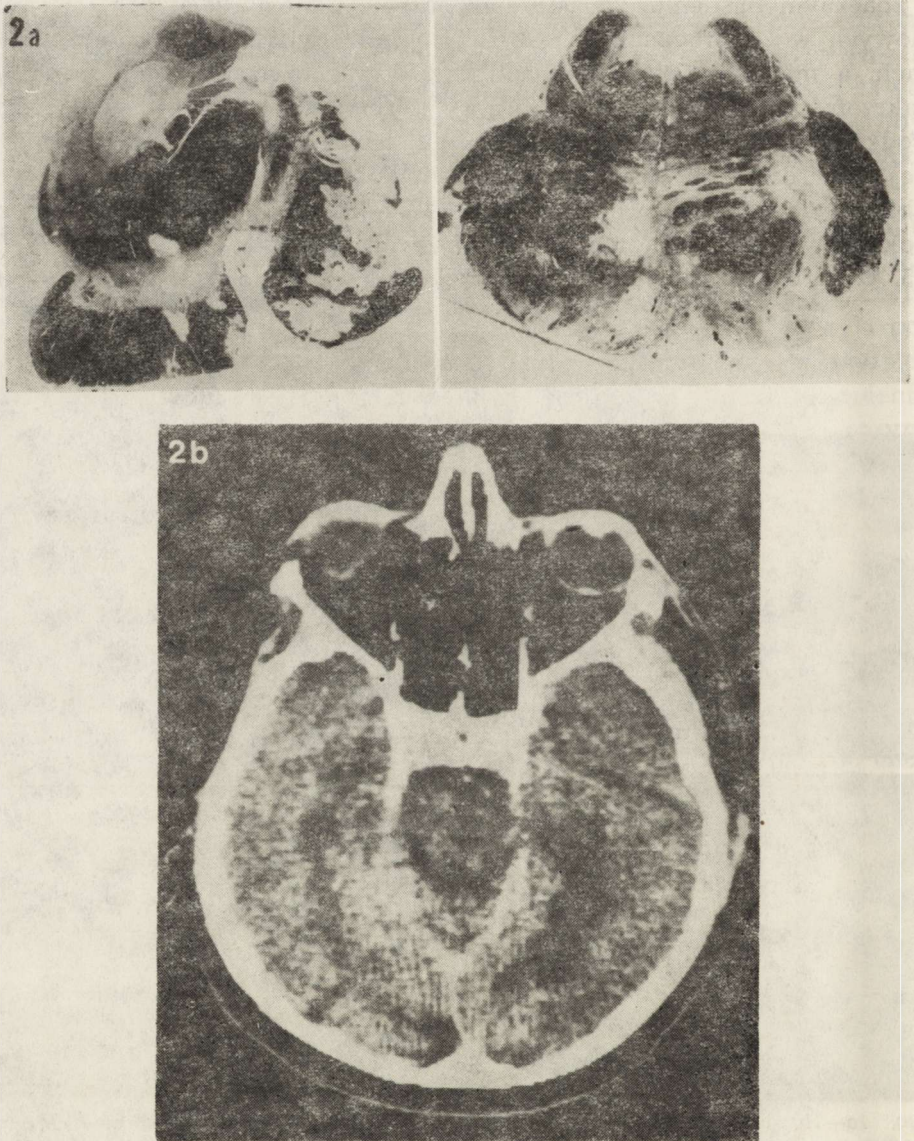


Ryc. 1a—1b. Na przekrojach czołowych mózgu widoczne rozmiękanie korowo-podkorowe w rejonach unaczynienia tętnic przedniej, środkowej i tylnej mózgu — po stronie prawej (ryc. 1a), uchwytne w badaniu skanerowym (ryc. 1b)

Figs 1a—1b. On frontal brain sections on the left side cortico-subcortical softening in the region of vascularization of anterior, middle and posterior cerebral arteries (Fig. 1a), visualized in CT (Fig. 1b)

Czasami w obrębie uszkodzonej struktury anatomicznej obecne były liczne jamki i zmiany bliznowate różnej wielkości.

Analiza obrazu skanerowego oraz wyników badania makro- i mikroskopowego mózgu wykazały pełną zgodność rozległości i umiejscowienia rozmiękania tkanki w 13 przypadkach na 25 przebadanych. W pełni zgodny wynik uzyskano w przypadkach rozległych rozmiękań korowo-



Ryc. 2a—2b. Rozmiękanie w obrębie konaru mózgu oraz części środkowej i bocznej mostu po stronie prawej w barwieniu na osłonki mielinowe (ryc. 2a) oraz obraz tk (ryc. 2b)

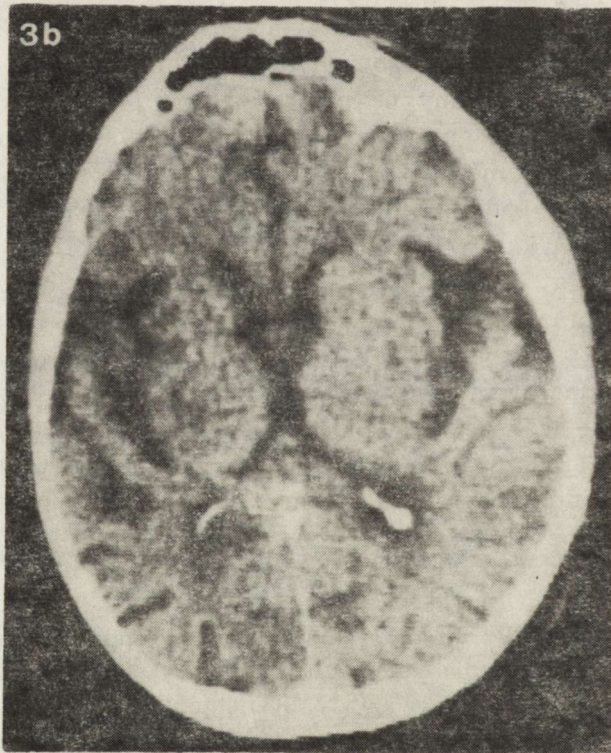
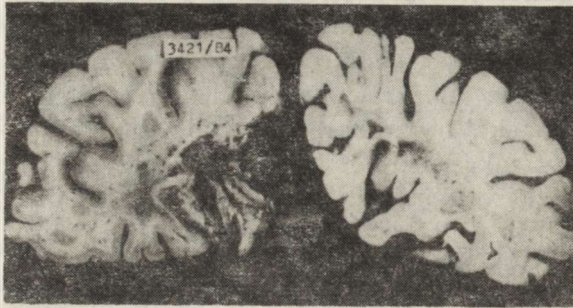
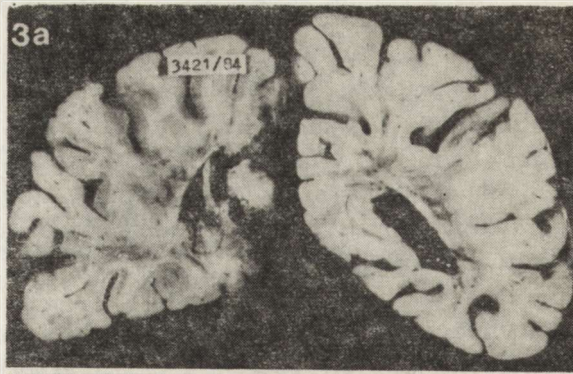
Figs 2a—2b. Softening in the region of cerebral peduncle and central and lateral part of pons on the myelin-stained sections (Fig. 2a) and in CT picture (Fig. 2b)

-podkorowych, zarówno w fazie rozpadu i wczesnych stadiów organizacji, jak i w fazie tworzenia się jam i rozległych blizn korowo-podkorowych, przy lokalizacji ogniska na powierzchni grzbietowo-bocznej mózgu w rejonie unaczynienia tętnicy środkowej i przedniej mózgu (2 przypadki) czy tętnicy środkowej i/lub tętnicy tylnej mózgu (7 przypadków) (ryc. 1). Podobnie uwidoczniły się jamy i blizny w rejonie unaczynienia gałązek głębokich tętnicy przedniej i środkowej mózgu (3 przypadki). W pełni zgodny wynik uzyskano w przypadku rozległego rozmiękania pnia mózgu ze świeżym rozpadem odnóg i części grzbietowej jednego z konarów mózgu oraz obszaru środkowego i bocznego mostu (ryc. 2).

Nie ujawniły się w badaniu skanerowym rozmiękania korowo-podkorowe niszczące biegun skroniowy oraz zakręt skroniowo-potyliczny boczny (1 przypadek), bądź zakręt skroniowo-potyliczny przyśrodkowy (1 przypadek) czy zakręt skroniowy górny (2 przypadki) albo też zakręt czołowy górny i zakręt obręczy (1 przypadek). Podobnie nie ujawniły się rozmiękania korowo-podkorowe zlokalizowane na podstawie płata potylicznego (2 przypadki) oraz na powierzchni przyśrodkowej płata ciemieniowego i potylicznego (2 przypadki) (ryc. 3). Ogniska te nie ujawniły się nawet wtedy, gdy były rozległe i ukrwotocznione. Podobnie badanie skanerowe nie uchwyciło jam i blizn korowo-podkorowych zlokalizowanych wokół szczeliny ostrogowej (1 przypadek), na powierzchni grzbietowo-bocznej mózgu na pograniczu rejonów unaczynienia tętnicy środkowej i tylnej mózgu (5 przypadków) lub też zlokalizowanych w mózdzku (2 przypadki). Nie ujawniły się również w obrazie tk jamki i blizny umiejscowione w istocie białej przykomorowej (8 przypadków), w jądrach podstawy (12 przypadków), w części bocznej śródmózgowia (3 przypadki) oraz w części podstawnej mostu (5 przypadków).

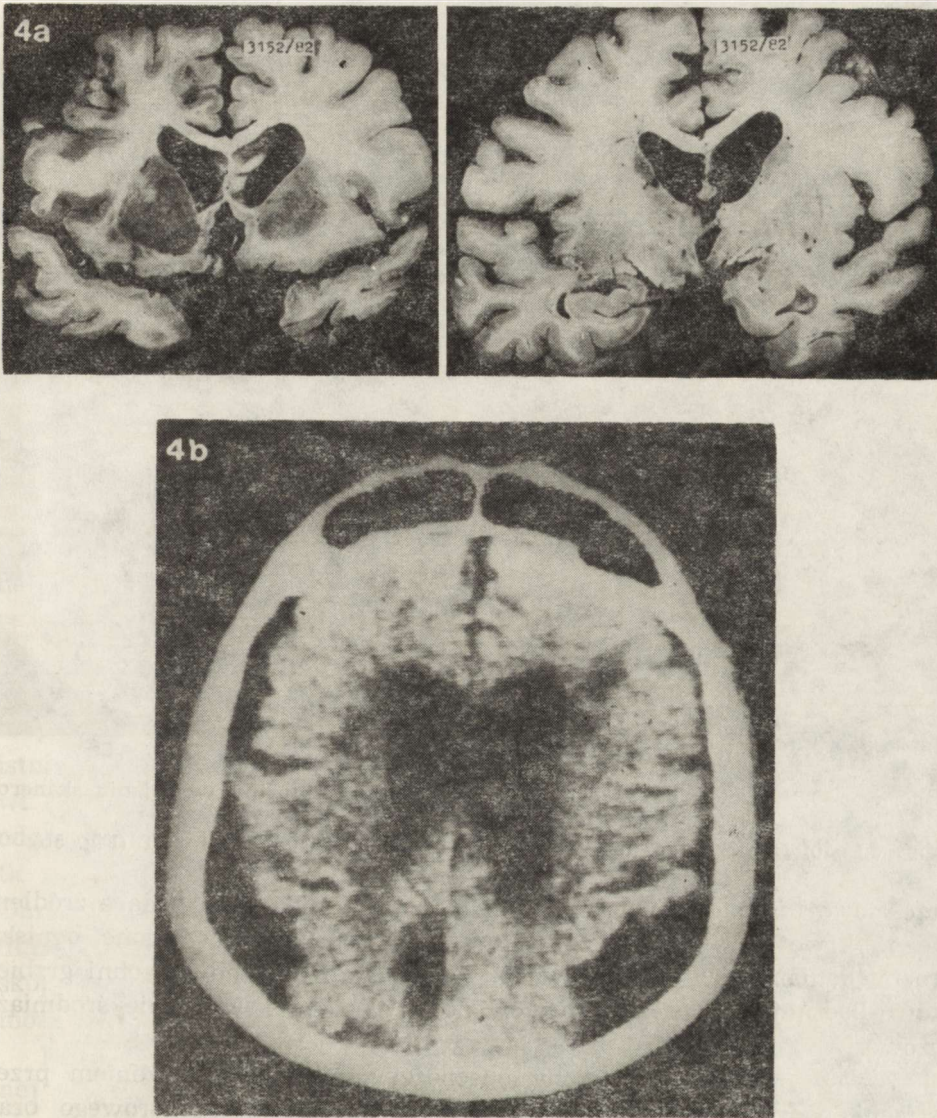
Rozległy rozpad kory i istoty białej, zarówno świeży ukrwotoczniony w rejonie unaczynienia tętnicy przedniej mózgu (1 przypadek), jak i znajdujący się w fazie tworzenia się jamek i blizn w rejonie unaczynienia tętnicy środkowej mózgu (1 przypadek), zinterpretowano w tk w trzecim tygodniu choroby jako znacznie nasilony uogólniony proces zanikowy mózgu. Odwrotnie w dwóch przypadkach wybiórczo nasilony zanik mózgu na jego powierzchni bocznej uznano za bliznę korowo-podkorową (ryc. 4).

W trzech przypadkach niezgodna była ocena umiejscowienia rozmiękania mózgu. W 2 przypadkach pola hipodensyjne obecne były w obrębie płata skroniowego, podczas gdy liczne jamki i blizny zlokalizowane były w torebce wewnętrznej i łupinie albo we wzgórzu po tej samej stronie. W trzecim przypadku pola hipodensyjne widoczne były w obrębie obu płatów czołowych natomiast rozmiękanie obejmowało korę i istotę białą obu płatów ciemieniowych. Dokładna analiza morfologiczna skrawków w serii nieciągłej nie wyjaśniła przyczyn tej niezgodności lokalizacyjnej.



Ryc. 3a—3b. Rozmiękanie korowo-podkorowe na powierzchni przyśrodkowej lewego płata ciemieniowego i potylicznego (ryc. 3a) nie ujawniające się w obrazie skanerowym (ryc. 3b)

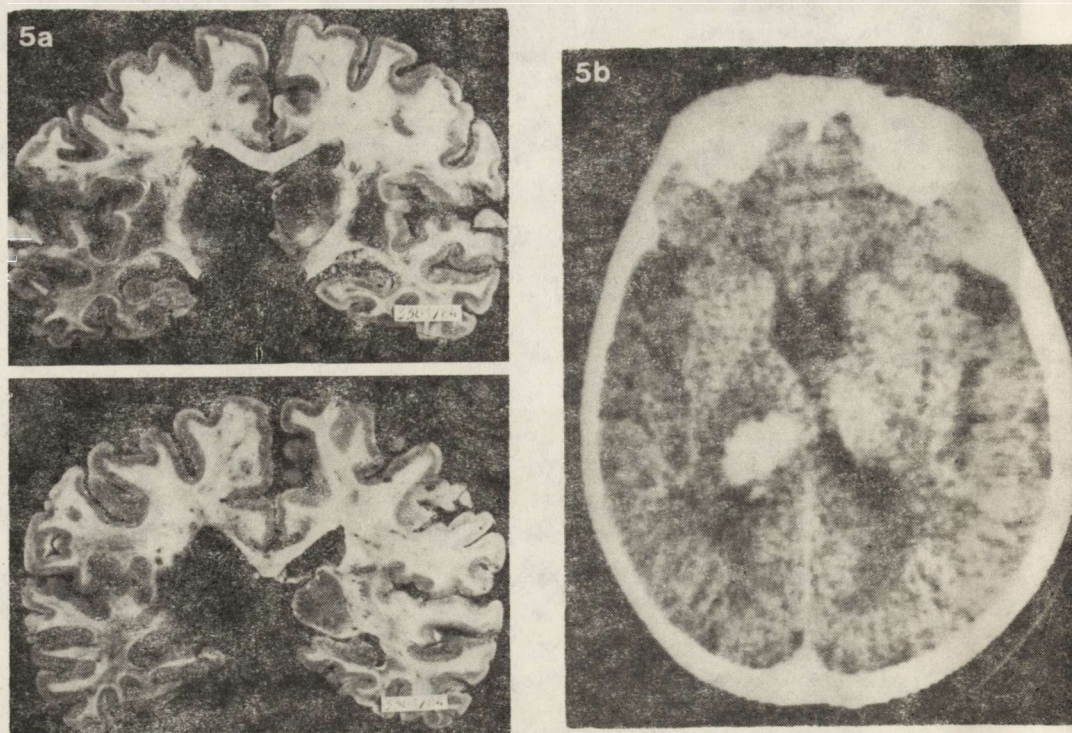
Figs 3a—3b. Cortico-subcortical softening on medial surface of the left parietal and occipital lobes (Fig. 3a) not visualized in CT (Fig. 3b)



Ryc. 4a—4b. Na przekroju czołowym widoczny zanik mózgu (ryc. 4a) naśladujący w obrazie tk rozmiękanie korowo-podkorowe w fazie tworzenia blizny (ryc. 4b)

Figs 4a—4b. On frontal section brain atrophy (Fig. 4a) imitating CT picture of cortico-subcortical necrosis in the period of scar formation (Fig. 4b)

We wszystkich 10 przypadkach krwotoków mózgu badanie skanero-
we wykazało pełną zgodność lokalizacyjną. Krwotoki były różnie umiej-
scowione: podtwardówkowo, w szczelinie między półkulami mózgu,
w istocie białej płata czołowego lub skroniowego, w jądrach podstawy
oraz we wzgórzu (ryc. 5). W jednym przypadku ujawnił się w tk krwo-
tok komorowy, natomiast nie ujawniło się ognisko krwotoczne niszczące



Ryc. 5a—5b. Krwotok do lewego wzgórza (ryc. 5a) uchwytany w badaniu skanerym (ryc. 5b)

Figs 5a—5b. Hemorrhage in left thalamus (Fig. 5a) visualized in CT (Fig. 5b)

częściowo torebkę wewnętrzną i ciało jądra ogoniastego, będące źródłem tegoż krwotoku komorowego. Różnoczasowe, ukrwotoczone ogniska rozmiękania korowo-podkorowego, zlokalizowane na powierzchni grzbietowo-bocznej, mózgu zinterpretowano w tk jako krwawienie śródmiaższowe.

Zawsze zgodne były oceny obecności zaniku z poszerzeniem przestrzeni podpajęcznej, zbiorników mózgu czy układu komorowego oraz obecności utrzymującego się przez wiele tygodni obrzęku mózgu, zniekształcającego m.in. układ komorowy po stronie ogniska.

OMÓWIENIE

Analiza całego materiału obejmującego 35 przypadków wykazała, że w procesie naczyniopochodnego uszkodzenia OUN najlepiej uwidaczniają się w tk krwotoki. W ujawnianiu się zawałów białych pierwszoplanową rolę odgrywają zarówno umiejscowienie, jak i rozległość ogniska. Najlepiej uwidaczniają się zawały zlokalizowane na powierzchni grzbieto-

wo-bocznej mózgu, jeśli ich wielkość przekracza pole o rozmiarach 2 cm \times 3 cm. Nie ujawniają się zawały nawet rozległe, zarówno blade jak i ukrwotocznione, świeże lub zorganizowane, zlokalizowane w otoczeniu szczeliny ostrogowej, na podstawie mózgu w obrębie płata skroniowego lub potylicznego, bądź umiejscowione w mózdzku. Rozmiękanie pnia mózgu jest uchwytnie w obrazie tk przy uszkodzeniu co najmniej 1/4 objętości mostu lub śródmózgowia. Nieuchwytnie są również w obrazie tk jamki w jądrach podstawy, jeżeli ich wymiary są mniejsze niż 0,5 cm \times 1,2 cm, a w istocie białej — 1,2 cm \times 1,5 cm.

Bardziej precyzyjne zlokalizowanie w tk ognisk rozmiękania, zwłaszcza niewielkich, byłoby pewnie możliwe przy użyciu środka cieniującego, co podkreślają w swoich pracach Grądzki i wsp. (1980), Kohlmeyer (1980), i Gołąbek (1981). Jednak użycie kontrastu, jak wynika z badań Kendalla i Pullicino (1980) nie jest dla chorego obojętne i może pogarszać rokowanie w naczyniopochodnym uszkodzeniu mózgu. W świetle naszych wyników struktury tylnego dołu czaszkowego, zwłaszcza pień mózgu, należą nadal do trudnych diagnostycznie obszarów tk, co podkreślano już w cytowanym poprzednio piśmiennictwie.

Morfologicznym podłożem pól hipodensyjnych w mózgu w obrazie skanerowym jest rozpad tkanki. Na ich niejednorodny wygląd w tk mają wpływ różne fazy rozpadu, resorpcji i organizacji tkanki, współistniejące obok siebie w ognisku rozmiękania oraz towarzyszący zawałowi obrzęk ischemiczny. Ten ostatni jest również przyczyną nieostrego odgraniczenia pól hipodensyjnych, a także nie ujawniania się w obrazie tk małych jamek i blizn śródmiaższowych, zwłaszcza w istocie białej. Obrzęk tkanki utrzymywał się w naszym materiale przez wiele tygodni, dłużej niż przyjmuje się w pracach bez szczegółowej weryfikacji mikroskopowej (Crisi i wsp. 1984). Rozległe ukrwotocznienie zawału bladego może naśladować w obrazie tk krwotok śródmiaższowy.

Rozmiękanie w fazie organizacji łącznotkankowo-glejowej niepełnej w sąsiedztwie przestrzeni płynowych, powodując wybiórcze ubytki elementów tkanki nerwowej odpowiada w tk zanikowi dotkniętej okolicy. Natomiast procesy zanikowe ograniczone do poszczególnych płatów bądź ich części mogą naśladować w tk naczyniopochodne bliznowacenie tkanki.

Na podstawie przeprowadzonych badań, podobnie jak inni autorzy (Harrison i wsp. 1978; Luzatti i wsp. 1979; Valdimarsson i wsp. 1982; Crisi i wsp. 1984), uważamy badanie tk mózgu za bardzo przydatne w różnicowaniu procesów patologicznych toczących się w OUN. Pozwala ono na wykrycie rozległych obszarów naczyniopochodnych uszkodzeń mózgu, a w odniesieniu do krwotoku jest szczególnie przydatne jako metoda nieinwazyjna, wykrywająca nawet niewielkie ogniska.

СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ КОМПЬЮТЕРНОЙ ТОМОГРАФИИ С МОРФОЛОГИЕЙ МОЗГОВЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

В 35 случаях аутопсических больных, страдавших энцефаломалацией (25 человек) или мозговым кровоотечением (10 человек), была проведена диагностическая томография без применения контраста. Средний возраст обследуемой группы — 67 лет.

Сравнение сканеровой картины с результатами макро- и микроскопических исследований мозга показало, что среди сосудистых повреждений центральной нервной системы компьютерная томография лучше обнаруживает кровоотечения.

При диагностировании анемического инфаркта большое значение имело положение и обширность очага. Лучше всего обнаруживаются инфаркты на дорсально-латеральной поверхности мозга, если их размеры превышают 2 см × 3 см, в то время как не обнаруживаются даже обширные инфаркты, как анемические, так и геморрагические (ранние и поздние) расположенные в области шпорной борозды, на основании мозга, в пределах височной и затылочной долей, либо в мозжечке. Размягчение ствола мозга проявляется на компьютерной томограмме, если разрушена, по крайней мере, 1/4 объема моста или среднего мозга. Томограмма не отмечает также лакун в базальных ганглиях, имеющих размеры менее 0,5 см × 1,2 см, а в белом веществе — менее 1,2 см × 1,5 см.

Морфологической причиной появления участков пониженной плотности является разрушение тканей. Их неоднородный характер на томограмме объясняется различными фазами разрушения, резорбции и организации тканей в области размягчения и сопутствующим инфаркту отеком. Отеком мозга объясняется также нечеткость границ участков пониженной плотности и отсутствие на томограмме мелких внутритканевых лакун и рубцов, в особенности, у белого вещества. Обширная кровоотечивость при анемическом инфаркте создает на компьютерной томограмме картину, напоминающую паренхиматозное кровоотечение.

Размягчение мозга на этапе неполной глио-соединительнотканевой организации вблизи пространства соинномозговой жидкости соответствует на компьютерной томограмме картине атрофии затронутого процессом участка. Процессы атрофии, не выходящие за пределы отдельных долей или их частей можно спутать на компьютерной томограмме с рубцеванием тканей в ходе сосудистых заболеваний.

CONFRONTATION OF COMPUTER TOMOGRAPHY PICTURES WITH THE MORPHOLOGY OF CHANGES IN THE BRAIN DUE TO VASCULAR DISEASES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Summary

Thirty five autopsy cases were examined in which in the course of cerebral softening (25 subjects) or hemorrhage (10 subjects) computed tomography (CT) of the brain without contrast had been performed, for diagnostic purposes. The mean age of the patients was 67 years.

Analysis of the scanning picture and of the results of macro- and microscopic examination revealed that among vasogenic lesions hemorrhages are best visualised in CT. In revealing pale infarctions the localization and extent of the focus are most important. Best visible are infarctions localized on the dorso-lateral brain surface, if their dimensions exceed a surface area of 2 × 3 cm, whereas even extensive infarcts, both pale and hemorrhagic, fresh or organized cannot be visualized when localized in the surrounding of the calcarine fissure, on the brain base within the temporal or occipital lobe or in the cerebellum. Brain stem

softening appears in the CT picture when at least 1/4 of the pons or mesencephalon volume is destroyed. Lacunae in the basal ganglia are not noticeable in the CT if their dimensions are smaller than 0.5×1.2 cm, and in the white matter 1.2×1.5 cm.

The morphological substrate for hypodense fields in the CT picture consists of disintegrated brain tissue. Their nonuniform appearance is due to various phases of tissue disintegration, resorption and organization coexisting within the area of softening, and the ischemic edema accompanying infarction. Brain edema persisting for many weeks is also the cause of the obliterated delimitation of the hypodense fields and the absence in the CT of small cavities and intraparenchymal scars especially in the white matter.

Extensive hemorrhage within pale infarction may imitate CT picture of parenchymal hemorrhage. Brain softening in the phase of incomplete glial-mesenchymal organization in the neighbourhood of CSF-spaces, causing selective loss of nervous tissue elements corresponds in the CT picture to atrophy of the affected region. Atrophic processes limited to particular lobes or their parts may imitate in CT vasogenic scar formation.

PIŚMIENICTWO

1. Crisi G., Colombo A., de Santis M., Guerzoni M. C., Calo M., Puzetti P.: CT and cerebral ischemic infarcts. Correlations between morphological and clinico-prognostic findings. *Neuroradiology*, 1984, 26, 101—115.
2. Davis K. R., Taveras J. M., New P. E. J., Schnur J. A., Roberson G. H.: Cerebral infarction diagnosis by computerized tomography. Analysis and evaluation of findings. *Amer. J. Roentgen.*, 1975, 124, 643—660.
3. Gołąbek R.: Obraz tomograficzny komputerowy (tk) ognisk niedokrwienia mózgu w przypadku zamknięcia tętnicy szyjnej wewnętrznej. *Wiad. Lek.*, 1981, 34, 297—301.
4. Grądzki J., Konkiewicz J., Paprzycki W.: Problemy rozpoznawcze tomografii komputerowej procesów ischemicznych mózgu. W: Tomografia komputerowa głowy i standaryzacja badań w neuroradiologii. VI Konferencja Naukowa Neuroradiologów Polskich, Poznań 1979. Red. J. Grądzki, Poznań, 1980.
5. Harrison M. J. G.: The use of C, A. T. in cerebral infarction. The First European Seminar on Computerized Axial Tomography in Clinical Practice. Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1978.
6. Hounsfield G.: cyt. za: Kozłowski i wsp. 1980.
7. Kendall B. E., Pullicino P.: Intravascular contrast injection in ischaemic lesions. Effect on prognosis. *Neuroradiology*, 1980, 19, 241—243.
8. Kohlmeyer K.: Znaczenie angiografii mózgowej i tomografii komputerowej. W: Tomografia komputerowa głowy i standaryzacja badań w neuroradiologii. VI Konferencja Naukowa Neuroradiologów Polskich, Poznań 1979. Red. J. Grądzki 1980.
9. Luzatti C., Scotti G., Gattoni A.: Further suggestion for cerebral CT localization. *Cortex*, 1979, 15, 483—490.
10. Mariani C., Spinnler H., Sterzi R., Vallar G.: Bilateral perisylvian softenings: Bilateral anterior opercular syndrome Foix-Chavany-Marie Syndrome. *J. Neurol.*, 1980, 223, 269—284.
11. Valdimarsson E., Bergvall U., Samuelsson K.: Prognostic significance of cerebral computed tomography results in supratentorial infarction. *Acta neurol. Scand.*, 1982, 65, 133—145.

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

RYSZARD PLUTA

WCZESNE ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W ZWOJACH
PODSTAWY, MÓZDŻKU I RDZENIU PRZEDŁUŻONYM
PO CAŁKOWITYM 30-MINUTOWYM NIEDOKRWIENIU MÓZGOWIA

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa

Strukturalne uszkodzenia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu mają zróżnicowany charakter w zależności od stosowanego modelu doświadczalnego i występują w różnych okresach po incydencie niedokrwieniowym (Weinberger i wsp. 1940; Hossmann, Sato 1970; Sainio 1972; Hossmann, Hossmann 1973; Pluta 1982). Dotyczą one przede wszystkim formacji szarych i mają charakter bądź zmian uogólnionych, z predylokcyjnym zajęciem kory mózgu i mózdzku (Nemoto i wsp. 1977; Kalimo i wsp. 1979; Kolata 1979; Pulsinelli, Bierley 1979), bądź też wybiórczo ograniczonych do struktur podkorowych, głównie gałki bladej, prążkowania i wzgórza (Hossmann, Zimmermann 1974; Marshall i wsp. 1975). We wcześniejszych własnych badaniach mikroskopowo-elektronowych przedstawiono zmiany występujące po całkowitym 30-minutowym niedokrwieniu mózgowia. Dotyczyły one czuciowo-ruchowej okolicy kory mózgu (Pluta, Gajkowska 1984). Oprócz typowych dla zespołów hipoksyjno-niedokrwieniowych nieprawidłowości ultrastrukturalnych neuronów i astrocytów stwierdzono charakterystyczne uszkodzenia dotyczące selektywnie ruchowych komórek nerwowych. Wyrażały się one nagromadzeniem w ich karioplazmie licznych struktur pęcherzowatych. Ponadto w korze ruchowej występowało bardzo znaczne obrzmienie astrocytów, których okołonaczyniowe wypustki uciskały naczynia włosowate, prowadząc w skrajnych przypadkach do całkowitego zamknięcia ich światła (Pluta 1982; Pluta, Gajkowska 1984). Warunki te, a zwłaszcza upośledzenie zaopatrzenia tkanki w krew prowadziły do głębokich, nieodwracalnych uszkodzeń neuronów ruchowych. Zachowanie ich strukturalnej integralności i czynnościowej pełnosprawności ma według Kolaty (1979), podstawowe znaczenie dla przeżycia zwierząt po całkowitym długotrwałym niedokrwieniu mózgowia.

Celem obecnego opracowania było prześledzenie stanu innych struktur ośrodkowego układu nerwowego (OUN), mających również istotne znaczenie dla resuscytacji i reanimacji zwierząt po całkowitym niedokrwieniu mózgowia. Badaniami mikroskopowo-elektronowymi objęto jądra podstawy, mózdzek i rdzeń przedłużony zwierząt, u których obserwowano powrót czynności bioelektrycznej mózgowia po całkowitym 30-minutowym niedokrwieniu.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 13 królikach, samcach, o masie ciała 2,5—3,5 kg, u których wywoływano całkowite 30-min niedokrwienie mózgowia. Niedokrwienie uzyskiwano przez wewnątrzkatkowe zamknięcie pnia ramiennie-głowego, lewej tętnicy podobojczykowej oraz obu tętnic piersiowych wewnętrznych z dojsścia nadmostkowego bez wykonywania torakotomii (Pluta 1982, 1985). W celu uniknięcia obocznego napływu krwi do mózgowia obniżano obwodowe ciśnienie tętnicze do 70—50 mm Hg, metodą kontrolowanego skrwawiania przez tętnicę udową do kompensatora ciśnienia (Pluta, Kapuściński 1980; Pluta 1982, 1985).

Zwierzęta usypiano pentobarbitem (Nembutal 35 mg/kg masy ciała) podawanym dożylnie (i.v.) z dodatkiem 2,5 ml Pyralginy, jako środka przeciwbólowego. Następnie wykonywano tracheostomię i po unieruchomieniu Tricuraniem (4 mg/kg i.v.) prowadzono kontrolowaną wentylację płuc powietrzem pokojowym (Pluta 1981). Po niedokrwieniu stosowano mieszaninę powietrza z tlenem przy szybkości przepływu tlenu wynoszącej 0,25—0,5 l/min, w razie potrzeby podczas trwania doświadczenia dodatkowo podawano dożylnie Nembutal, Pyralginę i Tricuran (Pluta 1982). Jedną tętnicę i żyłę udową kaniulowano w celu pomiaru ciśnienia krwi i wstrzyknięć leków. Czynność bioelektryczną mózgu rejestrowano za pomocą aparatu EEG (Accutrace-8, Beckman), w postaci elektrokortykogramu (ECoG). Na tym samym aparacie rejestrowano równocześnie zintegrowaną aktywność nerwu przeponowego za pomocą srebrnej dwubiegunowej elektrody oraz ciśnienie tętnicze krwi i EKG (odprowadzenie II). Kontrolowano temperaturę ciała zwierząt w *rectum* oraz pH, pO₂ i pCO₂ w krwi tętniczej. Czas przygotowania doświadczenia wynosił 1,5 godz.

Krażenie mózgowe przywracano przez zdjęcie zacisków z wszystkich tętnic doprowadzających krew. W czasie niedokrwienia i po niedokrwieniu ciśnienie tętnicze krwi utrzymywano za pomocą retransfuzji własnej krwi zwierzęcia oraz dożylnych wlewów noradrenaliny (2—4 mg na 100 ml 0,9% NaCl). Po wznowieniu czynności ośrodków naczynioruchowych ciśnienie tętnicze krwi utrzymywało się bez wspomagania farmakologicznego.

Grupę kontrolną stanowiły 3 króliki, u których wykonywano pełną preparatykę chirurgiczną z wyjątkiem zaciśnięcia tętnic doprowadzających, które utrzymywano w narkozie pentobarbitalowej przez 3 godz.

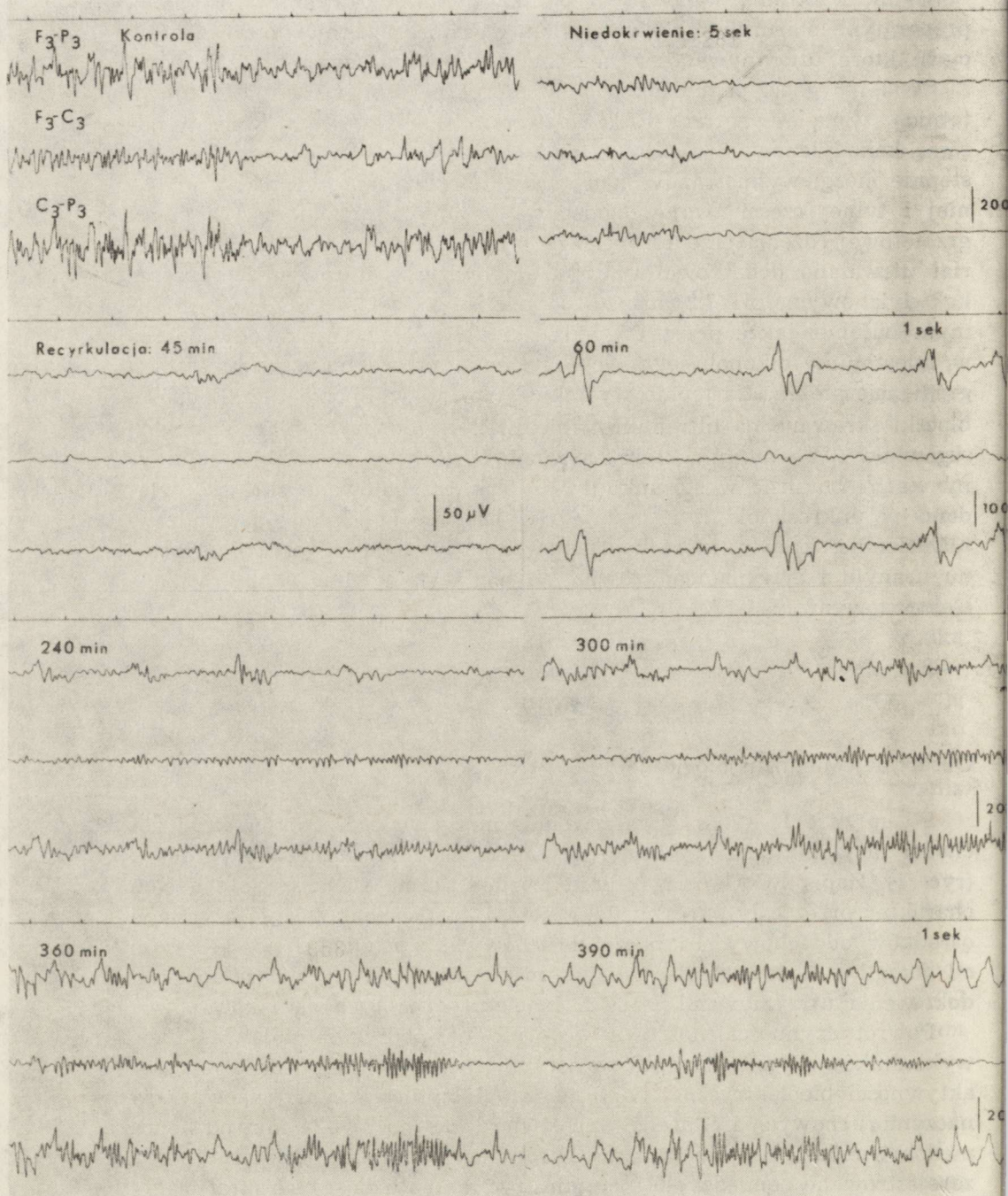
W 3 i 6 godz. po niedokrwieniu, mózgi perfundowano przez prawą tętnicę szyjną wewnętrzną 1,5% roztworem aldehydu glutarowego w buforze kakodylanowym o pH 7,2, pod ciśnieniem około 80 mm Hg. Następnie mózgi wyjmowano z jamy czaszki i pobierano wycinki z przedniej i tylnej części zwojów podstawy, z kory mózdzku oraz z części grzbietowej rdzenia przedłużonego na wysokości zasuwki. Pobrany materiał utrwalano dodatkowo w 1,5% aldehydzie glutarowym w buforze kakodylanowym, pH 7,2, przez 1,5 godz. oraz w 1% OsO₄ w tym samym buforze, także przez 1,5 godz. Po utrwaleniu tkanek odwadniano w mieszaninie alkoholu etylowego i tlenu propylenu o wzrastającym gradiencie stężeń. Następnie wycinki zatapiano w Eponie 812. Eponowe bloczki skrawano na ultramikrotomie LKB-III do uzyskania półcienkich skrawków (0,5—1,0 μm), które barwiono 1% roztworem błękitu toluidyny w 1% boraksie w stosunku 1:10. Tak przygotowane skrawki oglądano w mikroskopie świetlnym. Z wybranych wycinków sporządzano ultracienkie skrawki, które kontrastowano 2% wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

WYNIKI

Obserwacje neurofizjologiczne

Po upływie 11—20 s od zatrzymania mózgowego przepływu krwi dochodzi do zaniku spontanicznej czynności bioelektrycznej kory mózgu (ryc. 1). Zapis ECoG osiągał linię izoelektryczną, zachowując ten sam charakter przez cały okres niedokrwienia. Zanik spontanicznej czynności ośrodków oddechowych i naczynioruchowych występował po 3—6 min od początku niedokrwienia. Od tego momentu, w dalszych okresach niedokrwienia utrzymywała się cisza bioelektryczna tych ośrodków.

Powrót czynności mózgowia oceniano na podstawie pojawiania się wykładników czynności ośrodków naczynioruchowych i oddechowych oraz aktywności bioelektrycznej kory mózgu. Restytucję czynności ośrodków naczynioruchowych i oddechowych stwierdzano po 24—35 min od końca niedokrwienia. Pierwsze oznaki powrotu czynności bioelektrycznej kory zarejestrowano pomiędzy 45 a 60 min (ryc. 1), natomiast charakter ciągly zapisu ECoG około 82—104 min po niedokrwieniu. Po 6 godz. obserwacji uzyskane zapisy nie różniły się pod względem częstotliwości fal od zapisów wykonanych bezpośrednio przed niedokrwieniem. Amplituda fal w tym czasie osiągała 70—90% amplitudy kontrolnej (ryc. 1).



Ryc. 1. Zmiany ECoG w całkowitym 30-min niedokrwieniu mózgowia. Stała czasu 0,03 s

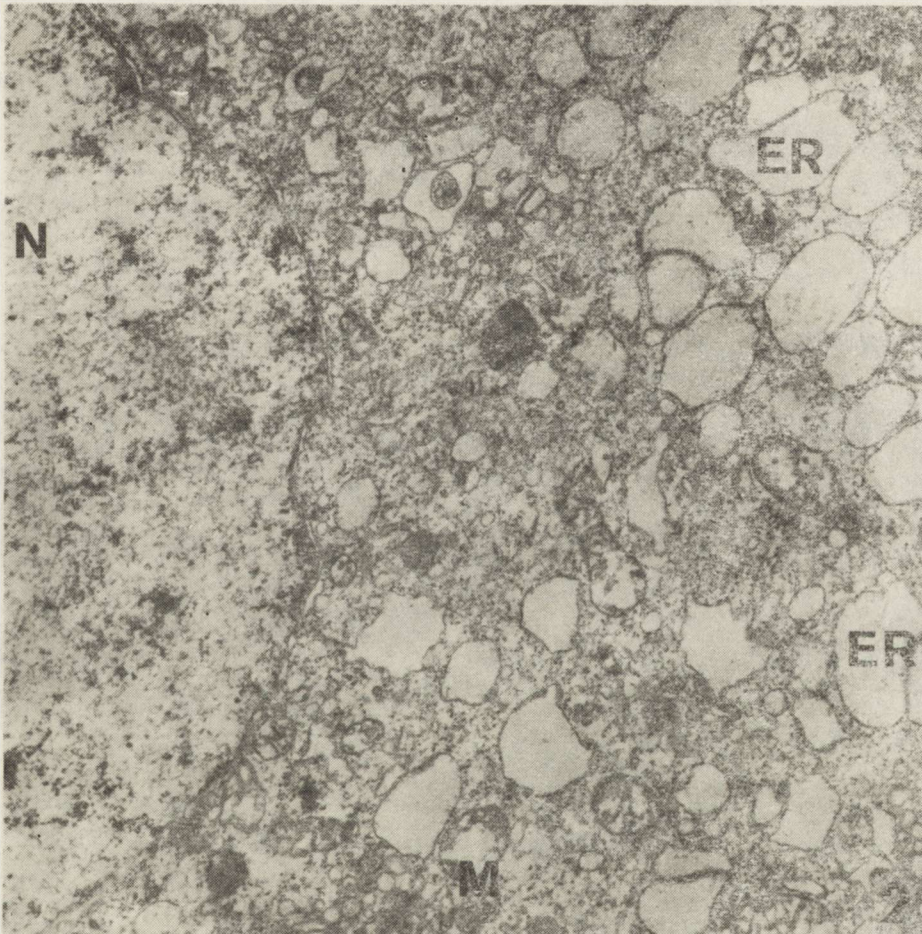
Fig. 1. Changes of ECoG in complete 30-min cerebral ischemia. Time constant 0.03 s

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe

Kontrola. Obraz morfologiczny wycinków tkankowych z mózgow zwierząt kontrolnych nie odbiegał od stwierdzonego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. Mikroskopowo-elektronowy obraz komórek nerwowych i glejowych był identyczny z opisami Peter-sa i wsp. (1976) w prawidłowym OUN ssaków.

Zwierzęta doświadczalne

Zwoje podstawy. Materiał pobrany z przedniego i tylnego odcinka jąder podstawy wykazywał podobny charakter zmian w neuronach i gleju. Różniły się one natomiast nasileniem w zależności od czasu przeży-

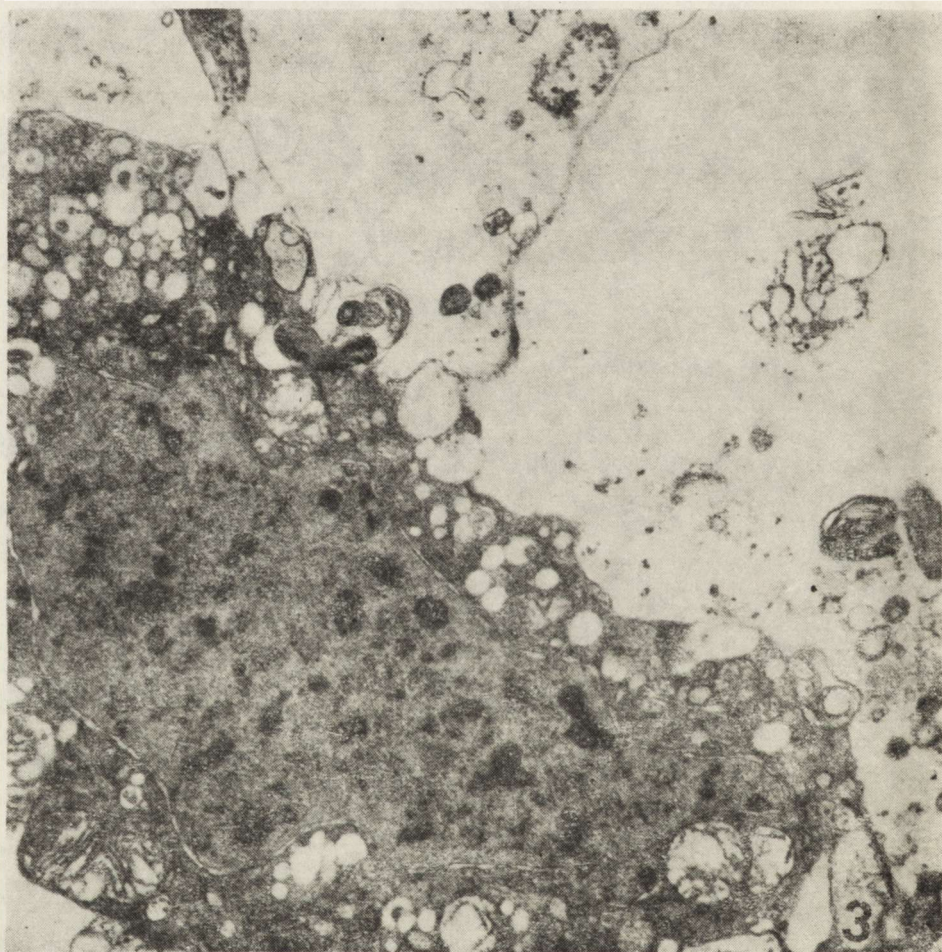


Ryc. 2. Zwoje podstawy, odcinek przedni. Fragment neuronu. W cytoplazmie poszerzone kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER) oraz obrzmiałe mitochondria (M). N — jądro komórkowe. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 3 godz. Pow. 9 000 ×

Fig. 2. Anterior part of basal ganglia. Fragment of neuron. In cytoplasm numerous distended channels of granular endoplasmic reticulum (ER) and swollen mitochondria (M). N — cellular nucleus. 30-min ischemia, survival time 3 h. × 9 000

cia po niedokrwieniu. W 3 godzinie obserwacji wszystkie neurony z przednich odcinków zwojów podstawy wykazywały znaczne nieprawidłowości w obrazie cytoplazmy. Kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej były znacznie rozdęte i pokryte nielicznymi rybosomami (ryc. 2). Aparat Golgiego był miernie rozwinięty, a mitochondria wykazywały cechy obrzmienia (ryc. 2). Po 6 godz. zmiany w neuronach były bardziej nasilone. W znacznej części komórek, ciężkie uszkodzenia ultrastrukturalne wskazywały na ich dezintegrację (ryc. 3).

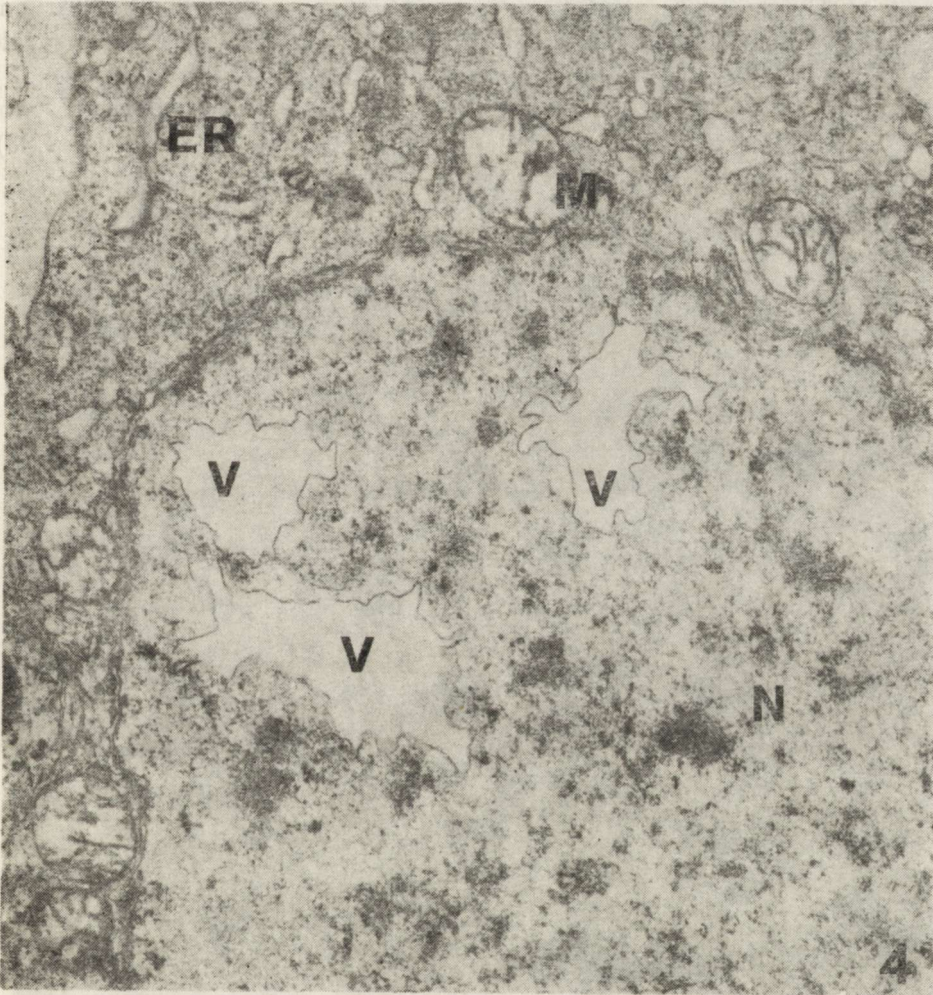
Nieprawidłowości ultrastrukturalne neuronów tylnego odcinka zwojów podstawy po 3 godz. miały niewielkie nasilenie. Stwierdzano jedy-



Ryc. 3. Zwoje podstawy, odcinek przedni. Fragment neuronu i dendrytu z ciężkim uszkodzeniem ultrastrukturalnym, wskazującym na ich dezintegrację. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 6 godz. Pow. 9375 ×

Fig. 3. Anterior part of basal ganglia. Fragment of neuron and dendrite with severe ultrastructural impairment indicating their disintegration. 30-min ischemia, survival time 6 h. × 9375

nie nieznaczne poszerzenie pojedynczych kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej oraz pojedyncze mitochondria o cechach obrzmienia (ryc. 4). W cytoplazmie dominowała gładka siateczka śródplazmatyczna. W pojedynczych przypadkach spostrzegano obecność tworów pęcherzowatych i nieregularnych skupisk chromatyny w jądrach komórek nerwowych (ryc. 4). Po 6 godz. obraz jąder komórkowych był prawidłowy, utrzymywały się natomiast nieprawidłowości ultrastrukturalne cyto-

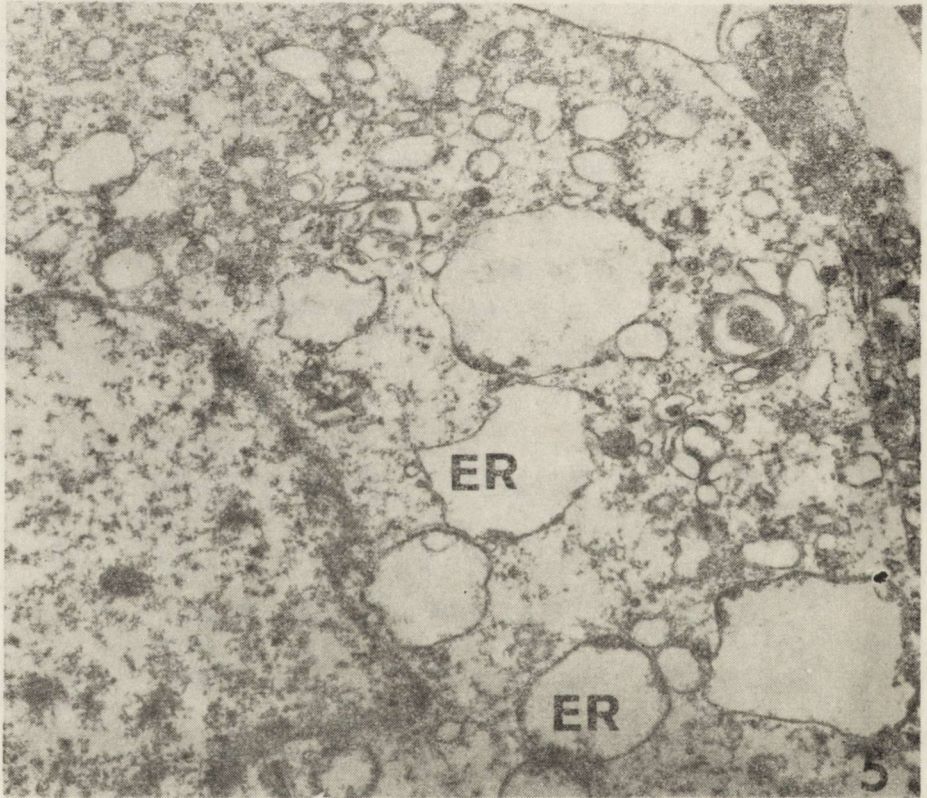


Ryc. 4. Zwoje podstawy, odcinek tylny. Fragment jądra (N) i cytoplazmy neuronu. W jądrze struktury pęcherzowate (V). W cytoplazmie widoczna gładka siateczka śródplazmatyczna i nieznacznie poszerzone kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER) oraz obrzmiałe mitochondria (M). Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 3 godz. Pow. 11 250 ×

Fig. 4. Posterior part of basal ganglia. Neuron. Fragment of nucleus (N) and cytoplasm. In nucleus vacuole-like structures (V). In cytoplasm smooth endoplasmic reticulum, slightly dilated channels of granular endoplasmic reticulum (ER) and swollen mitochondria (M) 30-min ischemia, survival time 3 h. × 11 250

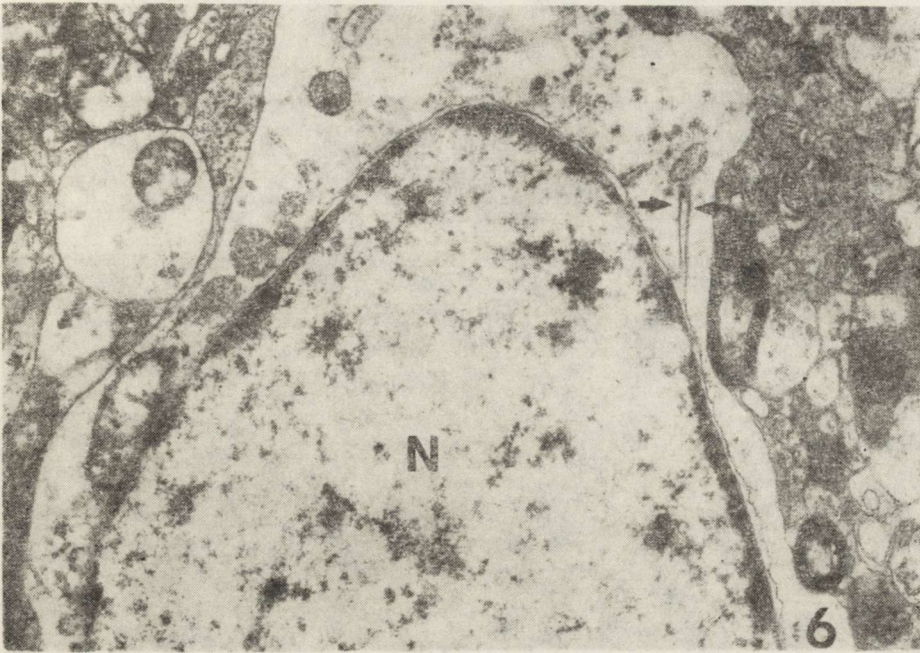
plazmy w postaci obrzmienia mitochondriów i poszerzenia kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ryc. 5).

Astrocyty w obu odcinkach zwojów podstawy w 3 godz. po niedokrwieniu wykazywały cechy obrzmienia, obejmującego zarówno perykariony, jak i wypustki. Jądra astrocytów były duże, jasne, z niewielką ilością chromatyny skupionej w agregaty w pobliżu otoczki jądrowej, która wykazywała nieregularne poszerzenia między jej zewnętrzną i wewnętrzną błoną. Błona zewnętrzna tworzyła uwypuklenia do cytoplazmy (ryc. 6). Cytoplazma zawierała głównie pojedyncze obrzmiałe mitochondria. Po 6 godz. zmiany patologiczne astrocytów nasilały się. Wyrażało się to przede wszystkim masywnym obrzmieniem wypustek (ryc. 7). Błona zewnętrzna otoczki jądrowej była nieregularnie pofałdowana, tworząc wielkie pęcherzowate wpuklenia w obręb cytoplazmy (ryc. 7, 8).



Ryc. 5. Zwoje podstawy, odcinek tylny. Neuron — fragment jądra (N) i cytoplazmy z licznymi rozdętymi kanałami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER). Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 6 godz. Pow. 8 000 ×

Fig. 5. Posterior part of basal ganglia. Neuron — fragment of nucleus (N) and cytoplasm with numerous distended channels of granular endoplasmic reticulum (ER). 30-min ischemia, survival time 6 h. × 8 000



Ryc. 6. Zwoje podstawy, odcinek przedni. Astrocyt z dużym jasnym jądrem (N) z niewielką ilością chromatyny skupionej w agregaty w pobliżu otoczki jądrowej. Zewnętrzna blaszka otoczki jądrowej uwypuklona na znacznej przestrzeni (strzałki) do cytoplazmy. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 3 godz. Pow. 11 250 ×

Fig. 6. Anterior part of basal ganglia. Astrocyte with large light nucleus (N) with small amount of chromatin forming aggregates in the vicinity of nuclear envelope. Outer membrane of nuclear envelope protrudes into cytoplasm (arrows). 30-min ischemia, survival time 3 h. × 11 250

Rdzeń przedłużony. W neuronach zarówno jasnych, jak i ciemnych, obecne były duże jądra z głębokimi wgłębieniami i nieznacznymi poszerzeniami między zewnętrzną oraz wewnętrzną błoną otoczki jądrowej (ryc. 9). W cytoplazmie obserwowano liczne obrzmiałe mitochondria oraz duże ilości pęcherzykowatej siateczki śródplazmatycznej gładkiej. Kanaly ziarnistej siateczki śródplazmatycznej były znacznie poszerzone (ryc. 9). W 6 godz. po niedokrwieniu zmiany patologiczne w neuronach były bardziej zaawansowane. Zwraçało uwagę obkurczenie i zagęszczenie karyoplazmy jąder.

Zmielinizowane włókna nerwowe w 3 godz. po niedokrwieniu wykazywały nieprawidłowości polegające na poszerzeniu przestrzeni między aksoplazmą a osłonką mielinową (ryc. 10). Osłonki mielinowe na całym przekroju poprzecznym były rozwarstwione lub miały zatartą budowę warstwową (ryc. 10). W 6 godz. restytucji krążenia nieprawidłowości te były jeszcze wyraźniejsze. Do poprzednich zmian dołączyło się zagęszczenie aksoplazmy, zawierającej pojedyncze mitochondria.

Astrocyty wykazywały cechy obrzmienia zarówno perykarionów, jak i wypustek. Ich cytoplazma była jasna i uboga w organelle. Jądra były

duże, jasne, z niewielką ilością chromatyny skupionej w pobliżu otoczki jądrowej. Otoczka jądrowa wykazywała nieregularne poszerzenia między błoną wewnętrzną i zewnętrzną z wypukleniem błony zewnętrznej do cytoplazmy. Zmiany te były spostrzegane zarówno po 3, jak i po 6 godz.

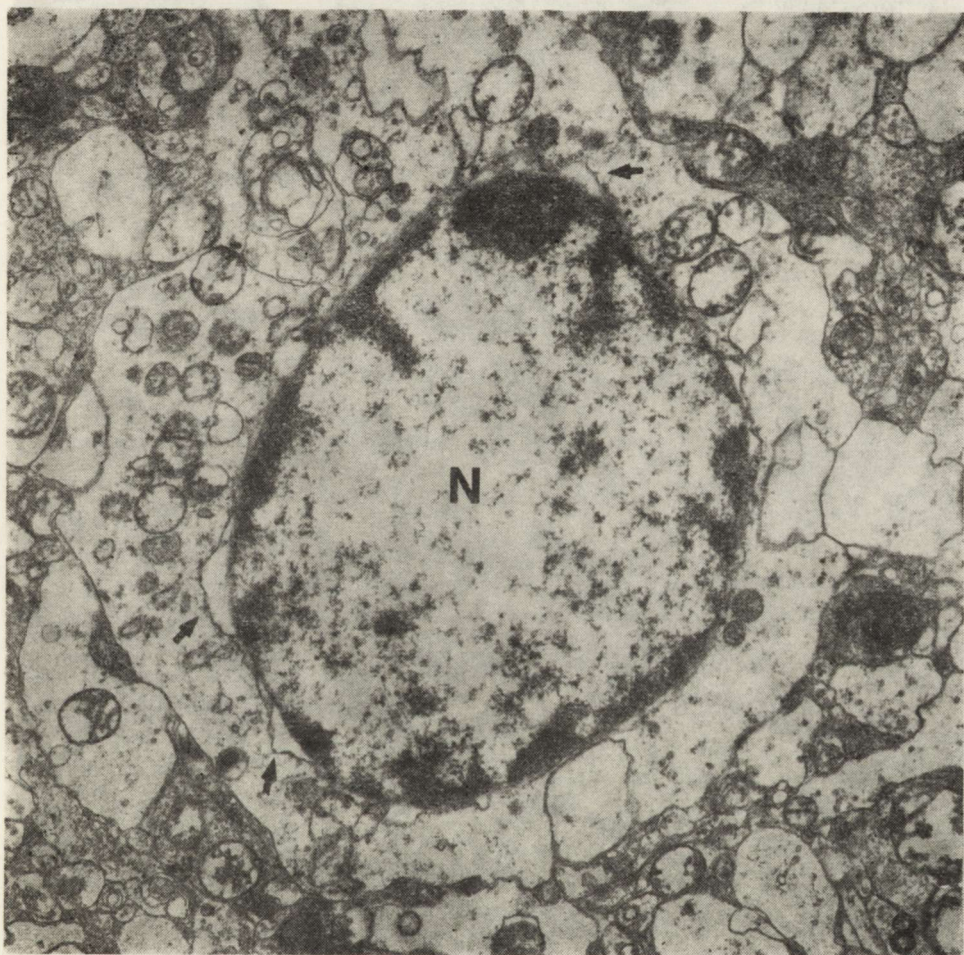
Mózdzek. Największe zmiany patologiczne w korze występowały w warstwie komórek Purkiniego. Miały one ten sam charakter i nasile-



Ryc. 7. Zwoje podstawy, odcinek przedni. Astrocyt o dużym jasnym jądrze (N) z chromatyną skupioną w pobliżu otoczki jądrowej. Otoczka jądrowa z poszerzeniami między zewnętrzną i wewnętrzną błoną i z bardzo dużym pęcherzowatym wypukleniem (V) błony zewnętrznej do cytoplazmy. Cytoplazma znacznie obrzmiała i całkowicie pozbawiona struktur śródplazmatycznych. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 6 godz. Pow. 9375 \times

Fig. 7. Anterior part of basal ganglia. Astrocyte with large, light nucleus (N) with chromatin concentrated in the vicinity of nuclear envelope. Nuclear envelope with dilations between outer and inner membrane and with protrusion (V) of outer membrane into cytoplasm. Cytoplasm markedly swollen, completely devoid of intercytoplasmic structures. 30-min ischemia, survival time 6 h. \times 9375

nie po 3, i po 6 godzinach od zakończenia 30-minutowego niedokrwienia. Stwierdzało się znaczne nieprawidłowości zarówno w budowie ultrastrukturalnej jądra, jak i cytoplazmy komórek Purkinjego (ryc. 11). Jądra charakteryzowały się jasną karioplazmą z nieregularnie rozszanymi skupieniami chromatyny. W cytoplazmie kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej były różnej długości, wiele z nich wyraźnie pofragmentowanych (ryc. 11). Pokryte były one małą ilością rybosomów. Przestrzenie między błonami zawierały jednorodny materiał o dużej gęstości elektro-

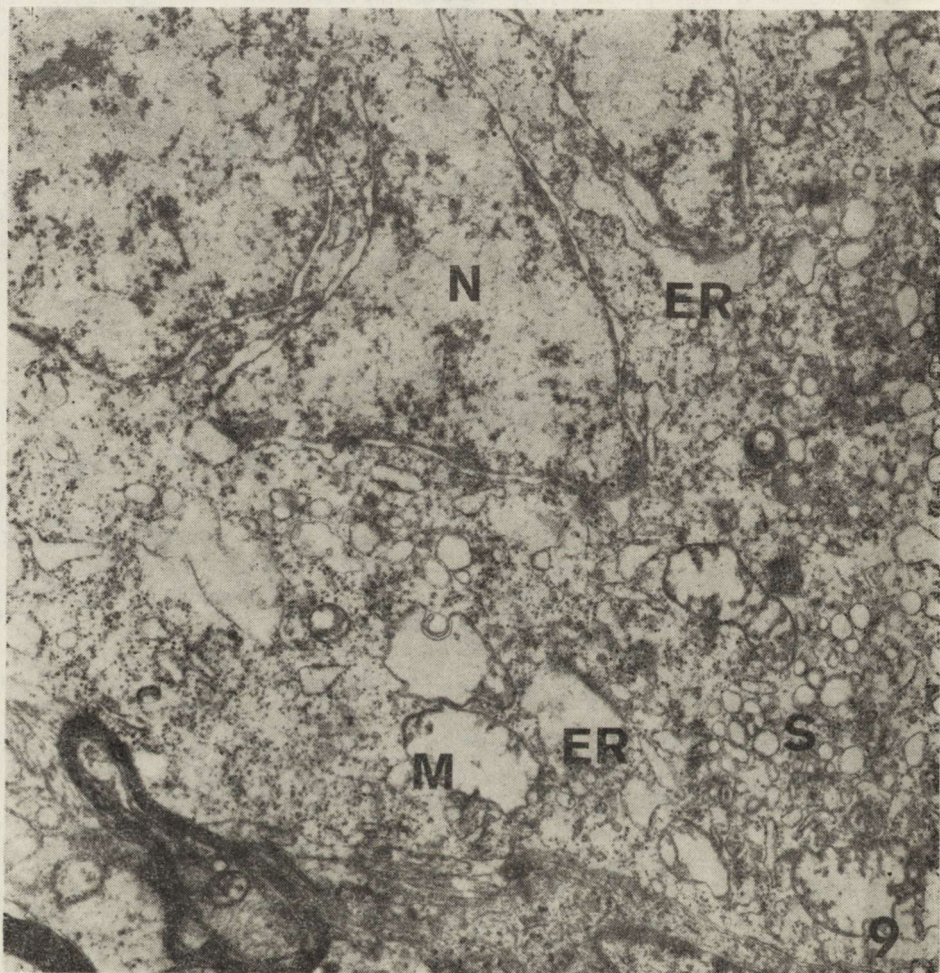


Ryc. 8. Zwoje podstawy, odcinek tylny. Astrocyt o dużym jasnym jądrze (N) z małą ilością chromatyny skupionej w agregaty w pobliżu otoczki jądrowej, z dużymi uwypukleniami zewnętrznej blaszki otoczki jądrowej (strzałki) w kierunku cytoplazmy. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 6 godz. Pow. 9 375 ×

Fig. 8. Posterior part of basal ganglia. Astrocyte with large light nucleus (N) with small amount of chromatin concentrated in aggregates in the vicinity of nuclear envelope. The outer membrane of nuclear envelope with large protrusions (arrows) into cytoplasm. 30-min ischemia, survival time 6 h. × 9 375

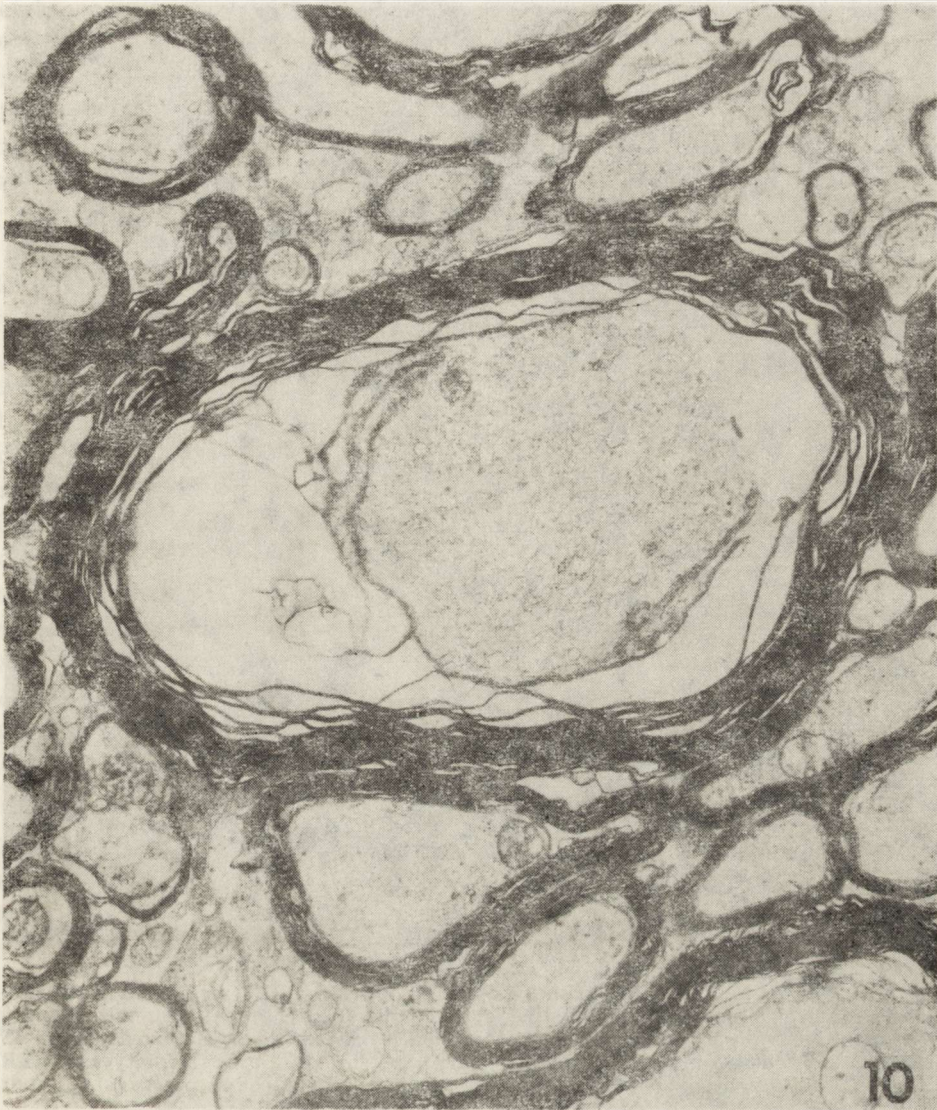
nowej (ryc. 11). Mitochondria były obrzmiałe. Znacznie rozwinięta była natomiast pęcherzykowata gładka siateczka śródplazmatyczna (ryc. 11).

Astrocyty i ich wypustki wykazywały, opisane już w innych strukturach OUN, zmiany w budowie ultrastrukturalnej, z dominującymi wykładnikami obrzmienia.



Ryc. 9. Rdzeń przedłużony. Fragment jądra i cytoplazmy neuronu. Jądro (N) z głębokimi wgłobieniami i nieznacznymi poszerzeniami między zewnętrzną oraz wewnętrzną błoną otoczki jądrowej. W cytoplazmie mitochondria (M) z cechami obrzmienia, duża ilość pęcherzykowej siateczki śródplazmatycznej gładkiej (S) oraz rozdęte kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER). Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 3 godz. Pow. 9 250 \times

Fig. 9. Medulla oblongata. Neuron — fragment of nucleus and cytoplasm. Nucleus (N) with deep invaginations and slight dilations between outer and inner nuclear envelope. In cytoplasm swollen mitochondria (M), abundant vesicular endoplasmic reticulum (S) and distended channels of granular endoplasmic reticulum (ER). 30-min ischemia, survival time 3 h. \times 9 250

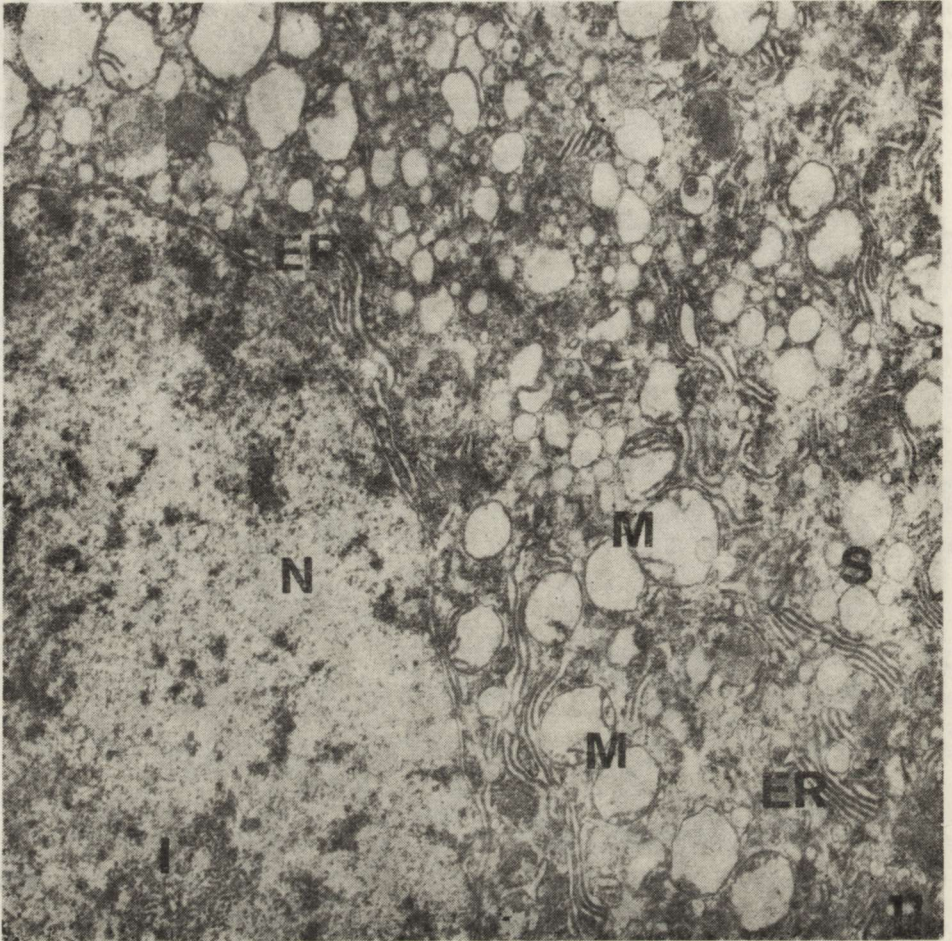


Ryc. 10. Rdzeń przedłużony. Zmielinizowane włókna nerwowe. Poszerzenie przestrzeni okołoaaksonalnej oraz odcinkowe rozwarstwienie blaszek osłonek mielinowych. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 3 godz. Pow. 9 250 \times

Fig. 10. Medulla oblongata. Myelinated nerve fibres. Extension of periaxonal space, and local splitting of myelin lamellae. 30-min. ischemia, survival time 3 h. \times 9 250

OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują, że całkowite 30-minutowe niedokrwienie mózgowia wywołuje zmiany w ultrastrukturze zwojów podstawy, rdzenia przedłużonego i mózdzku, nasilające się w okresie recyrkulacji krwi, pomimo powrotu czynności bioelektrycznej OUN.



Ryc. 11. Mózdzek. Komórka Purkinjego. Fragment jądra (N) ze skupieniami ziarnistości interchromatynowych (I). W cytoplazmie liczne obrzmiałe mitochondria (M), duża ilość poszerzonych zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej (S) oraz krótkie, pofragmentowane kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (ER) z małą ilością rybosomów. Czas niedokrwienia 30 min, czas przeżycia 3 godz. Pow. 9 000 ×

Fig. 11. Cerebellum, Purkinje cell. Fragment of nucleus (N) with aggregations of interchromatin granules (I). In cytoplasm abundant dilated cisternae of smooth endoplasmic reticulum (S) and short, fragmented channels of granular endoplasmic reticulum (ER) with scanty ribosomes. 30-min ischemia, survival time 3 h. × 9 000

Zasadniczy wzorec nieprawidłowości ultrastrukturalnych był wspólny dla wszystkich badanych części OUN. Obecne były one zarówno w formacjach szarych i białych. W poszczególnych strukturach występowały jednak pewne odrębności morfologiczne, pozwalające na próbę określenia dynamiki procesu i jego sekwencji czasowych. Badania mikroskopowo-

-elektronowe wykazały między innymi, że w przedniej części zwojów podstawy uszkodzenia komórek nerwowych występowały szybciej i były silniej zaznaczone niż w ich tylnej części. W rdzeniu przedłużonym, występujące już po 3 godz. recyrkulacji krwi, nieprawidłowości ultrastrukturalne nasilały się po upływie 6 godz. Natomiast ultrastrukturalne zmiany w mózdzku po 3 i 6 godz. obserwacji miały taki sam charakter i nasilenie.

Nieprawidłowości w obrazie ultrastrukturalnym gleju miały jednakowy charakter we wszystkich badanych częściach mózgowia i wyrażały się jego znacznym obrzmieniem.

Zmiany obserwowane w obrazie mikroskopowo-elektronowym wszystkich badanych struktur były wykładnikami narastającego obrzęku i postępującej destrukcji elementów komórkowych mózgu. Wyrażały się one zmniejszeniem gęstości elektronowej cytoplazmy i karioplazmy neuronów oraz gleju, obrzmieniem mitochondriów i poszerzeniem kanałów ziarnistej siateczki śródplazmatycznej, występującym przede wszystkim w komórkach nerwowych i zubożeniem zawartości organelli cytoplazmatycznych, właściwym głównie dla astrocytów. Obecne było również narastające poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych zarówno w formacjach białych, jak i szarych. Tego typu nieprawidłowości opisywane były przez licznych autorów w podobnych warunkach doświadczalnych oraz w materiale zwierząt poddanych krótszemu niedokrwieniu mózgu (Chiang i wsp. 1968; Hossmann, Sato 1970; Arsenio-Nunes i wsp. 1973; Jenkins i wsp. 1979; Kalimo i wsp. 1979; Pluta, Gajkowska 1984).

Na szczególną uwagę zasługują zmiany stwierdzone w jądrach komórek nerwowych tylnej części zwojów podstawy i w komórkach glejowych we wszystkich badanych strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Różniły się one zarówno swoim obrazem mikroskopowym, jak i dynamiką. Wprawdzie i w neuronach, i w gleju pojawiały się one już w 3 godz. po niedokrwieniu, jednak przez cały okres obserwacji stwierdzano je tylko w astrocytach, natomiast w komórkach nerwowych w 6 godz. były już nieobecne. Nieprawidłowości jąder neuronów wyrażały się obecnością licznych struktur pęcherzowatych, o zmiennej wielkości, wypełniających znaczną część karioplazmy. Towarzyszyło im nierównomierne rozłożenie i przesunięcie na obwód chromatyny, zbitej w grudki oraz zwiększona ilość ziaren interchromatyny. Tego typu zmiany opisywano już wcześniej w neuronach kory ruchowej w warunkach całkowitego niedokrwienia i przegrzania mózgu (Pluta, Gajkowska 1984; Dydyk, Pluta 1984). Mechanizm ich powstawania wiązano z zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej komórki, prowadzącymi do wpuklania się w obręb karioplazmy wewnętrznej blaszki otoczki jądrowej. Masywne uszkodzenie jądra prowadziło do głębokiego

upośledzenia metabolizmu komórki, kończącego się jej nieodwracalnymi zmianami i śmiercią.

Zmiany w jądrach glejowych miały odmienny charakter. Wyrażały się one znacznym poszerzeniem przestrzeni zawartej między wewnętrzną i zewnętrzną blaszką otoczki jądrowej, prowadzącym do pęcherzowatych wpukleń błony zewnętrznej do cytoplazmy. Mechanizm tego zjawiska jest nieznany. Wydaje się jednak, iż mimo odmienności obrazów mikroskopowo-elektronowych może on być podobny jak w przypadku zmian w jądrach neuronów. Za ich związkiem z ewentualnymi zaburzeniami gospodarki wodno-elektrolitowej komórki przemawiają masywne cechy obrzmienia astrocytów. Fakt większego nasilenia zmian jądrowych w gleju w 6 godz. po niedokrwieniu w tym kontekście można by wiązać z pogłębiającym się w tym czasie ich obrzmieniem.

Podsumowując przedstawione powyżej spostrzeżenia należy stwierdzić, że w jądrach podstawy i w mózdzku dominującym elementem nieprawidłowości ultrastrukturalnych było uszkodzenie komórek nerwowych. W rdzeniu przedłużonym natomiast ich istotnym komponentem były zmiany w obrazie włókien nerwowych i osłonek mielinowych. Zmiany komórek glejowych, identyczne we wszystkich strukturach ośrodkowego układu nerwowego, miały tendencje do nasilania się w miarę wydłużania się czasu po przebytym niedokrwieniu. Nie stwierdzono korelacji między morfologicznym obrazem OUN a powrotem jego czynności bioelektrycznej.

Autor serdecznie dziękuje Panu Sławomirowi Januszewskiemu za współpracę podczas wykonywania doświadczeń.

РАННИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТВОЛОВЫХ УЗЛАХ, МОЗЖЕЧКЕ И ПРОДОЛГОВАТОМ МОЗГУ В РЕЗУЛЬТАТЕ ПОЛНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА В ТЕЧЕНИЕ 30 МИНУТ

Резюме

В работе рассматриваются ультраструктурные исследования мозга кролика, содержащегося в течение 30 минут в условиях полной ишемии. Исследования показали, что в передней части ствольных узлов повреждения нейронов под воздействием ишемии выступали раньше и проявлялись более отчетливо, чем в задней. В продолговатом мозгу нарушения появлялись в течение трех часов после возобновления циркуляции и усиливались по истечении шести часов. В то же время в мозжечке ультраструктурные изменения через 3 и 6 часов после восстановления кровообращения не отличались ни по характеру, ни по интенсивности. Нарушения в ультраструктурной картине глии выглядели одинаково во всех обследованных частях мозга и проявлялись в виде отека. Особое внимание следует обратить на изменения в ядрах нейронов задней части узлов ствола и глиальных клеток исследованных мозговых структур. Данные изменения связаны с транслокацией мембран ядерной оболочки. В ядрах нейронов мембраны ядерной оболочки перемещались в кариоплазму, а в глиальных клетках — по направлению к цитоплазме.

EARLY ULTRASTRUCTURAL CHANGES IN BASAL GANGLIA, CEREBELLUM, AND MEDULLA OBLONGATA FOLLOWING 30-MIN COMPLETE CEREBRAL ISCHEMIA

Summary

Experiments were performed on rabbits in which 30-min complete cerebral ischemia was induced. Electron microscopic studies revealed that impairment of nerve cells appeared earlier and was more pronounced in the anterior part of basal ganglia than in the posterior part. Ultrastructural abnormalities in medulla were present 3 h after recirculation being more advanced after 6 h. Instead, cerebellum displayed changes of the same character and intensity 3 and 6 h after restitution of cerebral circulation. Ultrastructural glia abnormalities were similar in all studied structures and were manifested by significant swelling of cell bodies and processes. Special attention should be paid to the changes of nerve cells nuclei in the posterior part of basal ganglia and astroglial nuclei in all investigated areas. They consisted in displacement of nuclear envelope membranes into karyoplasm of nerve cells and into cytoplasm of glial cells.

PIŚMIENNICTWO

1. Arsenio-Nunes M. L., Hossmann K.-A., Farkas-Bargeton E.: Ultrastructural and histochemical investigation of the cerebral cortex of cat during and after complete ischemia. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1973, 26, 329—344.
2. Chiang J., Kowada M., Ames A., III, Wright R. L., Majno G.: Cerebral ischemia. III. Vascular changes. *Am. J. Path.*, 1968, 52, 455—476.
3. Dydyk L., Pluta R.: Wpływ wysokiej temperatury na ultrastrukturę kory mózgu i substancji białej podkorowej królika. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 97—117.
4. Hossmann V., Hossmann K.-A.: Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res.*, 1973, 60, 423—438.
5. Hossmann K.-A., Sato K.: The effect of ischemia on sensorimotor cortex of cat. Electrophysiological, biochemical and electronmicroscopical observations *Z. Neurol.*, 1970, 198, 33—45.
6. Hossmann K.-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
7. Jenkins L. W., Pavlishock J. T., Becker D. P., Miller J. D., Sullivan H. G.: Complete cerebral ischemia. An ultrastructural study. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1979, 48, 113—125.
8. Kalimo H., Paljärvi L., Vapalahti M.: The early ultrastructural alterations in the rabbit cerebral and cerebellar cortex after compression ischemia. *Neuropathol. appl. Neurobiol.*, 1979, 5, 211—223.
9. Kolata R. J.: Survival of rabbits after prolonged cerebral ischemia. *Stroke*, 1979, 10, 272—277.
10. Marshall L. F., Graham D. I., Durity F., Lounsbury R., Welsh F., Langfitt T. W.: Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part 2. Brain morphology. *J. Neurosurg.*, 1975, 43, 318—322.
11. Nemoto E. M., Bleyaert A. L., Stezoski S. W., Moosy J., Rao G. R., Safar P.: Global brain ischemia. A reproducible monkey model. *Stroke*, 1977, 8, 558—564.

12. Peters A., Palay S. L., Webster H.: *The Fine Structure of the Nervous System*. Harper-Row, New York, Evanston, London 1976.
13. Pluta R.: Zmiany pO_2 , pCO_2 i pH w tętniczej krwi królika w całkowitym 30-min niedokrwieniu mózgowia. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 323—334.
14. Pluta R.: Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska, CMDiK PAN, Warszawa 1982.
15. Pluta R.: Wpływ prostacykliny na zmiany podstawowych parametrów fizjologicznych w całkowitym niedokrwieniu mózgowia. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 475—492.
16. Pluta R., Gajkowska B.: Ultrastructural changes in the sensomotor cortex of the rabbit after complete 30-min brain ischemia. *J. Neurosci. Res.*, 1984, 11, 35—47.
17. Pluta R., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgu a czynność bioelektryczna. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 41—52.
18. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979, 10, 267—272.
19. Sainio K.: Ischemic cerebral damage and EEG in the rabbit. Thesis, University of Helsinki, Academic dissertation, Dept. of Physiol. Univ. of Helsinki, Finland, 1972.
20. Weinberger L. M., Gibbon M. H., Gibbon J. H. Jr: Temporary arrest of the circulation to the central nervous system. II. Pathologic effects. *Arch. Neurol. Psychiat., (Chic.)* 1940, 43, 961—986.

Adres autora: Zakład Neuropatologii, Instytut Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

MARIA DAŃBKA, BOGNA SCHMIDT-SIDOR,
MILENA LAURE-KAMIONOWSKA, TADEUSZ IZBICKI

CHANGES IN BRAINS OF INFANTS AND CHILDREN WHO DIED OF NEOPLASTIC DISEASES

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

The problem of eventual lesions arising in the central nervous system (CNS) during polychemotherapy applied for treatment of neoplastic diseases is still poorly known. Experimental studies demonstrated some changes in brains of animals treated with several cytotoxic drugs. They were observed not only after administration of CCNU (lomustin), a drug known to penetrate through the blood-brain barrier, but also after cyclophosphamide (endoxan) and other antimitotics (Dańbka, Maślińska 1986; Maślińska 1986). Observations of eventual brain changes developing in the course of prolonged chemotherapy in humans are still scarce (Schiffer et al. 1981). The damaging influence of radiotherapy on the CNS is better known (De Reuck, van der Ecken 1975). Our attention focused on encephalopathy following complex treatment with X-rays and cytostatics.

Complex treatment of the majority of cases, the noxious influence of the neoplastic disease itself and also a particular clinical history of each case complicate such studies very much.

Nevertheless, findings in routine neuropathological examination of the brains of infants and children who died of neoplastic diseases seem to be worth reporting. They allow to assume some causal relationship between the prolonged polychemotherapy and morphological changes observed in the CNS.

Neuropathological observations

From about forty cases of children who died of neoplastic disease we have chosen seventeen which were differentiated into groups characterized by a comparable clinical course and duration of the applied treatment.

Table 1. Neoplastic disease of internal organs in cases not treated with chemotherapy
 Tabela 1. Choroba nowotworowa narządów wewnętrznych bez stosowania chemioterapii

Nr	Case Przypadek	Diagnosis Rozpoznanie	Treatment Leczenie
1	99/79 J. R. 2 months mies.	<i>Neoblastoma non diffe- rentiatum disseminatum</i>	Died at the beginning of radiotherapy Zmarł na początku stosowania radioterapii
2	97/79 M. W. 6 months mies.	<i>Neuroblastoma regionis praesacralis</i>	Died at the beginning of chemotherapy Zmarł na początku stosowania chemioterapii
3	7/80 W. K. 2.5 years roku	<i>Hepatoblastoma</i>	Surgery Leczenie chirurgiczne
4	33/80 W. Z. 8 years lat	<i>Ganglioneuroma regionis praesacralis</i>	Surgery. Duration of disease 2 months Leczenie chirurgiczne. Czas trwania choroby 2 mies.
5	40/80 E. N. 8 years lat	<i>Adenocarcinoma glan- dulae salivaris</i>	Surgery. Duration of disease 1 year Leczenie chirurgiczne. Czas trwania choroby 1 rok

The first group (Tab. 1) constitutes a kind of control group. It includes five cases in which the neoplastic process did not involve the CNS. In 3 cases surgery was the main treatment and chemotherapy was used not longer than for a few days. CNS lesions were rather insignificant in this group. In younger cases they were minimal, in two older ones mild cerebellar and cortical changes were observed. On the other hand, a set of symptoms consisting of brain edema and hyperemia and in three of five cases (1, 4, 5) disseminated intravascular coagulation (DIC) were found (Fig. 1).

In the second group (Tab. 2) the majority of cases with neoplastic disease did not involve the CNS, only in two of them (2 and 4) were cerebral and meningeal metastases found. Surgery and radiotherapy of primary neoplastic lesions (not in CNS) were applied, but polychemotherapy was in this group the most important and prolonged treatment. Antimitotic drugs were used in classical composition.

In the brains of this group pathological changes of various intensity were observed. In two of them (6 and 7) narrow cortical convolutions and large sulci manifested some degree of cortical atrophy. In microscopic examination neuronal rarefaction and cellular lesions, not only in these cases, but also in five other ones (1, 2, 3, 4, 8) were found (Fig. 2). Pathologic changes in the cerebellar cortex (Fig. 3) were observed with similar frequency. Other advanced lesions observed in this group concerned cerebral vascular walls which displayed fibrosis and

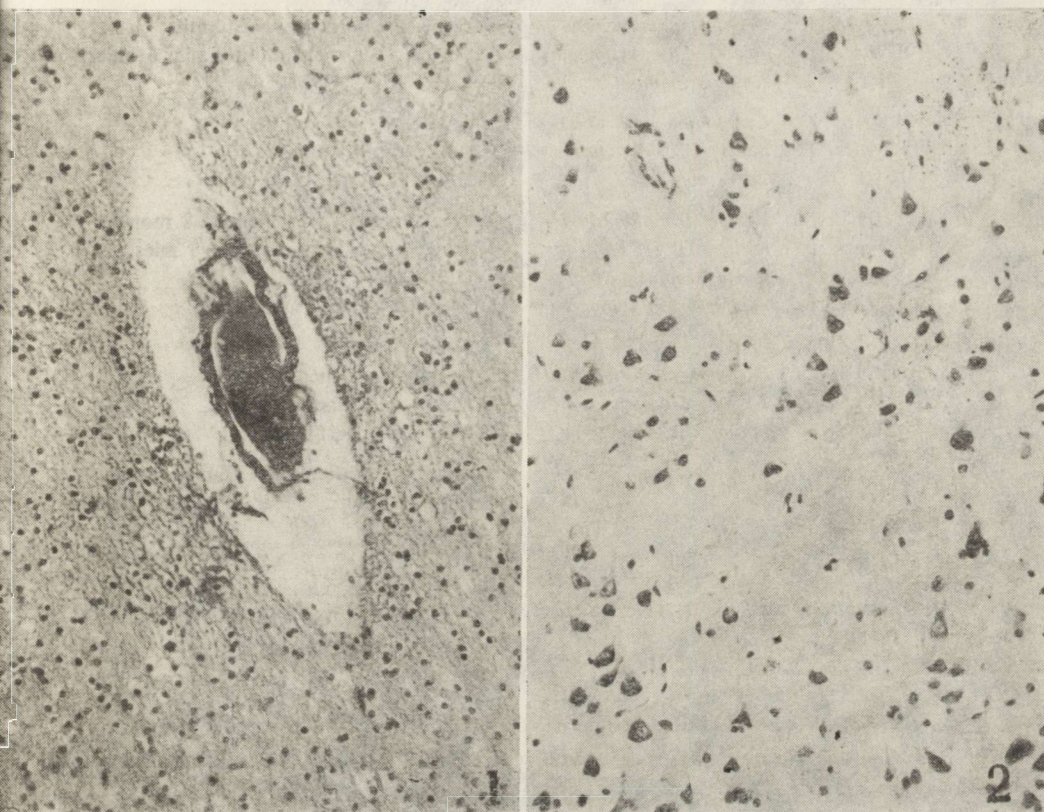


Fig. 1. Intravascular coagulation in a small vessel in the white matter. PAS. $\times 60$

Ryc. 1. Wykrzepianie śródnacyniowe w małym naczyniu w istocie białej. PAS. Pow. $60 \times$

Fig. 2. Neuronal rarefaction in the cortex. Cresyl-violet. $\times 60$

Ryc. 2. Ubytki neuronów w korze mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. $60 \times$

Table 2. Neoplastic disease of internal organs treated with long-lasting chemotherapy

Tabela 2. Choroba nowotworowa narządów wewnętrznych. Długotrwała chemioterapia

Nr	Case Przypadek	Diagnosis Rozpoznanie	Therapy Leczenie
1	77/82 M. R. 11 months mies.	<i>Carcinoma mucocellulare</i>	Chemotherapy 8.5 months Chemioterapia 8,5 mies. (5FV, VCR, CCNU)
2	101/79 J. Sz. 15 months mies.	<i>Histocytosis x generalisata</i>	Chemotherapy 3 months Chemioterapia 3 mies. (Velbe, MTx, VCR)
3	55/80 M D. 2 years lata	<i>Sarcoma neurogenes regionis lumbo-sacralis</i>	Surgery. Radiotherapy. Chemotherapy 8 months Lecz. chirurgiczne, radioterapia, chemioterapia 8 mies. (VCR, CTIC, ADM)

4	11/80 M.N. 8 years lat	<i>Neoplasma malignum fusocellulare (synoviale) regionis inguinalis</i>	Surgery. Radiotherapy 6 months Lecz. chirurgiczne, radioterapia 6 mies. (VCR, DTIC, ADM)
5	64/80 M. M. 8 years lat	<i>Lymphoma mal. abdominis IV°. Metastases ad cerebrum</i>	Chemotherapy 2 months Chemioterapia 2 mies. (VCR, MTx)
6	114/79 P. G. 9 years lat	<i>Lymphogranulomatosis maligna B III (Infiltratio neoplastica mediastini et lymphonodulorum)</i>	Radiotherapy. Chemotherapy 8 months Radioterapia. Chemioterapia 8 mies. (VCR, NH ₂)
7	108/79 J. S. 12 years lat	<i>Sarcoma Ewingi costae IX sin. Metastases ad pulmonem</i>	Radiotherapy. Chemotherapy Radioterapia. Chemioterapia (VCR, CTx, ACTD)
8	486/81 G. W. 12 years lat	<i>Neuroblastoma</i>	Surgery. Radiotherapy. Chemotherapy Lecz. chirurgiczne. Radioterapia. Chemioterapia (VCR, CCNU)

MTx — metathrexit, VCR — vincristina, CTx — cytoxan, ADM — adriamocyna, ACTD — actinomocyna D

Table 3. Neoplastic disease of internal organs and/or central nervous system

Tabela 3. Choroba nowotworowa narządów wewnętrznych i/lub ośrodkowego układu nerwowego

Nr	Case Przypadek	Diagnosis Rozpoznanie	Treatment Leczenie
1	37/80 Z. P. 2 years lata	<i>Lymphoma malignum pleurae et pulmonum</i>	Radiotherapy. Chemotherapy 4 months Radioterapia. Chemioterapia 4 mies. (MTx, VCR, CTx, ADM)
2	35/82 T. J. 3 years lata	<i>Rabdomysarcoma palpebrae et orbitae dextr. Sarcomatosis meningium</i>	Surgery. Radiotherapy. Chemotherapy 8.5 months Lecz. chirurgiczne. Radioterapia. Chemioterapia 8,5 mies. (CTx, ACTD, VCR, Velbe)
3	78/79 Z. M. 3 years lata	<i>Retinoblastoma oculi dextri. Metastases ad cerebrum</i>	Surgery. Radiotherapy. Chemotherapy 2.5 months Lecz. chirurgiczne. Radioterapia. Chemioterapia 2,5 mies. (VCR, CCNU, ACTD)
4	429/79 S. B. 5 years lat	<i>Medulloblastoma</i>	Surgery. Radiotherapy. Chemotherapy 4 months Lecz. chirurgiczne. Radioterapia. Chemioterapia 4 mies. (CCNU, VCR)

Nohations as in Table 2.

Objaśnienia jak w tabeli 2.

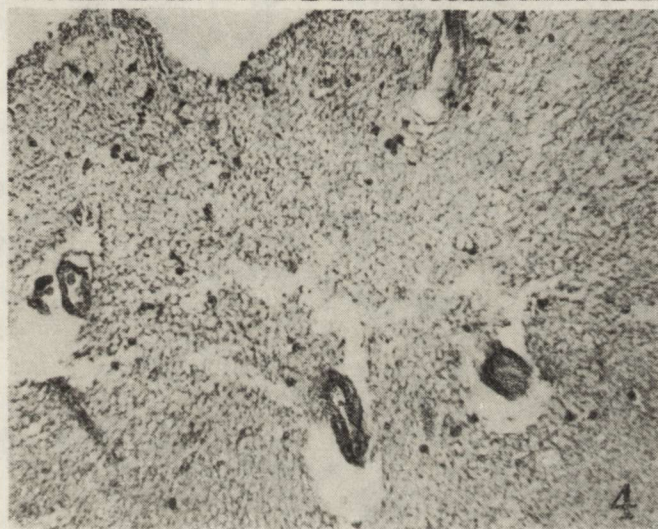
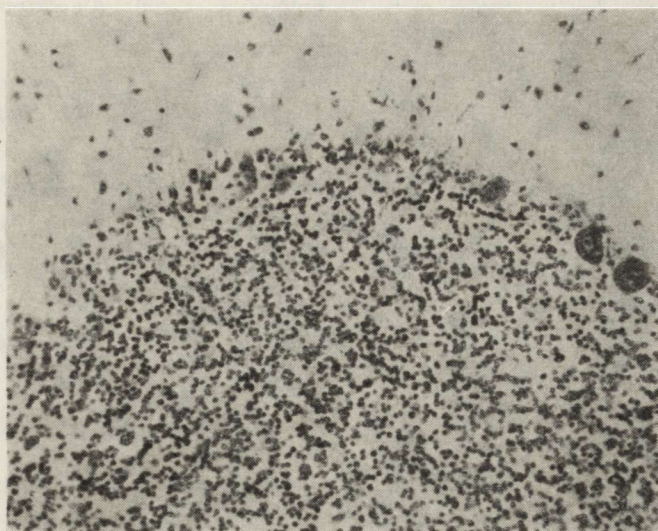


Fig. 3. Loss of Purkinje cells and rarefaction of granular layer. Cresyl-violet. $\times 60$

Ryc. 3. Ubytki komórek Purkinjego i przerzedzenie warstwy ziarnistej. Fiolet krezylu. Pow. $60 \times$

Fig. 4. Fibrotic changes in small cortical vessels. Van Gieson-orceine. $\times 100$

Ryc. 4. Zwióknienie drobnych naczyń w korze mózgu. Van Gieson-orceina. Pow. $100 \times$

hyalinization (Fig. 4). Not only hyperemia and edema, like in the previous group, were common, but even small perivascular necrotic foci were sporadically found. DIC was diagnosed in five of eight cases.

The last group (Tab. 3) includes four cases with metastatic or primary tumors of the CNS. The patients were admitted for radiotherapy of the brain and prolonged chemotherapy was also applied in the course

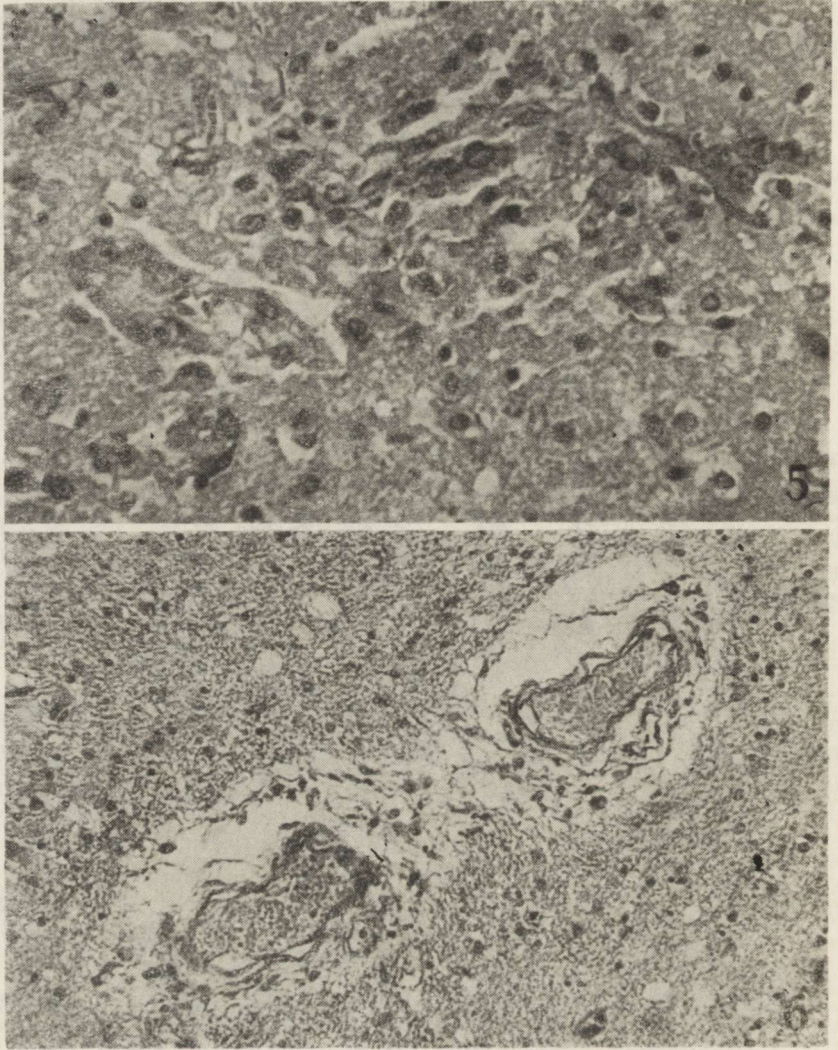


Fig. 5. Small necrotic focus in cerebral cortex. H—E. $\times 100$

Ryc. 5. Małe ognisko martwicy w korze mózgu. H—E. Pow. $100 \times$

Fig. 6. Damage of vascular walls and perivascular transudate. H—E. $\times 60$

Ryc. 6. Uszkodzenie ścian naczyń i przesiąki okołonacyniowe. H—E. Pow. $60 \times$

of and after irradiation. Neuropathological changes were most severe in this group. The postirradiation damage of the white matter was particularly prominent in cases 3 and 4. Damage of myelin sheaths and disseminated foci of parenchymal necrosis were observed. Gray structures (cerebral and cerebellar cortex), were also damaged in all cases, particularly in cases 2 and 3. Small necrotic foci were observed in those structures (Fig. 5) and within such lesions small fibrotic vessels were found. In all cases of this group the damage of vascular walls was ra-

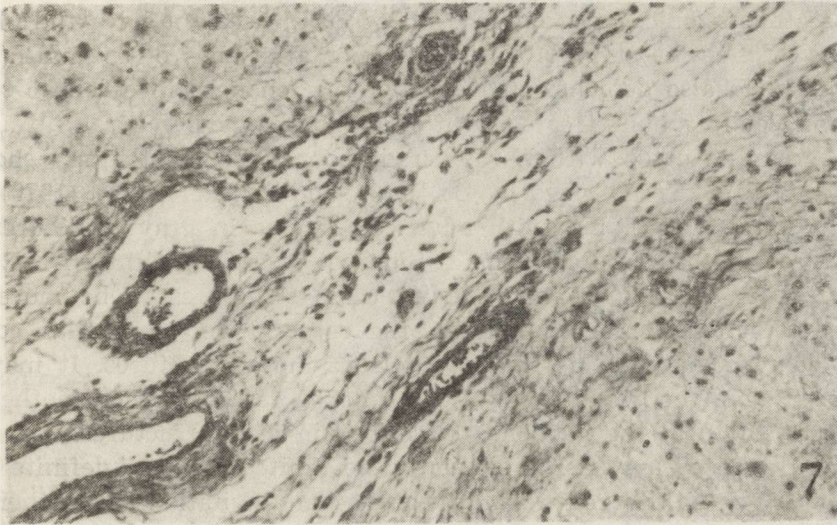


Fig. 7. Obliteration of meningeal space, damage of vascular walls. H—E. $\times 60$
 Ryc. 7. Zarośnięcie przestrzeni oponowej, uszkodzenie ścian naczyń. H—E. Pow.
 60 \times

ther severe (Fig. 6), not only around the tumor, but also in the other hemisphere. Fibrosis, hyalinization or even necrotic changes of vessel walls were seen. Fibrotic changes in meninges were found in two cases, causing partial obliteration of the meningeal space (Fig. 7). Hyperemia and edema were generalized in all cases, DIC was found in cases 3 and 4.

DISCUSSION

In all the examined groups of cases generalized edema and hyperemia were observed. On this background in eleven out of seventeen cases disseminated intravascular coagulation was noted. This set of symptoms, regardless the diagnosis and treatment of particular cases, could be related to the final, critical period before death. DIC diagnosed morphologically in more than 60% of cases indicates severe generalized metabolic disturbances during the fatal course of neoplastic disease.

Other neuropathologic changes were more pronounced in brains of children after prolonged polychemotherapy, than in patients with neoplastic disease, but not subjected to this treatment. Unfortunately, the survival of only one of them was comparable. Neuronal lesions with features of atrophy of cerebral cortex and neuronal loss in the cerebellar cortex were observed and damage of vascular walls was also a very constant finding. This could be partially responsible for parenchymal lesions. The young age of patients allows us to consider fibrosis and hyalinization of vessels as pathologic, related to disease, or

the treatment which was applied. This is in agreement with the observations of Schiffer et al. (1981). Experimental studies on animals (Iwanowski 1985) also demonstrated degenerative changes in cerebral vessel walls in young rabbits treated with cyclophosphamide.

Our cases treated with X-ray irradiation and chemotherapy showed similar features as described by De Reuck and van der Ecken (1975) and Burger et al. (1979), but with advanced lesions in gray structures similarly as in the cases of Schmidt-Sidor et al. (1986). While De Reuck and van der Ecken (1975) considered those structures to be more resistant to irradiation, in our cases, the cerebral and cerebellar cortex were damaged as well as small vessels in those structures. It may be supposed that the simultaneous influence of radio- and chemotherapy may contribute to the incidence of lesions in gray structures.

The presented material is evidently too limited to allow definite conclusions. We consider our observations as an invitation to further investigations of the influence of anti-neoplastic treatment on the central nervous system.

ZMIANY W MÓZGACH DZIECI ZMARŁYCH Z POWODU CHOROBY NOWOTWOROWEJ

Streszczenie

Zbadano mózgi 17 dzieci zmarłych z powodu choroby nowotworowej. Z 16 przypadków nowotworów narządów wewnętrznych 5 miało przerzuty do układu nerwowego, 1 przypadek dotyczył pierwotnego guza mózgu. Chorzy byli leczeni chirurgicznie, za pomocą radioterapii, a przede wszystkim z zastosowaniem wielolekowej chemioterapii. Porównując grupy o podobnym sposobie leczenia starano się ocenić, czy długotrwałe stosowanie cytostatyków wywołuje zmiany w OUN? W mózгах dzieci leczonych tą metodą zaobserwowano większe niż u dzieci nie poddanych chemioterapii uszkodzenie ścian naczyń mózgu i uszkodzenia kory mózgu i mózgdzku o różnym nasileniu. We wszystkich przypadkach, niezależnie od stosowanego leczenia, widoczne były obrzęk i przekrwienie, a w ponad 60% przypadków zespół wykrzepiania śródnacyniowego, które trzeba odnieść do ciężkich zaburzeń krążeniowych i metabolicznych okresu zejściowego.

ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГУ ДЕТЕЙ, ПРИЧИНОЙ СМЕРТИ КОТОРЫХ БЫЛИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Резюме

Авторы обследовали мозг 17 детей, смерть которых наступила в результате злокачественного неоплазматического заболевания. В 5 из 16 случаев опухоли внутренних органов были обнаружены метастазы в нервную систему. В 1 случае имелась первичная опухоль мозга. Все больные прошли хирургическое и радиотерапевтическое лечение и, прежде всего, химиотерапевтическое лечение с применением различных лекарственных препаратов. Сравнивая группу больных, в лечении которых применялись подобные методы, авторы попы-

тались определить, вызывает ли длительное применение цитостатических средств изменения в центральной нервной системе. В мозгу детей, подвергшихся воздействию химиотерапии, обнаружено более значительное повреждение стенок кровеносных сосудов, чем в тех случаях, когда химиотерапия не применялась, а также более или менее тяжелые повреждения коры головного мозга и мозжечка. Во всех рассматриваемых случаях, независимо от метода лечения, отмечается отек мозга и гиперемия, а свыше 60% случаев обнаруживают синдром внутрисосудистых тромбозов, который следует отнести к числу тяжелых нарушений кровообращения во время агонии.

REFERENCES

1. Burger P., Makalay M. S., Dutko L., Vogel S.: The morphologic effect of radiation administered therapeutically for intracranial gliome. A postmortem study of 25 cases. *Cancer*, 1979, 44, 1256—1272.
2. Dąbbska M., Maślińska O.: Early and late brain changes after cyclophosphamide administration in young rabbits. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24 (in press).
3. De Reuck J., van der Eecken H.: The anatomy of the late radiation encephalopathy. *Europ. Neurol.*, 1975, 13, 481—494.
4. Iwanowski L.: Ultrastructure of brain capillaries in young rabbits treated with cyclophosphamide. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 557—564.
5. Maślińska D.: Effect of alkylating drugs on rat cerebellum. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 1986 (in press).
6. Schiffer D., Soffiatti R., Giordana M. T., Tarenzi G.: Tissue alterations induced by radio- and chemotherapy in brain with malignant glioma. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1981, Suppl. VII.
7. Schmidt-Sidor B., Alwasiak J., Kolasa P., Wrężel B., Liberski P. P., Papierz W., Traczyńska A.: Późne zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym po radioterapii w przypadkach guzów mózgu. 1986 (in press).

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

ANDRZEJ LOESCH

EFFECT OF HIGH AMBIENT TEMPERATURE ON THE
NEUROHYPOPHYSIS OF THE RABBIT. FURTHER EVIDENCE
OF ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS
IN NEUROHYPOPHYSIAL AXONS AND PITUICYTES

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

Previous reports from this Laboratory have presented some ultrastructural alterations of the hypothalamo-neurohypophysial system of rabbit exposed to high ambient temperature for 3 h (Gajkowska et al. 1985; Loesch et al. 1985). These studies suggest that 3 h-lasting hyperthermic stress causes an activation of the hypothalamo-neurohypophysial axons which display no neurosecretory granules (Loesch et al. 1985). From the studies mentioned above it is clear, however, that the spectrum of such alterations in the neurohypophysis is best revealed 24 h after application of the heat stress. In contrast to the previous report (Loesch et al. 1985) in the present experiments the animals underwent three exposures to high ambient temperature.

MATERIAL AND METHODS

The neurohypophysial axons and pituicytes of 6 adult male Albino rabbits weighing 2.5—3.0 kg were exposed three times (every 24 h) to heat stress. Each experimental animal was singly placed in a thermic chamber and exposed for 3 h to high ambient temperature of 38—39°C. Air of the same temperature and relative humidity ranging between 60 and 75% was passed through this chamber. Before and after application of heat stress the body temperature of each animal was measured in the *rectum*. Controls were two rabbits. Both groups of animals were kept in the same conditions and were supplied with food and water *ad libitum*.

For ultrastructural purposes neurohypophysis samples were taken 24 h after the last exposure to high ambient temperature. The speci-

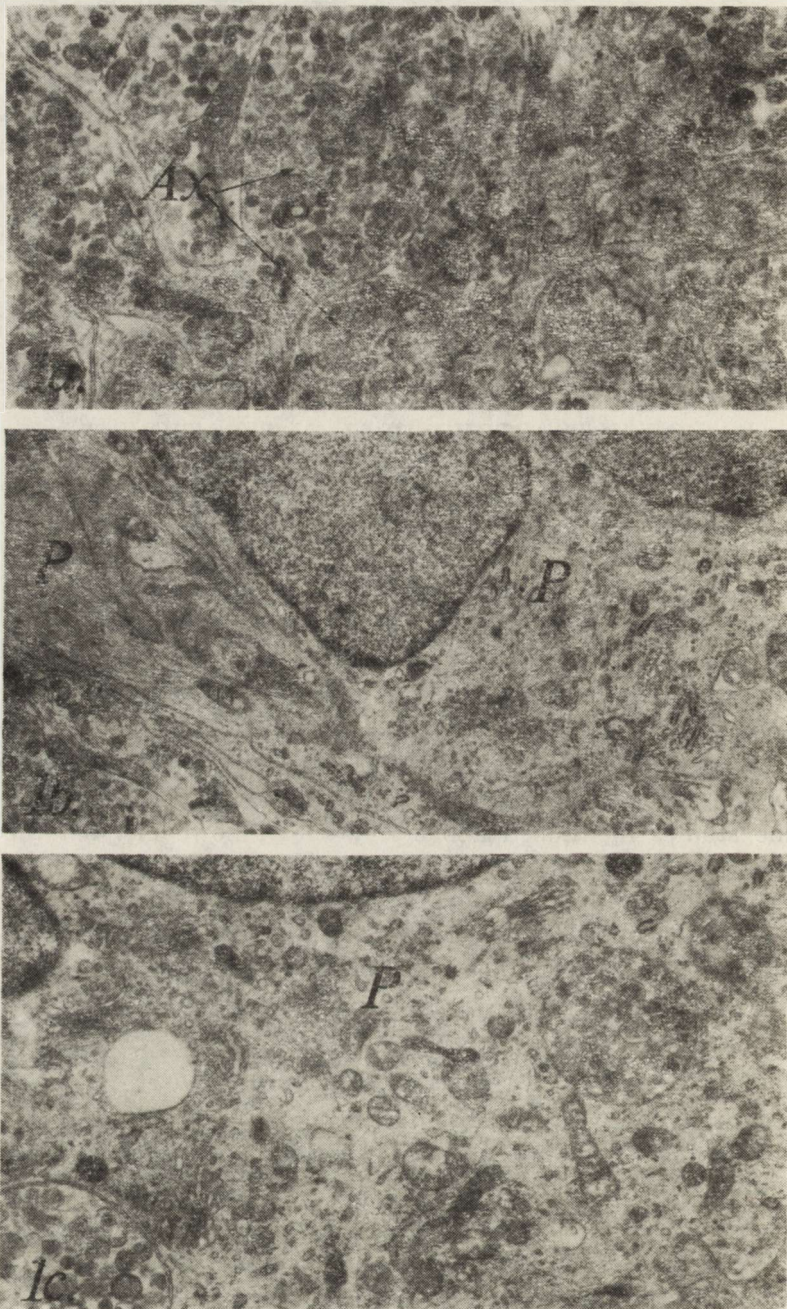


Fig. 1a—c. Control rabbit. 1a. In the axon profiles (Ax) numerous neurosecretory granules and microvesicles. $\times 20\,000$. 1b. Within pituicyte (P) moderate amounts of organelles. $\times 7\,000$. 1c. A fragment of pituicyte (P) with Golgi complex profile. $\times 30\,000$

Ryc. 1a—c. Królik kontrolny. 1a. W aksonach (Ax) liczne ziarnistości neurosekrecyjne i mikropęcherzyki. Pow. $20\,000 \times$. 1b. W obrębie pituicyta (P) umiarkowana ilość organelli cytoplazmatycznych. Pow. $7\,000 \times$. 1c. We fragmencie pituicyta kompleks Golgiego. Pow. $30\,000 \times$

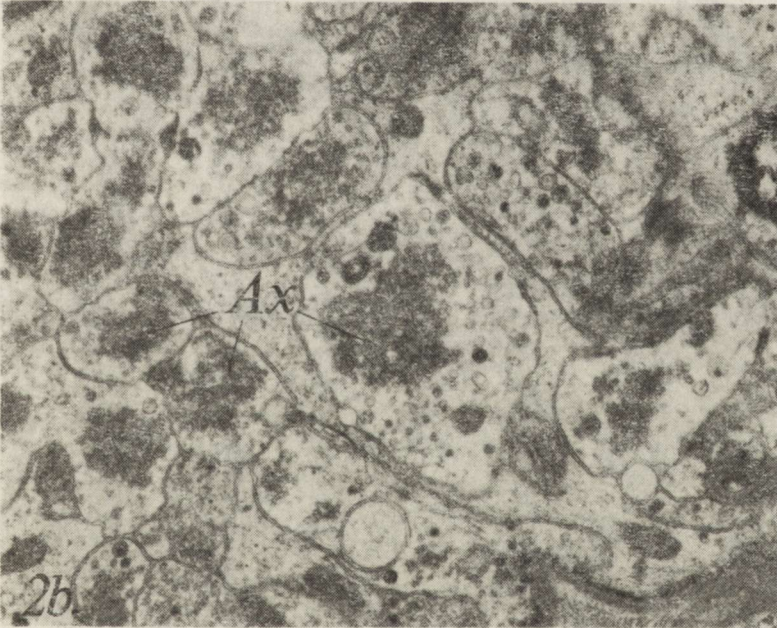
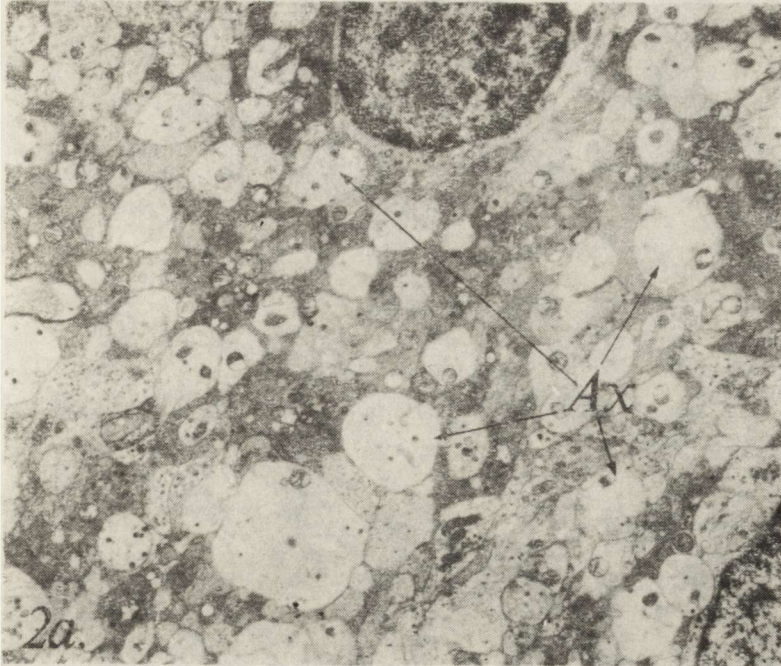


Fig. 2a—b. Heat-stressed rabbit. 2a. Numerous degranulated axon profiles (Ax) are seen throughout the neurohypophysis. $\times 5\,000$. 2b. Axon profiles (Ax) abundant in clustered microvesicles. $\times 22\,000$

Ryc. 2a—b. Królik po stresie hipertermicznym. 2a. Liczne profile aksonów (Ax) pozbawione ziarnistości neurosekrecyjnych. Pow. $5\,000 \times$. 2b. Profile aksonów (Ax) z obfitymi gronami mikropecherzyków. Pow. $22\,000 \times$

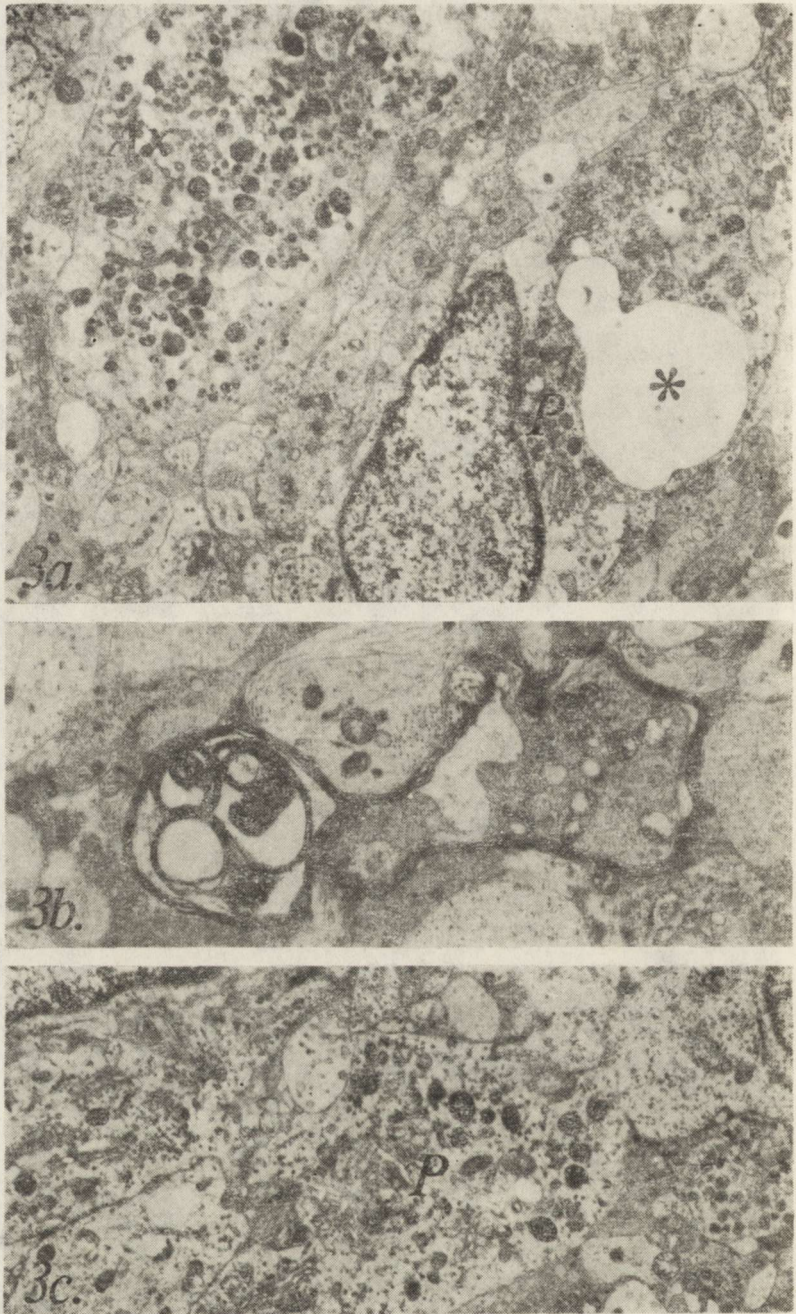


Fig. 3a—c. Heat-stressed rabbit. *3a.* An axon profile (Ax) filled with lysosomal bodies. Note large vacuole (asterisk) in pituicyte (P) cytoplasm. $\times 6\ 000$. *3b.* Altered axon profiles containing myelin sheath-like formations and myelinoid figures. $\times 22\ 000$. *3c.* A fragment of pituicyte (P) containing numerous organelles including lysosomal bodies. $\times 7\ 000$

Ryc. 3a—c. Królik po stresie hipertermicznym. *3a.* Profil aksonu (Ax) wypełniony lizosomami, w pituicycie duża wakuola (gwiazdka). Pow. $6\ 000 \times$. *3b.* Zmienione profile aksonów zawierające struktury mielinopodobne. Pow. $22\ 000 \times$. *3c.* Fragment pituicyta (P) zawierający liczne lizosomy. Pow. $7\ 000 \times$

mens both from control and experimental rabbits were fixed in 3% glutaraldehyde, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in ethanols and embedded in Epon. Ultrathin sections containing neurohypophysis were stained with uranyl acetate and lead citrate and subsequently examined in a JEM-7a electron microscope.

RESULTS

Control rabbits

In the control rabbits neurohypophysis the ultrastructural features of neurosecretory axons, pituicytes and blood capillaries were similar to those described previously (Barer, Lederis 1966; Christ, Bak 1970; Loesch et al. 1985). In brief, neurohypophysial axons including their terminals in the perivascular area contained abundant neurosecretory granules (Fig. 1a). These axons also contained numerous clear microvesicles and some mitochondria. Pituicytes were embedded between the axon profiles and displayed moderate amounts of cytoplasmic organelles i.e granular endoplasmic reticulum, Golgi complex, mitochondria and some lysosomal bodies (Figs 1b,c).

Heat-stressed rabbits

In comparison to the control animals the body temperature measured in the *rectum* was increased from 38.0°C (control animals) to 40.5°C (after first thermal exposure), 40.2°C (after second), and 39.5°C (after third). 24 h after the last exposure the body temperature of the rabbits was higher from that of controls and stabilized at 39.4°C.

In electron microscopy, the neurohypophysial axons and pituicytes of heat-stressed rabbits displayed ultrastructural features that were absent in control animals. In addition to the scarcity of axon profiles containing neurosecretory granules, the majority of profiles were significantly altered. Most of them appeared as a swollen processes free of neurosecretory granules, showing electron-lucent axoplasm. The profiles contained swollen mitochondria (Fig. 2a). The other profiles, especially those situated in perivascular area, were abundant in clustered microvesicles (Fig. 2b). In some profiles predominance of lysosomal bodies was visible (Fig. 3a). Axon profiles containing myelin sheath-like formations or myelin-like figures have been also observed (Fig. 3b). In these profiles alterations of the axoplasm and mitochondria was visible.

Some of the pituicytes were markedly altered as compared with controls. Two classes of pituicytes were distinguished: The first class of cells displayed numerous cytoplasmic organelles including Golgi complex profiles, swollen mitochondria, free ribosomes, many lysosomal bodies, and some large vacuoles (Figs 3a,c). In some of these cells the

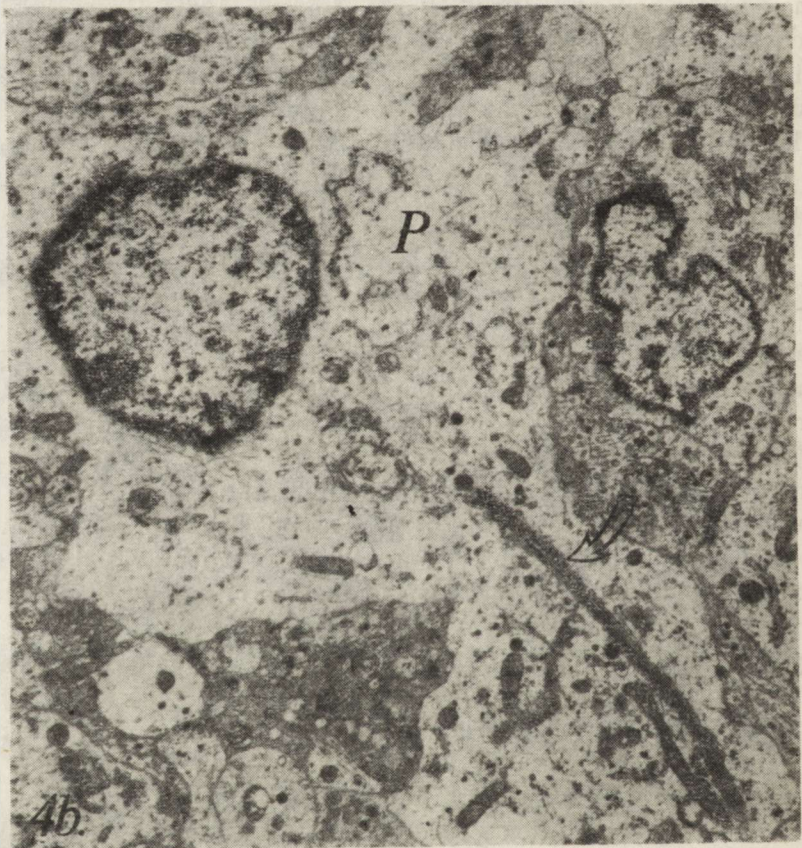
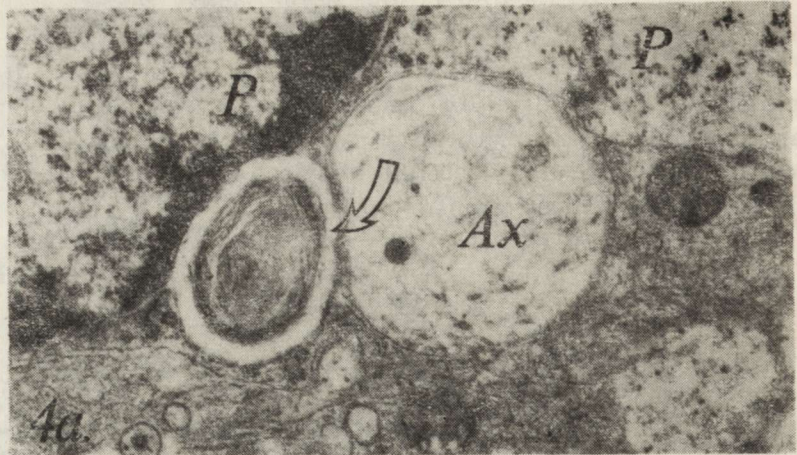


Fig. 4a—b. Heat-stressed rabbit. *4a.* A fragment of pituitary cell (P) displaying vacuole-like structure (arrow) originating from disintegrated nuclear envelope; the structure contains tightly arranged lamellar whorls. Ax — neurosecretory axon. $\times 35\,000$. *4b.* A swollen pituitary cell (P) with cilia emerging from the basal body (arrow) $\times 7\,000$

Ryc. 4a—b. Królik po stresie hipertermicznym. *4a.* Fragment pituicyta (P) z wakuolopodobną strukturą (strzałka) pochodzącą z rozwarstwionej osłonki jądrowej; struktura ta zawiera wewnątrz leżące, gęsto utkane blaszkowate pierścienie. Ax — akson neurosekrecyjny. Pow. $35\,000 \times$. *4b.* Obrzmiały pituicyt (P) zawierający rzęską odchodzącą od ciała podstawowego (strzałka). Pow. $7\,000 \times$

nuclear envelope formed vacuole-like invaginations protruding into the cytoplasm; the invaginations contained loosely or tightly arranged lamellar whorls (Fig. 4a). The second class of pituicytes displayed electron-lucent cytoplasm with scarce organelles. In this class of pituicytes separately located cilia have been encountered. They emerged from the typical basal bodies and ran in parallel to the pituicyte plasmalemma (Fig. 4b).

DISCUSSION

From the results of the present study, it is clear that the neurohypophysial axons and pituicytes undergo ultrastructural alterations 24 h after 3 exposures of rabbits to high ambient temperature. Simultaneously, both neurohypophysial axons and pituicytes exhibit some signs of degeneration.

The present study suggest that the ultrastructural changes of a number of axon profiles, especially those free of neurosecretory granules reflect an enhanced activity of the hypothalamo-neurohypophysial system leading to depletion of neurohormone(s) content in the neurohypophysis. It is well known, that hyperthermic stress causes some changes in neurohormones content in the neurohypophysis. Forsling and Ullmann (1977), and Szczepańska-Sadowska (1977) report an increased vasopressin secretion in mammals upon hyperthermic stress. The possibility must also be considered that upon activation of the hypothalamo-neurohypophysial system of mammals, the neurosecretory material may frequently appear both in granular and extragranular phases (Norström 1975). Thus, it is not certain here, whether the presence of axon profiles free of neurosecretory granules reflects an increased release of neurohypophysial hormones, or if it is an expression of a high rate of neurohormone synthesis. Unfortunately, on the basis of the present study the possible relationship, that may exist between the perceived ultrastructural features of the axons and neurohormone content in the neurohypophysis of heat-stressed rabbits cannot be established. The problem of possible increased vasopressin secretion in heat-stressed rabbits has been discussed in a previous paper (Loesch et al. 1985).

There are some indications in the present study that neurohypophysial axons undergo degeneration in heat-stressed rabbits. Thus, these results confirm some previous observations concerning neurohypophysial axons of rabbits which underwent a single exposure to high ambient temperature (Loesch et al. 1985). In the present study, however, some axons display more drastic alterations, i.e. the appearance of myelin sheath-like or myelin-like figures with simultaneous destruction of the normal structure of the axon. Some lines of evidence suggest that the appearance of the structures mentioned above can be related to ischemic

factors affecting the central nervous system. For example, the multilamellar bodies and the lamellar whorls similar to myelin sheaths have been found within the mongolian gerbil hypothalamo-neurohypophysial system after short-term cerebral ischemia (Loesch 1983a,b). On the other hand, some studies indicate that the appearance of lamellar whorls is related to some physiological changes (metabolic transformation difficult to identify) rather than to anoxic-ischemic conditions exclusively (Yu et al. 1972). It is striking to note, however, that in heat-stressed mammals the involvement of some ischemic factors (i.e. increase of brain oxygen consumption, increase in brain-barrier permeability, thermally stimulated panting) leading to development of cerebral ischemia is evident (Carlsson et al. 1976).

The present study indicates that pituicytes participate in the general response of the hypothalamo-neurohypophysial system to the application of heat-stress. Still, however, the functional role of pituicytes is not clear (see for review: Witkowski 1980). On the other hand, several studies evidenced some ultrastructural changes within pituicytes which suggest an active involvement of the cells in certain physiological processes that may take place in the neurohypophysis under physiological or pathological conditions (Krsulovic, Brückner 1969; Dellman et al. 1974; Takei et al.; 1980; Tweedle, Hatton 1980; Loesch 1981, 1983b). Similarly, the same is true for the pituicytes cultured *in vitro* (Dellmann 1973; Zareba-Kowalska et al. 1983).

There is a coincidence between the ultrastructural features of some pituicytes in heat-stressed rabbits and those found in the cat neurohypophysis after acute short-term intracranial pressure (Rap, Chwalbińska-Moneta 1978). In both types of the above mentioned stress the appearance of pituicytes with dislaminated nuclear membrane was noted. Rap and Chwalbińska-Moneta (1978) suggest that the enhanced activity of the hypothalamo-neurohypophysial system (including reactive forms of pituicytes) upon intracranial hypertension is induced by the effect of ischemic hypoxia. Thus, as concerns the above mentioned observations, the possibility cannot be excluded that some of the ultrastructural changes within pituicytes of heat-stressed rabbits are associated with developed (less or more) cerebral ischemia.

The appearance of ciliated pituicytes that also display some swelling of cell body may be of similar origin in heat-stressed rabbits. Ciliated pituicytes ("ependymal pituicytes") were also observed in other pathological conditions, for example, in patients undergoing hypophysectomy for palliative treatment of advanced carcinoma (Takei et al. 1980). On the other hand, the occurrence of ciliated pituicytes may be discussed in relation to the possible neuroectodermal ependymal origin of some pituicytes in the mammalian neurohypophysis (Holmes, Ball 1974; Galabov, Schiebler 1978; Takei et al. 1980).

In conclusion, the ultrastructural data reported in the present paper suggest the involvement of the neurohypophysial axons and pituicytes in reorganization of the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbits in response to the 3 times applied heat-stress. The results disclose some ultrastructural alterations of many neurohypophysial axons and pituicytes.

WPLYW WYSOKIEJ TEMPERATURY OTOCZENIA
NA CZĘŚĆ NERWOWĄ PRZYSADKI KRÓLIKA.

KOLEJNE ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W AKSONACH I PITUICYTACH

Streszczenie

Badano ultrastrukturę aksonów i pituicytów królików poddanych trzykrotnie (co 24 godz.) działaniu wysokiej temperatury (38—39°C) przez 3 godziny. Wycinki z części nerwowej przysadki pobierano 24 godz. po ostatniej ekspozycji na wysoką temperaturę.

Zaobserwowano zmniejszenie ilości aksonów zawierających ziarnistości neurosekrecyjne z równoczesnym zaburzeniem podstawowej struktury aksonów. Dodatkowo aksony te wykazały obecność struktur przypominających osłonki mielinowe lub wieloblaszkowe pierścienie. Pituicyty różnorodnie reagowały na stres termiczny. Niektóre pituicyty miały obfitą ilość organelli cytoplazmatycznych i ponadto wykazywały obecność elektronowo-jasných wakuoli w cytoplazmie. Osłonka jądrowa tych komórek wpuklała się miejscami do cytoplazmy tworząc struktury podobne do wakuoli, wypełnione licznymi blaszkowatymi pierścieniami. Inne pituicyty wykazywały cechy obrzęku i charakteryzowały się skąpą ilością organelli cytoplazmatycznych. Posiadały one ponadto rzęski wychodzące z typowego ciała podstawowego.

Powyższe obserwacje wskazują na udział aksonów i pituicytów części nerwowej przysadki w adaptacji neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego królika w odpowiedzi na trzykrotny stres hipertermiczny.

ВЛИЯНИЕ ВЫСОКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ
НА НЕРВНУЮ ДОЛЮ ГИПОФИЗА У КРОЛИКА.
ДАЛЬНЕЙШИЕ ПРИЗНАКИ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ
В АКСОНАХ И ПИТУИЦИТАХ

Резюме

В работе дается оценка ультраструктуры аксонов и питуицитов кролика, подвергнутого трехкратному (с интервалом в 24 часа) воздействию высокой температуры (38—39°C) при продолжительности каждого сеанса 3 часа. Тканевые блоки из нервной доли гипофиза были взяты через 24 часа после последнего сеанса.

Было обнаружено сокращение числа аксонов, содержащих зерна нейросекрета, а также нарушение основной структуры аксонов. Кроме того, внутри или снаружи аксонов наблюдались структуры, напоминающие миелиновые оболочки или мультиламеллярные кольца. Питуициты реагировали на гипертермический стресс по-разному. Некоторые из них отличались избытком цитоплазматических органелл наряду с присутствием в цитоплазме электронно-светлых вакуолей. В ядерной оболочке этих клеток местами отмечались влия-

ния в цитоплазму, сходные по структуре с вакуолью, заполненной многочисленными ламеллярными кольцами. Другие питуициты проявляли признаки набухания при небольшом числе цитопластических органелл; эти питуициты обладают, кроме того, ресничками, выступающими из обычного базального тельца. Вышеупомянутые наблюдения свидетельствуют об участии аксонов и питуицитов нервной доли гипофиза в адаптации невросекреторной гипоталамо-гипофизарной системы в ответ на трехкратный гипертермический стресс.

REFERENCES

1. Barer R., Lederis K.: Ultrastructure of the rabbit neurohypophysis with special reference to the release of hormones. *Z. Zellforsch.*, 1966, 75, 201—239.
2. Carlsson C., Hagendal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphatases, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001—1006.
3. Christ J. F., Bak I. J.: Some fine structural observations on the small vesicular components in the posterior pituitary nerve fibres of rabbit. *Z. Mikr. Anat. Forsch.*, 1970, 81, 329—344.
4. Dellmann H.-D.: Degeneration and regeneration of neurosecretory system. *Int. Rev. Cytol.*, 1973, 36, 215—315.
5. Dellmann H.-D., Stoeckel M. D., Porter A., Stutinsky F.: Ultrastructure of the neurohypophysial glial cells following stalk transection in the rat. *Experientia*, 1974, 30, 1220—1222.
6. Forsling M. L., Ullmann E. A.: Non-osmotic stimulation of vasopressin release. In: *Neurohypophysis*. Eds. A. M. Moses, L. Share, Karger, Basel 1977, 128—135.
7. Gajkowska B., Loesch A., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 55—69.
8. Galabov P., Schebler T. H.: The ultrastructure of the developing neural lobe. *Cell Tissue Res.*, 1978, 189, 313—329.
9. Holmes R. L., Ball J. N.: The pituitary gland, a comparative account. Cambridge Univ. Press, London 1974, 63—94.
10. Krsulovic J., Brückner G.: Morphological characteristics of pituicytes in different functional stages. Light- and electron microscopy of the neurohypophysis of the albino rat. *Z. Zellforsch.*, 1969, 99, 210—220.
11. Loesch A.: The pituicytes in normal and dehydrated rats: an electron-microscope study including ZIO-impregnation. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 1—19.
12. Loesch A.: The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983a, 61, 545—556.
13. Loesch A.: The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The neurohypophysial axons and pituicytes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983b, 61, 557—568.
14. Loesch A., Gajkowska B., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 71—81.
15. Norström A.: Axonal transport and turnover of neurohypophysial proteins in the rat. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1975, 248, 46—63.
16. Rap Z. M., Chwalbińska-Moneta J.: Vasopressin concentration in the blood

- during acute short-term intracranial hypertension in cats. In: *Advances in Neurology*. Eds. J. Cervós-Navarro, E. Betz, G. Ebhardt, R. Ferszt, R. Wullenweber, Raven Press, New York 1978, 20, 381—388.
17. Szczepańska-Sadowska Z.: Physiological mechanism suppressing thirst and enhancing vasopressin release in hyperthermia. *Studia Societatis Scientiarum Torunensis*. PWN, Warsaw 1977, 3, 1—11.
 18. Takei Y., Seyama S., Pearl G. S., Tindall G. T.: Ultrastructural study of the human neurohypophysis. II. Cellular elements of neural parenchyma, the pituicytes. *Cell Tissue Res.*, 1980, 205, 273—287.
 19. Tweedle C. D., Hatton G. I.: Evidence of dynamic interactions between pituicytes and neurosecretory axons in the rat. *Neuroscience*, 1980, 5, 661—667.
 20. Witkowski W.: Zur Morphologie der Glia in der Neurohypophyse. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Eds.: A. Oksche, L. Vollrath, Springer, Berlin 1980, Bd 4, T. 10, 667—756.
 21. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1972, 22, 222—234.
 22. Zaręba-Kowalska A., Renkawek K., Gajkowska B.: Ultrastructural study of the hypophysial neural lobe of newborn rats in tissue culture. *Cell Tissue Res.*, 1983, 230, 463—468.

Author's address: Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa

BARBARA GAJKOWSKA

ELECTRON MICROSCOPIC DEMONSTRATION
OF LUTEINIZING HORMONE-RELEASING HORMONE (LH—RH)
BY THE IMMUNOGOLD STAINING METHOD

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

PRELIMINARY OBSERVATION

The mammalian anterior pituitary gland is a neuroendocrine tissue composed of many different cell types each producing different peptide hormones. The hormones were identified immunohistochemically by means of specific rabbit antisera against the hormones and they were localized by using peroxidase-labeled sheep anti-rabbit γ -globulin (Nakane 1970).

Histochemical studies and electron microscopic examinations have revealed that the gonadotroph cell population is morphologically heterogeneous. Originally two different cell types were distinguished (Herlant 1964; Kurosumi, Oota 1968). One was characterized by the presence of two populations of secretory granules, the size of which was about 200 and 700 nm, respectively. The other was smaller and contained secretory granules of homogeneous size (250 nm). There is now strong evidence that each of these cell types contains both gonadotropins FSH and LH (Denef et al. 1982).

Gonadotropin secretion from the anterior pituitary is controlled by LH—RH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone), via interaction with specific glycoprotein receptors at the surface gonadotrophy cells (Hazum 1982). In the present study, the distribution of luteinizing hormone-releasing hormone immunoreactive material in gonadotropin cells was investigated.

MATERIAL AND METHODS

Animals: Anterior pituitaries from five 3-month-old male Sprague-Dowley rats were immediately taken.

Immunogold procedure: After fixation with 4% paraformaldehyde containing 0.05% glutaraldehyde, pH 7.4 in Sørensen phosphate buffer for 1 h the tissue samples were dehydrated in a graded series of methanol and finally embedded in Lowicryl K₄M according to Carleman et al. (1982).

The sections mounted on nickel grids were floated on 1% BSA before incubation for 90 min at room temperature in anti-LH-RH serum diluted 1/20 in PBS. Then the grids were washed with PBS, floated 15 min on normal goat serum (diluted 1/5 PBS) and then 30 min or 60 min on goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated to colloidal gold particles 5 nm in diameter (1/50 in PBS) (Janssen Pharmaceutica Beerse Belgium).

After successive washing in PBS and distilled water the grids were air-dried. They were stained with uranyl acetate 4.7% in distilled water for 20 min, washed, air-dried and then washed for 30 sec with Reynold's solution.

Electron microscopy: Sections were examined and photographed in a Philips EM 300.

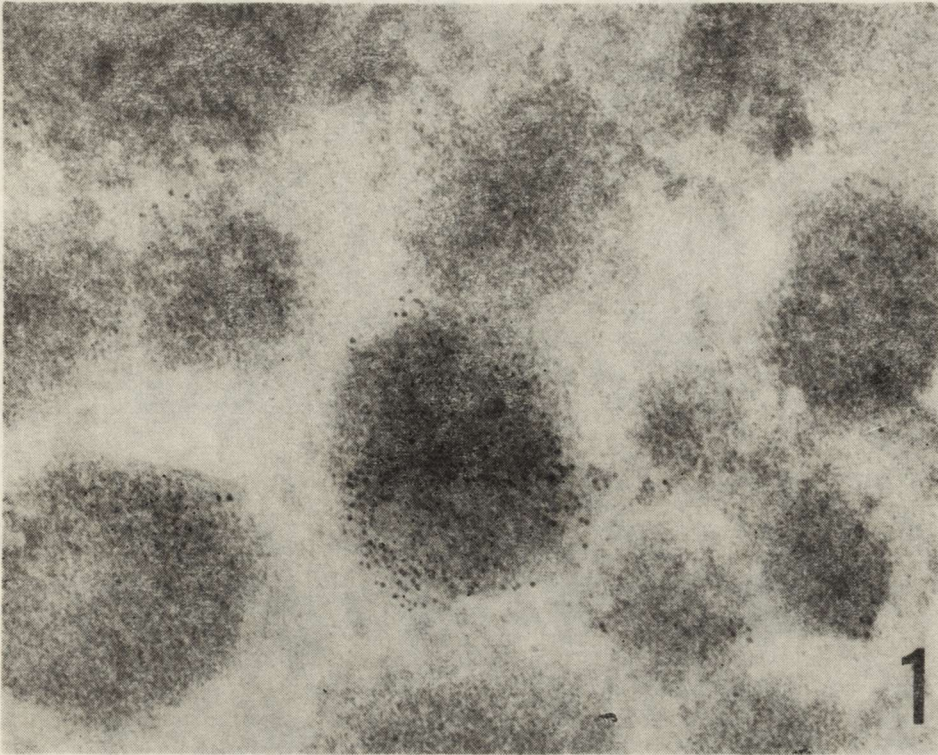
RESULTS

LH—RH immunoreactive material was found in gonadotroph cells containing numerous characteristic secretory granules.

The reactive concentration of gold particles in numerous secretory granules (labeled with 5 nm great particles of colloidal gold) are easily distinguishable at the electron microscope level (Fig. 1). Even high contrast counterstaining with heavy metal salts (uranyl acetate and lead citrate) does not mask the immunoreactivity.

In electron microscopy many gonadotroph cells contained two types of secretory granules of various size in the range of 200—700 nm. Only large secretory granules homogeneous and electron less dense were labeled by gold particles in varying numbers. Other, smaller, electron-dense granules and subcellular compartments were devoid of the gold particles (Fig. 2).

Many gonadotroph cells contained smaller (200—250 nm) secretory granules which had more electron-dense homogeneous contents. Immunocytochemically LH—RH could be detected by the immunogold staining (IGS) method in numerous secretory granules labeled with 5 nm particles of colloidal gold (Fig. 3). Most secretory granules in all cells contain gold particles in varying numbers located over or within smaller secretory granules. Little or no immunoreactivity was present in other granules in these gonadotroph cells.



Figs 1—3. Ultrathin section of gonadotropic cells embedded in Lowicryl K₄M. They were labeled by immuno-gold-staining (IGS) for LH—RH

Ryc. 1—3. Ultrastruktura komórek gonadotropowych zatapianych w Lowikrylu K₄M znakowanych immuno-gold-staining (IGS) dla hormonu LH—RH

Fig. 1. Gold particles were concentrated over or within the individual secretory granules. Uranyl acetate and lead citrate counterstain. $\times 120\ 000$

Ryc. 1. Cząsteczki złota koncentrują się powyżej i wewnątrz pojedynczych ziarnistości sekrecyjnych. Preparaty dobarwione octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Pow. 120 000 \times

DISCUSSION

LH—RH was first demonstrated immunocytochemically by Barry and Dubois (1973) in the hypothalamus and preoptic area of the guinea pig. Many reports have subsequently described the distribution of the LH—RH immunoreaction product in a wide variety of species including the rat (Bennett-Clarke, Joseph 1982; Witkin et al. 1982). The present report indicates that LH—RH is located immunocytochemically in some secretory granules of morphologically different gonadotroph pituitary cells. Coloidal gold clearly indicates the immunopositive structures without obscuring their identity.

In the present study two types of secretory granules in separated cells showed immunoreactivity, it is supposed that granules contain

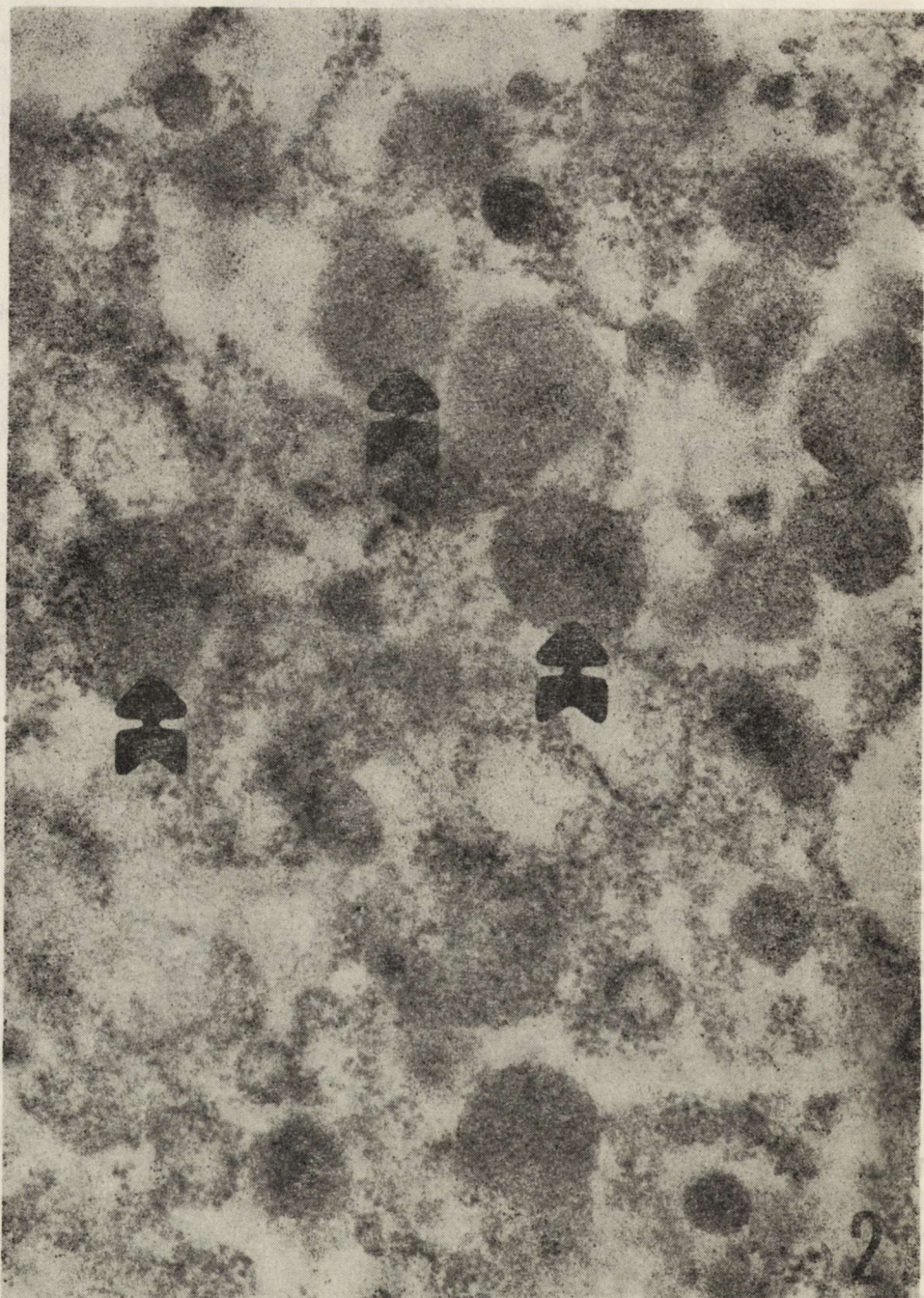


Fig. 2. Two types of secretory granules are present. Not all granules are stained. Only individual and large secretory granules contain clusters of gold particles (arrows). Uranyl acetate and lead citrate counterstain. $\times 16\ 000$

Ryc. 2. Widoczne 2 typy ziarnistości sekrecyjnych. Nie wszystkie ziarnistości są wyznakowane. Tylko pojedyncze i duże ziarnistości zawierają zbite cząsteczki złota (strzałki). Preparaty dobarwiane octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Pow. $16\ 000 \times$

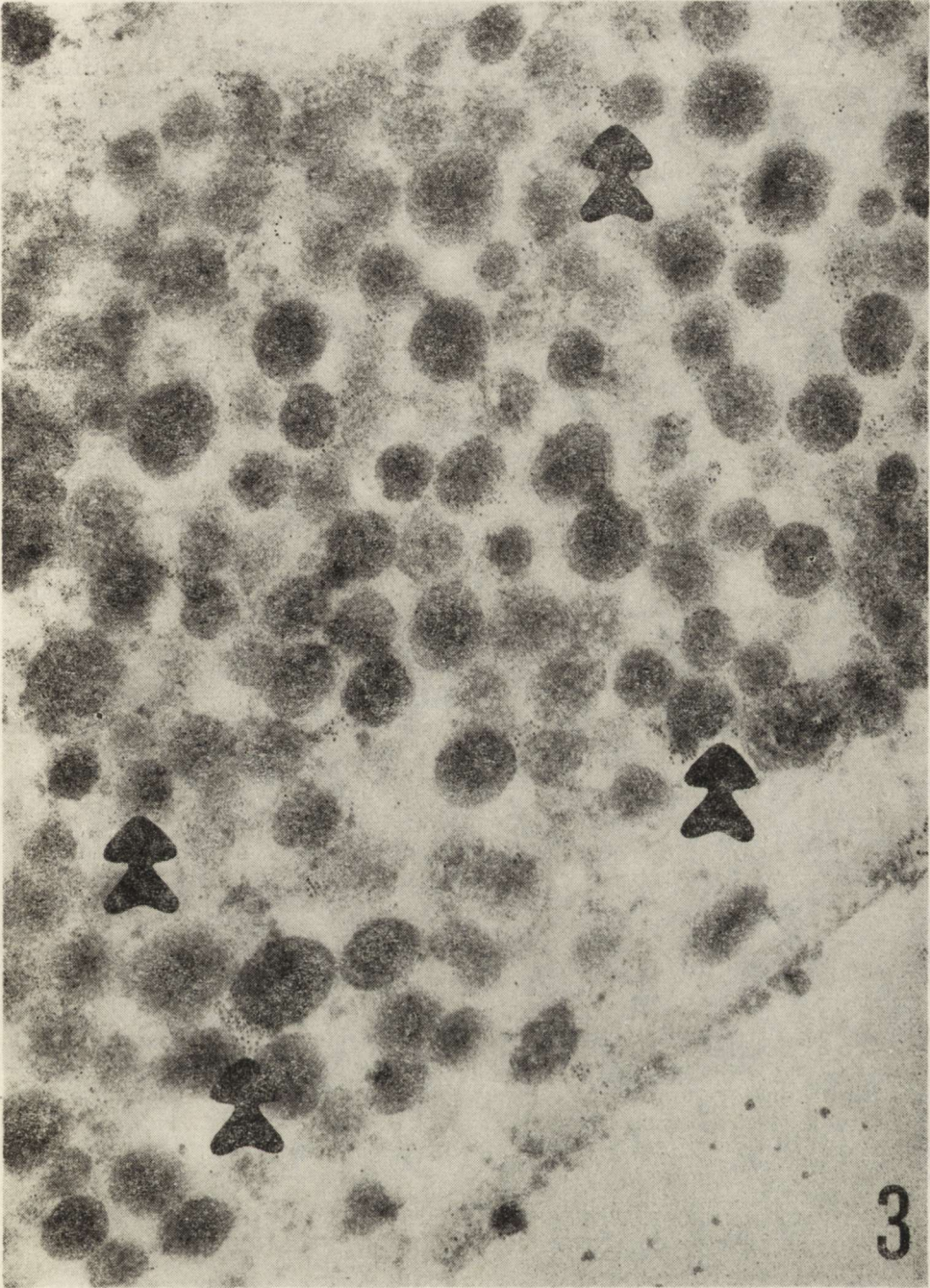


Fig. 3. One type of small, electron-dense secretory granules. A lot of immunoreactive granules marked with 5 nm particles of colloidal gold (arrows). There was little or no immunoreactivity in other granules. Uranyl acetate and lead citrate counterstain. $\times 16\ 000$

Ryc. 3. Widoczny 1 typ ziarnistości sekrecyjnych. Dużo immunoreaktywnych ziarnistości jest wyznakowanych cząsteczkami złota koloidalnego o średnicy 5 nm (strzałki). Niektóre ziarnistości wykazują mniejszą lub żadną reaktywność immunologiczną. Preparaty dobarwiane octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Pow. $16\ 000 \times$

LH or FSH hormone. However, segregation of LH and FSH in different secretory granules of the same cells was determined by Phifer et al. (1973). Evidence has been given that morphologically distinct gonadotroph cell types are also functionally different. The changes in the ultrastructural appearance of the gonadotrophs reflect significant changes in their cell-physiological functions (Nakane 1970).

Immunocytochemical observations are important in view of the fact that LH—RH stimulates both FSH and LH secretion, but that the proportional release of these hormones changes with physiological, experimental and developmental conditions (Denef et al. 1982). Several immunocytochemical observations suggest that LH—RH may be present in different compartments in the brain (Burchanowski et al. 1979; Bennett-Clarke, Joseph 1980) with speculation that it serves neurotransmitter functions in these areas.

The present preliminary study was performed on normal animals. The results lead to the suggestion that in experimental conditions (castration, adrenalectomy etc.) the distribution of immunocytochemically demonstrable LH—RH will supply more data.

Acknowledgements: The author thank Dr. Edmond Puvion from I.R.S.C. Villejuif (France) for providing facilities in his Laboratory and Dr. Kazimierz Kochman from Institute of Animal Physiology and Nutrition, Jabłonna near Warsaw (Poland) for generous supply of the LH—RH antisera.

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY LH—RH W METODZIE IMMUNOLOGICZNEJ Z ZASTOSOWANIEM ZŁOTA

Streszczenie

Zbadano immunocytochemicznie lokalizację LH—RH w komórkach gonadotropowych przysadki stosując metodę IGS (immuno-gold staining). Cząsteczki złota (5 nm) koncentrowały się wyraźnie, znakując duże (elektronowo przezierne) i mniejsze (elektronowo gęste) ziarnistości sekrecyjne znajdujące się w oddzielnych komórkach gonadotropowych.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ LH—RH С ПРИМЕНЕНИЕМ ЗОЛОЧЕНИЯ КАК ЧАСТЬ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Резюме

В работе представлены результаты иммуноцитологических исследований по определению локализации LH—RH в гонадотропных клетках гипофиза методом иммунозолочения (IGS, immuno-gold-staining). Частицы золота (5 нм) отчетливо концентрировались, обозначая более крупные, электронно-светлые, и менее крупные, электронно-темные, зерна секрета, расположенные в отдельных гонадотропных клетках.

REFERENCES

1. Barry J., Dubois M.: Étude en immunofluorescence des structures hypothalamiques a competence gonadotrope. *Ann. Endocr., (Paris)* 1973, 34, 735—741.
2. Bennett-Clarke C., Joseph S.: Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LH—RH) in rat brain. *Cell Tiss. Res.*, 1985, submitted.
3. Bennett-Clarke C., Joseph S.: Immunocytochemical distribution of LH—RH neurons and processes in the rat: hypothalamic and extrahypothalamic location. *Cell Tiss. Res.*, 1982, 221, 493—451.
4. Burchanowski B., Knigge K., Sternberger L.: Rich ependymal investment of luteoliberin (LH—RH) fibers revealed immunocytochemically in Golgi-like image. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 1979, 76, 6671—6678.
5. Carleman E., Villiger W., Garavito M., Acetarin J.: The set-up for UV-polymerization. *Lowicryl Letters*, 1982, 1, 1—8.
6. Deneff C., Swennen L., Andries M.: Separated anterior pituitary cells and their response to hypophysiotropic hormones. *Int. Rev. Cytol.*, 1982, 76, 225—244.
7. Hazum E.: Gn RH receptor of rat pituitary is a glycoprotein differential effect of neuroamidase and lectins on antagonists and antagonists binding. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1982, 26, 217—221.
8. Herlant M.: The cells of the adenohypophysis and their functional significance. *Int. Rev. Cytol.*, 1964, 17, 299—368.
9. Kurosumi K., Oota Y.: Electron microscopy of two types of gonadotrophs in the anterior pituitary gland of persistent estrous and diestrous rats. *Z. Zellforsch.* 1968, 85, 34—39.
10. Nakane P. K.: Classification of anterior pituitary cell types with immunoenzyme histochemistry. *J. Hist. Cytochem.*, 1970, 18, 9—20.
11. Phifer R., Midgley A., Spicer S.: Immunohistologic and histologic evidence that follicle-stimulating and luteinizing hormones are present in the same cell types in human pars distalis. *J. Clin. Endocr.*, 1973, 36, 125—128.
12. Witkin J., Paden C., Silverman A.: The luteinizing hormone-releasing hormone (LH—RH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 1982, 35, 429—432.

Author's address: Laboratory of Ultrastructure of the Nervous system, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Dworkowa Str., 00—784 Warszawa.

Тереса Бугера, Мечислав Сьмялэк: Патоморфологические изменения в центральной нервной системе крыс вызванной интоксикацией ацетатом кобальта и ишемией мозга	209
Павел П. Либерски: Глиоцитоз при экспериментальной scrapie (штамм 263 К) у сирийских хомячков	221
Евгения Тарновска-Дзидушко, Петр Козловски: Сопоставление результатов компьютерной томографии с морфологией мозговых изменений при сосудистых заболеваниях центральной нервной системы	231
Ришард Плюта: Ранние ультраструктурные изменения в стволовых узлах, мозжечке и продолговатом мозгу в результате полной ишемии мозга в течение 30 минут	243
Маря Помбска, Богна Шмидт-Сидор, Милена Лауре-Камионовска, Тадеуш Избицки: Изменения в мозгу детей, причиной смерти которых были злокачественные заболевания	261
Анджей Леш: Влияние высокой температуры окружающей среды на нервную долю гипофиза у кролика. Дальнейшие признаки ультраструктурных изменений в аксонах и питуицитах	271
Барбара Гайковска: Электронно-микроскопический анализ LH—RH с применением золочения как часть иммунологических исследований	283

CONTENTS

Maria Dąbwska, Krystyna Wiśniewska, Piotr Kozłowski, Joanna Sher: Neuropathology of acquired immune deficiency syndrome	133
Elżbieta Kida: Ultrastructural properties of rat substantia nigra in organotypic culture	145
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Iliа Victorov, Natalia Szaszko: Morphological changes in rat substantia nigra induced <i>in vitro</i> by serum from patients with Parkinson's disease	161
Halina Weinrauder, Mirosław J. Mossakowski, Irina V. Ganuszka: Influence of sera from patients with hepato-lenticular degeneration treated with d-penicilamine on the development of Wilsonian gliopathy <i>in vitro</i>	169
Anna Taraszewska: Morphological characteristic of sudanophilic deposits appearing in the course of abnormal myelination in pt rabbit	183
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerczewicz, Aleksander Piechowski, Janina Stanisławska, Danuta Talkowska, Jadwiga Pankrac: Effect of TET intoxication on the pattern of myelin lipids in rats kept during the development on a diet with various amounts of lipids	195
Teresa E. Bugera, Mieczysław Śmiałek: Pathomorphological changes in the CNS of rat following cobaltous acetate intoxication with simultaneous brain ischemia	209
Paweł P. Liberski: Gliocytosis in experimental scrapie (263K strain of scrapie) in golden syrian hamsters	221
Eugenia Tarnowska-Dziduszko, Piotr Kozłowski: Confrontation of computer tomography pictures with the morphology of changes in the brain due to vascular diseases of the central nervous system	231
Ryszard Pluta: Early ultrastructural changes in basal ganglia, cerebellum, and medulla oblongata following 30-min complete cerebral ischemia	243
Maria Dąbwska, Bogna Schmidt-Sidor, Milena Laure-Kamionowska, Тадеуш Избицки: Changes in brains of infants and children who died of neoplastic diseases	261
Andrzej Loesch: Effect of high ambient temperature on the neurohypophysis of the rabbit. Further evidence of ultrastructural alterations in neurohypophysial axons and pituicytes	271
Barbara Gajkowska: Electron microscopic demonstration of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) by the immunogold staining method	283

SPIS TREŚCI

Maria Dąbaska, Krystyna Wiśniewska, Piotr Kozłowski, Joanna Sher: Neuropatologia zespołu nabytej niewydolności immunologicznej	133
Elżbieta Kida: Obraz ultrastrukturalny istoty czarnej szczura w organotypowej hodowli tkankowej	145
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawk, Ilia Victorov, Natalia Szaszko: Zmiany morfologiczne istoty czarnej szczura <i>in vitro</i> poddanej działaniu surowic uzyskanych od pacjentów z chorobą Parkinsona	161
Halina Weinrauder, Mirosław J. Mossakowski, Irina V. Ganuszki: Wpływ surowic chorych na zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym leczonych d-penicylaminą na rozwój gliopatii wilsonowskiej <i>in vitro</i>	169
Anna Taraszewska: Morfologiczna charakterystyka złożeń sudanofilnych występujących w przebiegu nieprawidłowej mielinizacji u królika pt	183
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Gonczewicz, Aleksander Piechowski, Janina Stanisławska, Danuta Talkowska, Jadwiga Pankrac: Wpływ zatrucia TET na obraz lipidów mieliny szczurów żywionych w czasie rozwoju diety z różną zawartością lipidów	195
Teresa E. Bugera, Mieczysław Smiałek: Zmiany patomorfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym szczura w następstwie zatrucia octanem kobaltowym i niedokrwienia mózgu	209
Paweł P. Liberski: Gliocytoza w doświadczalnej scrapie (szczep 263K) u złotych chomików syryjskich	221
Eugenia Tarnowska-Dziduszko, Piotr Kozłowski: Konfrontacja obrazów tomografii komputerowej z morfologią zmian mózgowych w chorobach naczyńnych ośrodkowego układu nerwowego	231
Ryszard Pluta: Wczesne zmiany ultrastrukturalne w zwojach podstawy, mózdzku i rdzeniu przedłużonym po całkowitym 30-minutowym niedokrwieniu mózgowia	243
Maria Dąbaska, Bogna Schmidt-Sidor, Milena Laure-Kamionowska, Tadeusz Izbicki: Zmiany w mózгах dzieci zmarłych z powodu choroby nowotworowej	261
Andrzej Loesch: Wpływ wysokiej temperatury otoczenia na część nerwową przysadki królika. Kolejne zmiany ultrastrukturalne w aksonach i pituicytach	271
Barbara Gajkowska: Obraz mikroskopowo-elektronowy LH-RH w metodzie immunologicznej z zastosowaniem złota	283

СОДЕРЖАНИЕ

Маря Домбска, Кристина Вишньевска, Петр Козловски, Йоанна Шер: Невропатология синдрома AIDS	133
Эльжбета Кид: Электронно-микроскопическая картина черного вещества крысы в органотипической культуре ткани	145
Эльжбета Кид, Кристина Ренкавек, Илья Викторов, Наталия Шашкова: Морфологические изменения черного вещества крысы, подвергнутого <i>in vitro</i> воздействию сывороток, полученных от пациентов, страдающих болезнью Паркинсона	161
Халина Вейнраудер, Мирослав Я. Моссаковский, Ирина Ганушкина: Влияние сыворотки больных, страдающих гепато-церебральной дегенерацией и прошедших курс лечения пенициламином на развитие <i>in vitro</i> Вильсоновой глиопатии	169
Анна Тарашевска: Морфологическая характеристика суданофильных отложений наблюдающихся в ходе неправильной миелинизации у кролика рт	183
Мечислав Вендер, Зоя Адамчевска-Гонцкевич, Александр Пеховски, Янина Станиславска, Данута Талковска, Ядвига Панкрац: Влияние отравления TET на состав липидов миелина крыс, в питании которых во время развития содержалось различное количество липидов	195