

eqz 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 24

1986

ZESZYT 3

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 24

1986

ZESZYT 3

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

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

ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-54-10, 49-54-20

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1986.
Nakład: 570 egz. Objętość: ark. wyd. 10,10, ark. druk. 8,75, ark.
A₁-12. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania
1986.06.3. Podpisano do druku 1986.12.8. Druk ukończono w grud-
niu 1986. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 1287/86. J-14.

Cena zł 150.—

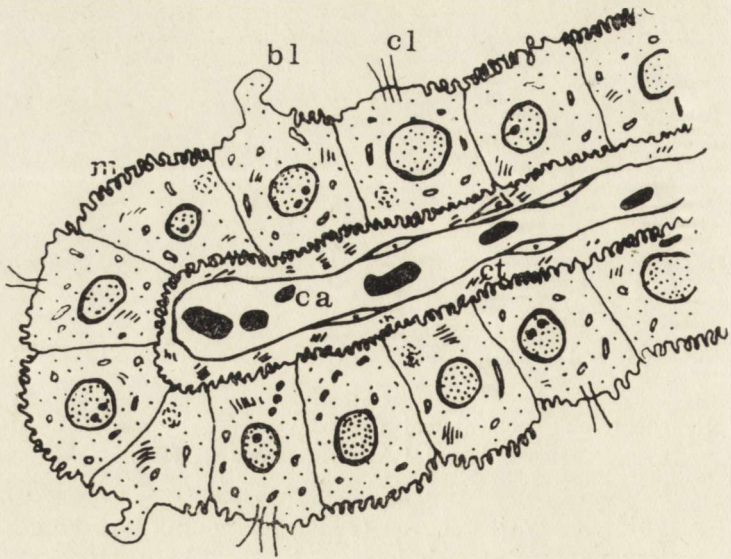
LECH IWANOWSKI

ULTRASTRUKTURA SPLOTU NACZYNIÓWKOWEGO

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Splot naczyniówkowy jest coraz częściej przedmiotem badań jako jeden z substratów anatomicznych bariery krew—mózg. Niedokładna znajomość jego złożonej struktury, którą uwidacznia badanie mikroskopowo-elektronowe, może nastęrczać trudności w ocenie, jakie elementy obserwowanego obrazu należy zaliczyć do prawidłowych, a jakie do patologicznych. Brak zbiorczego opracowania ultrastruktury splotu naczyniówkowego w języku polskim skłonił autora do napisania tej pracy, w której oprócz danych z piśmiennictwa wykorzystano własne obserwacje i udokumentowano je elektronogramami pochodzącymi od królika, kota i psa w różnym wieku. Badania przeprowadzone na zwierzętach i na materiale ludzkim wykazały brak istotnych różnic w budowie splotu naczyniówkowego pomiędzy poszczególnymi gatunkami kręgowców (Maxwell, Pease 1956; Tennyson, Pappas 1967). W badaniach własnych dla uwypuklenia pewnych szczegółów w budowie splotu użyto jako znacznika peroksydazy chrzanowej Sigma II, którą wszystkim badanym zwierzętom podawano dożylnie na 5—15 minut przed perfuzją glutaraldehydem. Opracowanie laboratoryjne pobranego materiału — według metody Karnowskiego.

Splot naczyniówkowy powstaje z wpuklenia opony naczyniowej do światła komór. Oponę pokrywa jednowarstwowy nabłonek sześcienny. Splot zbudowany jest z kosmków (ryc. 1). Oprócz kosmków w splocie komór, drobne kępiki komórek splotu występują również w przestrzeni podpajęczynówkowej kanału kręgowego. W skład każdego kosmka wchodzi zrąb łącznotkankowy, na który składają się elementy naczyniowe oraz komórki i włókna tkanki łącznej. Elementy naczyniowe splotu są reprezentowane przez tętniczki (*arteriolae*), charakteryzujące się obecnością warstwy mięśniowej, leżące w głębi zrębu żyłki (*venulae*) z ciągłym śródbłonkiem, nie posiadającym mięśniówki, oraz najobficiej występujące włosniczki. Zarówno tętniczki, jak i żyłki mają średnicę wyraźnie większą od włosniczek. Ścianę włosniczek splotu tworzą komórki



Ryc. 1. Schemat kosmka splotu naczyńkowego. Pojedyncza warstwa nabłonka sześciennego okrywa zrąb łącznotkankowy, którego środek stanowi włosniczka (ca) z okienkowanym śródbłonkiem. Pomiedzy włosniczką a podstawą komórek nabłonka znajduje się przestrzeń pozakomórkowa i osłonka łącznotkankowa (ct). Na wolnej przestrzeni nabłonka widoczne są mikrokosmki (m), bąblowate wypuklenia (bl) i kępki rzęsek (cl)

Fig. 1. Schematic diagram of villus of the choroid plexus. Monolayer cuboid epithelium covers the connective tissue stroma. The centre of the villus consists of capillary (ca) with fenestrated endothelium. Extracellular space and a connective tissue sheath (ct) between the capillary and the base of epithelial cells are seen. At the free epithelial surface there are microvilli (m), apical blebs (bl) and cilia (cl)

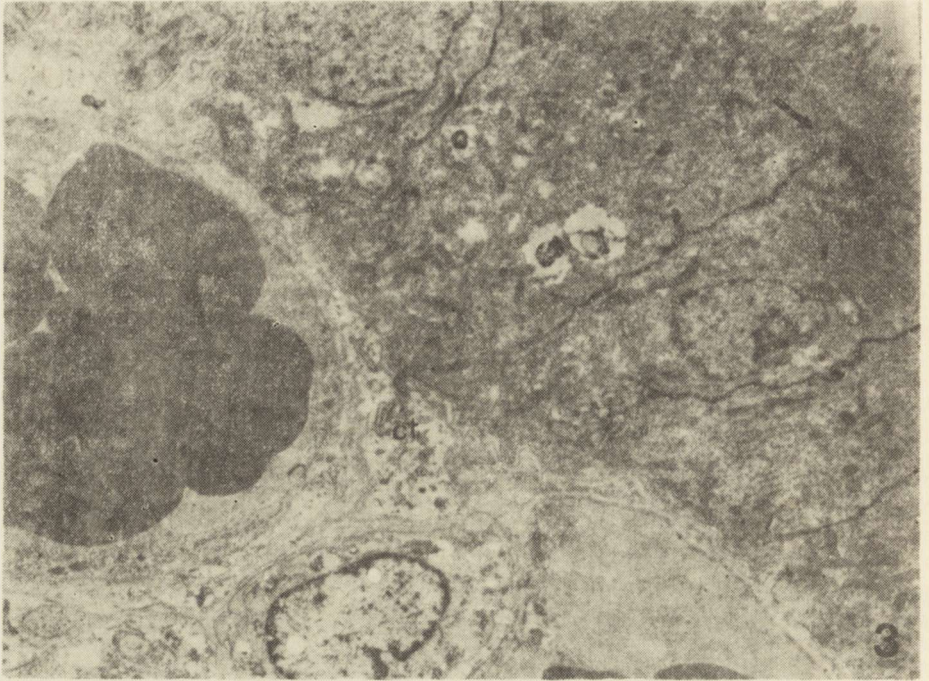
śródbłonka. Na przekrojach tych komórek rzadko widać szeroki perykarion z jądrem i licznymi organellami; przeważnie spostrzega się jedynie wąską wypustkę cytoplazmatyczną, prawie pozbawioną mitochondriów. Cytoplazma komórki jest pofragmentowana, występują przerwy w jej ciągłości, tzw. okienka. Ścianę włosniczki stanowią w ich obrębie tylko zlepione listki błony brzeżnej i błona podstawna (ryc. 2). Włosniczki o ścianie okienkowanej są pozbawione perycytów. Spotyka się również włosniczki o ścianie ciągłej. Od zewnętrznej strony błony podstawnej śródbłonka leżą komórki nabłonka splotu (ryc. 2 i 3). Oddziela je przestrzeń pozakomórkowa o nieregularnym kształcie, przeważnie szerokości błony podstawnej, ale miejscami nawet kilkakrotnie szersza. Często między włosniczką a nabłonkiem obserwuje się osłonkę łącznotkankową. W odróżnieniu od osłonki glejowej wokół naczyń śródmiąższowych mózgu, wspomniana osłonka nie jest ciągła. Tworzą ją komórki opony naczyniowej z długimi wypustkami, zbliżone wyglądem do fibroblastów. Rzadko spotyka się przekroje przez ich perykarion. Nie stanowią one przeszkody dla dyfuzji płynów. Podany znacznik przenika szybko między nimi. We wczesnym okresie po podaniu znacznik jest widoczny w całej



Ryc. 2. Noworodek króliczy. Włośniczka o okienkowanym śródbłonku (cienka strzałka). W przyległej przestrzeni pozakomórkowej widoczne mikrofibryle kolagenowe (!). Powierzchnia podstawna komórki nabłonka splotu z nóżkowatymi wypustkami (gruba strzałka). W komórce widoczne liczne mitochondria, rzędowy układ zbiorników siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i przylegający do niej lipofagosom (lp). Pow. 10 500 \times

Fig. 2. Newborn rabbit. Fenestrated capillary endothelium (thin arrow). In adjacent extracellular space collagen microfibrils (!). Footshape extension (thick arrow) of basal surface of epithelial cell. Within the cell cytoplasm numerous mitochondria, multirow granular endoplasmic reticulum cisterns and adjacent to them a lipophagosom (lp). $\times 10\ 500$

przestrzeni pozakomórkowej. Przez komórkę znacznik przechodzi drogą pinocytozy. Przypuszczalnie część znaczonych pęcherzyków pinocytarnych może łączyć się również z błonami wewnątrzkomórkowymi, gdyż ślady znacznika widoczne są niekiedy na błonach siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego, co powoduje bardzo znaczne zwiększenie ich kontrastu (ryc. 3). Komórki osłonki łącznotkankowej w pewnych warunkach mogą ulec pomnożeniu (Maxwell, Pease 1956). Przestrzeń pozakomórkowa wokół komórek tkanki łącznej bywa nierównej szerokości. Czasem jest ona węższa od strony błony podstawnej włośniczki, czasem od strony komórki nabłonka. W jej poszerzeniach spostrzega się mikrofibryle kolagenowe o nieuporządkowanym przebiegu i włókna nerwowe pozba-

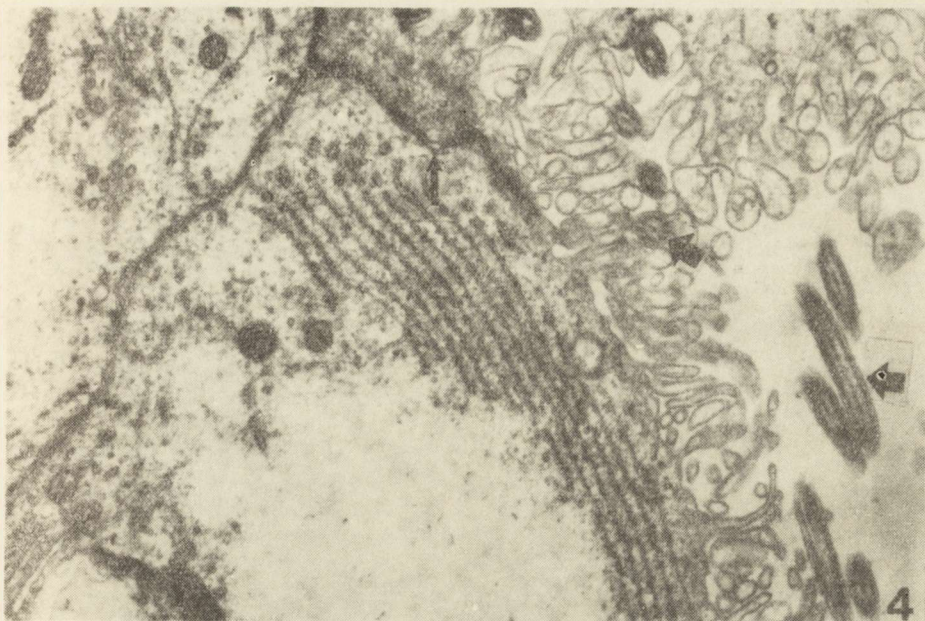


Ryc. 3. Noworodek króliczy. Dwie włóscizki i przyległe komórki splotu. Produkt reakcji peroksydazy chrzanowej (znacznik) podkreśla zarysy ścian bocznych komórek splotu. Wypełnił on szczeliny międzykomórkowe, zatrzymany przez złącze ściśle szczytowe (strzałki). Widoczny falisty zarys powierzchni podstawnej i pofałdowanie części dolnej powierzchni bocznej komórek (!). Pomiedzy włóscizkami a nabłonkiem splotu widoczna wypustka zrębowej komórki tkanki łącznej (ct) z wyraźnie zaznaczoną siateczką śródplazmatyczną. Pow. 4500 X

Fig. 3. Newborn rabbit. Two capillaries and adjacent epithelial cells. HRP reaction product fills intracellular clefts and stops at apical tight junction (arrows). The undulated basal and folded basolateral walls (!) of epithelial cells are seen. Between capillaries and endothelium a process of a stromal connective tissue cell (ct) with marked endoplasmic reticulum. X 4500

wione osłonki mielinowej. Obserwacje własne przeprowadzone u noworodka królika przemawiają za tym, że przestrzeń pozakomórkowa wnika pomiędzy komórki nabłonka splotu. Według Tennyson i Pappas (1967) przestrzeń ta wpukła się pomiędzy komórki nabłonka jedynie u ich podstawy. Przy braku osłonki łącznotkankowej, przestrzeń pozakomórkowa może ograniczać się do wąskiego pasemka o mniejszej gęstości elektrowej pomiędzy przylegającymi do siebie błonami podstawnymi śródbłonka i nabłonka. We wszystkich wspomnianych strukturach występują liczne pęcherzyki pinocytarne, zarówno okryte, jak i nieokryte.

Komórki nabłonka splotu, leżące na zrębie łącznotkankowym, mają powierzchnię podstawną, szczytową, czyli wolną, i dwie powierzchnie boczne. Powierzchnię podstawną tworzy błona podstawna. Jej falisty przebieg tworzy wypustki-nóżki (ryc. 2), w kieszonki między nimi wnika przestrzeń pozakomórkowa. Jeszcze bardziej pofałdowana jest część pod-



Ryc. 4. Stary pies. Powierzchnia szczytowa komórek nabłonka splotu pokryta mikrokosmkami. Widoczne podłużne i poprzeczne przekroje rzęsek (grube strzałki) z filamentami centralnymi i obwodowymi. Złącza przerywają ciągłość znacznika w przestrzeni międzykomórkowej (cienka strzałka). W cytoplazmie komórek widoczne rzędy kanalików siateczki śródplazmatycznej, pęcherzyki pinocytarne różnej wielkości i zbiorniki aparatu Golgiego. Pow. 13 500 ×

Fig. 4. Old dog. Microvilli at the apical surface of epithelial cells. Longitudinal and transversal cuts of cilia (thick arrows) containing central and peripheral filaments are seen. The continuity of marker in intracellular cleft is interrupted at junctions (thin arrow). Within the cells cytoplasm multirow endoplasmic reticulum, pinocytotic vesicles of different size and cisterns of Golgi apparatus. × 13 500

stawna powierzchni bocznej komórki (ryc. 3). Pofałdowanie znacznie zwiększa powierzchnię komórki i świadczy o żywej wymianie pomiędzy komórką i przestrzenią pozakomórkową. Torack i Barnett (1964) stwierdzili w pofałdowanych odcinkach błony podstawnej aktywność adenylozotrójfosfatazy, co przemawia za czynnością sekrecyjną splotu i świadczy o aktywnym transporcie kationów poprzez błonę. Pomiedzy przylegającymi komórkami nabłonka splotu stwierdza się liczne złącza, nieraz z wyraźnymi desmozomami (ryc. 4). Zachowanie się podanego znacznika przemawia za tym, że w części dolnej mają one charakter złączy wolnych (*zonulae adherentes*), a złącze szczytowe ma charakter złącza ścisłego (*zonula occuludens*) (ryc. 3 i 4). Potwierdzają to badania wykonane przy zastosowaniu metody „freeze-fracture”. Mølgard i Saunders (1975) stwierdzili w materiale ludzkim wykształcone złącza już w 9 tygodniu rozwoju płodowego. Złącze szczytowe w dojrzałym splocie naczyniówkowym jest komponentem bariery krew—mózg.

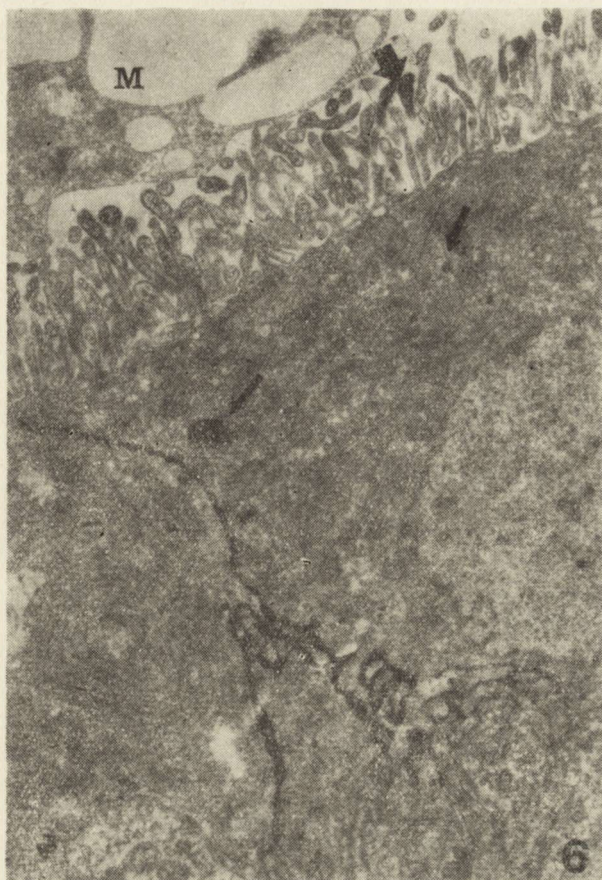
Powierzchnia szczytowa komórki nabłonka zwrócona do światła komory pokryta jest mikrokosmkami. Większość mikrokosmków ma kształt



Ryc. 5. Stary królik. Pojedyncze palczaste i buławkowate mikrokosmki oraz pojedyncza rzęska na powierzchni komórki splotu. Widoczne są filamenty obwodowe.
Pow. 7 500 \times

Fig. 5. Old rabbit. Digital and claviform microvilli and single cilium at the surface of choroid plexus cell. Peripheral filaments are seen. \times 7 500

palczasty, część z nich jest rozdęta buławkowato, obserwuje się również duże bąblowate rozdęcia o gładkiej powierzchni. Są one widoczne przede wszystkim przy stosowaniu metody skaningowej (Scott i wsp. 1974). Wspomniane rozdęcia mogą oddzielać się od komórki tworząc tzw. wolne bąble pływające w płynie mózgowo-rdzeniowym. Zawierają one liczne rybosomy, natomiast mitochondria, lizosomy i siateczka śródplazmatyczna występują w nich bardzo skąpo. Zdaniem Agnew i wsp. (1980) są one wykładnikiem morfologicznym przekazywania substancji białkowych przez komórki śródbłonna do płynu mózgowo-rdzeniowego. Oprócz mikrokosmków z powierzchni szczytowej wpuklają się do światła komory rzęski (ryc. 4, 5 i 10). Występują one kępkami, przeważnie po 3—4. Często w otoczeniu rzęsek brak jest mikrokosmków. Każda rzęska zawiera 9 filamentów obwodowych i 1 lub 2 centralne. Te ostatnie nie sięgają do szczytu rzęski (Millen, Rogers 1956). Na powierzchni szczytowej



Ryc. 6. Noworodek króliczy. Makrofag (M) z licznymi wypustkami na powierzchni splotu. W jego cytoplazmie widoczne mnogie wodniczki i lizosomy. Znacznik wypełniający przestrzeń międzykomórkową zatrzymuje się na złączu szczytowym, uwiadczenia również bogate konwoluty części podstawnej powierzchni bocznej komórki. Jest on także widoczny w pęcherzykach pinocytarnych i ciałach gęstych (cienkie strzałki), a także na powierzchni kosmków (gruba strzałka). Pow. 10 000 X

Fig. 6. Newborn rabbit. A macrophage (M) with numerous extensions is situated at the surface of the choroid plexus. Its endoplasm abounds in vacuoles and lysosomes. The marker filling intracellular cleft is stopped at apical tight junction. Folded basolateral part of epithelial cell is marked. Marker-labeled pinocytotic vesicles and dense bodies are seen (thin arrows). Some of the HRP has penetrated into ventricle lumen and coated microvilli (thick arrow). X 10 000

splotu spotyka się również pojedyncze komórki opony miękkiej. Posiadają one liczne wypustki i lizosomy oraz zapewne spełniają czynności fagocytarne (ryc. 6).

Jądra komórek nabłonka splotu są przeważnie płatkowate. Ich jąderka mają charakterystyczny kształt kłęбка włóczki. Wśród organelli przeważają liczne mitochondria. Ich mnogość jest związana z intensywną przemianą oddechową splotu. Siateczka śródplazmatyczna ziarnista może układać się rzędowo, niekiedy w 12 rzędów, jak obserwowano w ma-



Ryc. 7. Noworodek króliczy. Lipofagosom (lp) w kontakcie ze zbiornikami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (strzałka). Koncentryczny układ zbiorników. Pow. 13 500 \times

Fig. 7. Newborn rabbit. Lipophagosome (lp) in direct contact with granular endoplasmic reticulum cisterns (arrow), their arrangement concentric. \times 13 500

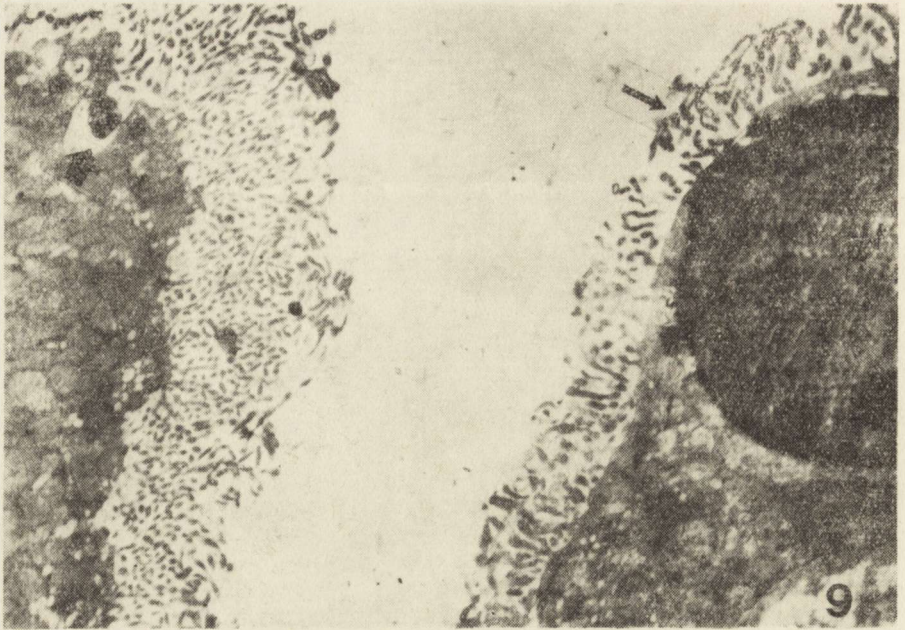
teriale własnym (ryc. 4). Rzędy siateczki miewają również układ koncentryczny (ryc. 7). Prócz układów rzędowych zbiorniki siateczki występują również w sposób rozsiany w cytoplazmie. Aparat Golgiego znajduje się przeważnie na poziomie jądra, lub pomiędzy jądrem i powierzchnią szczytową komórki. Tworzy go układ wodniczek, pęcherzyków i spłaszczonych woreczków. Liczne pęcherzyki pinocytarne obserwuje się przeważnie na obwodzie komórki (ryc. 4 i 8). Skupienie wszystkich organelli na obwodzie występuje przy wypełnieniu komórki płynem — prekursorem płynu mózgowo-rdzeniowego. Dość często spostrzega się przy powierzchni komórki wypuklenia błony cytoplazmatycznej świadczące o tworzeniu się pęcherzyka lub o opróżnieniu jego zawartości poza błonę cytoplazmatyczną. Obecność w bezpośrednim sąsiedztwie aparatu Golgiego licznych drobnych, okrytych pęcherzyków, odpowiadających rozmiarem i wyglądem przekrojowi zbiornika aparatu Golgiego, według niektórych badaczy może świadczyć o produkowaniu ich przez aparat Golgiego dla uzupełnienia ubytków błon w procesie pinocytozy (van Deurs 1976). Większe pęcherzyki natomiast pochodzą z endocytozy. Ciała gęste spotykane w komórkach nabłonka splotu mogą być pierwotnymi lizosomami lub fagocytosomami (ryc. 2) w różnym stadium roz-



Ryc. 8. Stary królik. Duży lipofagosom w komórce splotu. Od strony błony podstawnej przylegają do niego znaczone pęcherzyki pinocytarne (strzałki). Fagosom zawierający koncentryczny twór mielinowy widoczny w świetle komory (grot strzałki). Szczelina międzykomórkowa poszerzona, znacznik zatrzymany na złączach szczytowych. Pow. 6 000 \times

Fig. 8. Old rabbit. Next to the large lipophagosome HRP-labeled pinocytotic vesicles (arrows) are adjoined. Another phagosome containing a concentric myelin structure is seen in the ventricle lumen (arrow head). Intracellular cleft is enlarged. Marker stopped at apical junction. \times 6 000

woju, najczęściej lipofagosomami (Majdecki, Borowicz 1970). Autor obserwował często styczność lipofagosomu ze zbiornikami siateczki śródplazmatycznej (ryc. 7), jak i znaczoymi pęcherzykami pinocytarnymi (ryc. 8). Lipofagosomy mogą być wydalone z komórki do światła komory drogą egzocytozy (ryc. 9). W komórkach splotu naczyniówkowego, podobnie jak i w innych komórkach nabłonka rzęskowego, przyjmuje się możliwość makropinocytozy, czyli powstawania wielkich pęcherzyków pinocytarnych na drodze wgłębiania się błony brzeżnej zawartej między mikrokosmkami. Taki wielki pęcherzyk nosi nazwę wodniczki śródplazmatycznej. Ma on być środkiem „szybkiego transportu” ale tylko w kierunku z płynu mózgowo-rdzeniowego do krwi. Dzięki podwójnemu obłonienu są one odporne na działanie enzymów lizosomalnych, a zatem nie ulegają heterofagii i nie mogą być przyswajane przez komórkę (Bright-



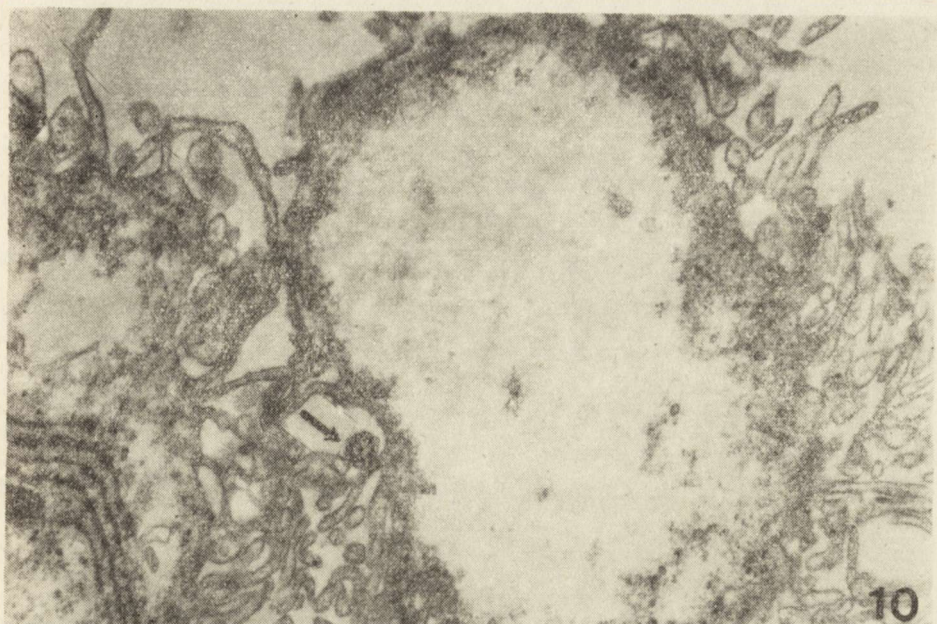
Ryc. 9. Stary królik. Fazy wydalania lipofagosomu do światła komory. Duży znaczony lipofagosom w pobliżu błony brzeżnej komórki splotu. Znacznik na powierzchni mikrokosmków (strzałka). Lipofagosom wydalonny do światła komory mózgu (!). Pow. 8 000 \times

Fig. 9. Old rabbit. Phases of dischargement of lipophagosome into the cerebral ventricle. Large labeled lipophagosome next to ventricular membrane of epithelial cell. Distinct HRP labeling of the microvilli surface (arrow). Another lipophagosome (!) translocated into the cerebral ventricle lumen. $\times 8000$

man 1967). Oprócz komórek jasnych z obfitą cytoplazmą (ryc. 10) występują tzw. komórki ciemne lub gęste. Są one obkurczone, zawierają zbite ciasno organelle. Ich mikrokosmki posiadają zwiększoną gęstość (ryc. 11), lub też na przekrojach tworzą koncentryczne układy błon (ryc. 12). Niekiedy obserwuje się oddzielanie komórek gęstych od nabłonka splotu. Zapewne zachodzi tu zjawisko złuszczenia się i odnowy komórek nabłonka.

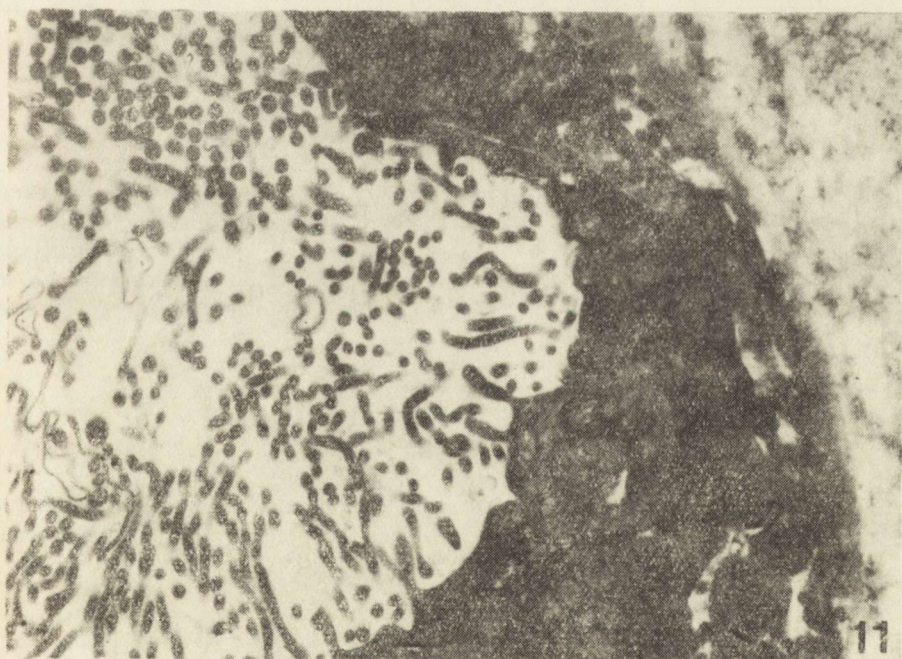
Złożona struktura splotu odpowiada jego czynności sekrecyjnej i dwukierunkowej wymiany, tj. z krwi do płynu mózgowo-rdzeniowego i z płynu mózgowo-rdzeniowego do krwi (Brightman 1967; van Deurs 1976). Istnieją również dowody, że w splocie dokonuje się synteza białka sekrecyjnego (Kałuża i wsp. 1964; Agnew i wsp. 1980), dzięki temu do płynu mózgowo-rdzeniowego przechodzą nie tylko białka osocza krwi, ale również elementy neurohormonalne produkowane przez komórki splotu (Nathanson 1979).

Autor wyraża nadzieję, że powyższe opracowanie okaże się pomocne dla tych, którzy zajmą się tą złożoną morfologicznie i czynnościowo strukturą.



Ryc. 10. Noworodek królika. Komórka jasna nabłonka splotu. Wypełnia ją prekursor płynu mózgowo-rdzeniowego. Struktury wewnątrzkomórkowe zepchnięte na obwód. Transversial cut of a cilium is seen (arrow). $\times 13\ 500$

Fig. 10. Newborn rabbit. Light cell of choroid plexus epithelium filled with precursor of cerebro-spinal fluid. Microorganelles pushed away to the cell periphery. Transversial cut of a cilium is seen (arrow). $\times 13\ 500$



Ryc. 11. Stary pies. Komórki ciemne splotu. Brak pofałdowania ściany charakterystycznego dla komórek metabolicznie czynnych. Pow. $14\ 000 \times$

Fig. 11. Old dog. Dark cells of choroid plexus epithelium. Loss of wall foldings, characteristic of metabolically active cells. $\times 14\ 000$



Ryc. 12. Stary kot. Koncentryczny układ błon w mikrokosmkach komórki ciemnej przypomina układ zbiorników siateczki śródplazmatycznej na *ryc. 7.* Pow. 13 500 ×
Fig. 12. Old cat. Concentric arrangement of membranes in microvilli of dark cell resembling analogous pattern of granular endoplasmic reticulum cisterns in *Fig. 7* × 13 500

УЛЬТРАСТРУКТУРА СОСУДИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ

Резюме

Отсутствие польской разработки ультраструктуры сосудистого сплетения наклонило автора, чтобы написать эту статью. Кроме обстоятельного представления морфологии, автор приводит также современные данные касающиеся синтезирующего белок и секреторного действия сосудистого сплетения, а также обмена в двойном направлении, это значит — из крови в спинномозговую жидкость и из спинномозговой жидкости в кровь.

ULTRASTRUCTURE OF CHOROID PLEXUS

Summary

Lack of comprehensive review of choroid plexus ultrastructure in Polish induced the author to write this paper. Apart from the precise morphology also data on present knowledge concerning choroid plexus function are presented.

PIŚMIENNICTWO

1. Agnew F. W., Alvarez R. B., Yuen T. G. H., Crews A. K.: Protein synthesis and transport by the rat choroid plexus and ependyma. *Cell Tissue Res.*, 1980, 208, 261—281.

2. Brightman M. W.: The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Prog. Brain Res.*, 1967, 29, 19—40.
3. van Deurs B.: Choroid plexus absorption of horseradish peroxidase from cerebral ventricles. *J. Ultrastruct. Res.*, 1976, 55, 400—416.
4. Kałuża J. S., Burstone M. S., Klatzo I.: Enzyme histochemistry of the chick choroid plexus. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1964, 3, 480—489.
5. Majdecki T., Borowicz J. W.: Ultrastruktura ciał lizosopodobnych splotu naczyniówkowego królika. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 299—304.
6. Maxwell D., Pease D. C.: The electron microscopy of the choroid plexus. *J. Biophysic Biochem. Cytol.*, 1956, 2, 476—484.
7. Millen J. W., Rogers G. E.: An electron microscopic study of the choroid plexus in the rabbit. *J. Biophysic. Biochem. Cytol.*, 1956, 2, 407—416.
8. Møllgard K., Saunders N. R.: Complex tight junctions of epithelial and of endothelial cells in early foetal brain. *J. Neurocytol.*, 1975, 4, 453—468.
9. Nathanson J. A.: Beta-adrenergic-sensitive adenylate cyclase in secretory cells of choroid plexus. *Science*, 1979, 204, 843—844.
10. Scott D. E., Van Dyke D. H., Paull W. K., Kozłowski S. P.: Ultrastructural analysis of the human cerebral ventricular system. III. The choroid plexus. *Cell. Tissue Res.*, 1974, 150, 389—397.
11. Tennyson V. M., Pappas D. G. D.: The fine structure of the choroid plexus: adult and developmental stages. *Prog. Brain Res.*, 1967, 29, 63—85.
12. Torack R. L., Barrnett R. J.: The fine structural localization of nucleoside phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1964, 23, 46—59.

Adres autora: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

TOMASZ BORKOWSKI, IRMINA B. ZELMAN, BARBARA BICZ

AMINOACYLACJA tRNA W MÓZGU KRÓLIKA pt I. AKTYWNOŚĆ AMINOACYLO-tRNA SYNTETAZ

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Lublin, Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki

Królik pt jest polskim modelem doświadczalnym genetycznie uwarunkowanej choroby układu nerwowego rozwijającej się na podłożu nieprawidłowej mielinogenezy. U mutantu pt mielinizacja istoty białej ośrodkowego układu nerwowego jest opóźniona, przedłużona i niepełna (Zelman, Taraszewska 1984). Zaburzeniom mielinogenezy towarzyszą rozsiane uszkodzenia neuronów, występujące w zróżnicowanym nasileniu w poszczególnych strukturach OUN (Taraszewska, Zelman 1981). Zmianom morfologicznym u mutantu pt towarzyszy obniżenie zawartości specyficznych lipidów mieliny (Domańska-Janik i wsp. 1985) najbardziej nasilone u królików w wieku 6—8 tygodni. Dotychczas stosunkowo mało uwagi poświęcono przemianie białkowej w mózgu królika pt, podjęto zatem badania nad jednym z ogniw biosyntezy białka związanym z procesem aminoacylacji tRNA w tkance mózgowej.

Jak to zostało udowodnione w badaniach na tkankach eukariotów, aminoacylo-tRNA syntetazy występują w formie wysokomolekularnych kompleksów (Dang i wsp. 1982). Kompleksy te, obok form niskomolekularnych, wykazano również w tkance ośrodkowego układu nerwowego (Chareźniński, Borkowski 1981).

W pierwszym etapie określono aktywność kilku aminoacylo-tRNA syntetaz w cytozolu trzech różnych obszarów anatomicznych ośrodkowego układu nerwowego u królika pt i królików zdrowych. Następnie poddano ocenie zawartość nisko- i wysokomolekularnych form tych enzymów w cytozolu badanych zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na królikach pt, 2-miesięcznych samcach i samicach z zespołem objawowym typowym dla ostrego okresu choroby (Osetowska i wsp. 1975). Grupę kontrolną stanowiły króliki rasy miesza-

nej w wieku 2 miesięcy. Zwierzęta uśmiercano przez dekapitację, a wydobyte mózgi oczyszczano z naczyńiówki i dzielono na trzy anatomicznie zróżnicowane obszary: półkule mózgowe, pień mózgu i mózdzek. Z tkanki wymienionych struktur otrzymywano cytozol, w którym oznaczano aktywność aminoacylo-tRNA ligaz przy użyciu różnych znakowanych ^{14}C -aminokwasów.

Otrzymywanie cytozolu. Z tkanki badanego obszaru mózgu przygotowywano homogenat w buforze o następującym składzie: 0,05 M Tris-HCl (pH 7,4), 0,025 M KCl, 0,008 M MgCl_2 , 0,001 M EDTA i glicerol do stężenia 2 g/100 ml. Równocześnie dodawano inhibitor proteaz — dwuizopropylodifluoroferan (DFP) w alkoholu izopropylowym, w ilości 3,5 ml/100 ml buforu (Kellermann i wsp. 1978). Tkanke homogenizowano w porcji wagowej 1:1,5. Homogenat po 30-minutowym wirowaniu przy 10 000 g i odrzuceniu osadu, ponownie wirowano przy 105 000 g w ciągu 90 minut. Uzyskany supernatant traktowano jako cytozol, który służył do badań.

Otrzymywanie i oczyszczanie tRNA. Preparaty tRNA otrzymywano z mózgow kurzych, świeżo wypreparowanych w trakcie uboju drobiu, w oparciu o metodę Seina i wsp. (1969) w modyfikacji podanej przez Charezińskiego i Borkowskiego (1981).

Ilościowe oznaczanie białka. Zawartość białka w cytozolu oznaczono metodą Lowry i wsp. (1951).

Oznaczanie aktywności aminoacylo-tRNA syntetaz. Aktywność enzymatyczną cytozolu oznaczano przez pomiar radioaktywności związanego z tRNA odpowiedniego ^{14}C -aminokwasu (Chareziński, Borkowski 1981).

Wirowanie w gradiencie glicerolu. Dla wykazania obecności wysokomolekularnych kompleksów aminoacylo-tRNA syntetaz w cytozolu, stosowano technikę Denneya (1977), przy czym najwyższe stężenie glicerolu w gradiencie skokowym wynosiło 40%. Aby uzyskać informację o lokalizacji poszczególnych molekuł w różnych gęstościach glicerolu, przeprowadzono wstępną kalibrację układu polegającą na rozdziale tRNA oraz podjednostek rRNA w czasie 16-godzinnego wirowania przy 105 000 g. Wirowanie przeprowadzano w ultrawirówce MSE-Prepspin, w rotorze swingowym używając probówek polietylenowych o objętości 15,0 ml. Po zakończeniu wirowania nakłuwano dno probówek i zbierano 10-kropłowe frakcje, w których oznaczano absorpcję przy 260 i 280 nm lub przeprowadzano oznaczenia aktywności enzymatycznej.

WYNIKI

W celu porównania aktywności aminoacylo-tRNA syntetaz w mózgu królika pt i królika zdrowego przeprowadzono inkubację tRNA z radioaktywnymi aminokwasami wobec cytozolu otrzymywanego z trzech anatomicznie zróżnicowanych obszarów układu nerwowego. Wyniki zesta-

Tabela 1. Aktywność aminoacylo-tRNA syntetaz w mózgu królika pt i królika zdrowego (impulsy $\times 10^3$ /min/mg białka cytozolowego)

Table 1. Activity of aminoacyl-tRNA synthetases in brain of pt and healthy rabbits (impulses $\times 10^3$ /min/mg of cytosol protein)

Obszar mózgu Brain area	Królik Rabbit	Syntetaza Synthetase			
		asparaginowa asparginic	glicynowa glycyl	glutaminowa glutamic	lizynowa lysyl
półkule mózgu cerebral hemispheres	pt	0,87	3,07	2,84	8,92
	zdrowy healthy	1,06	1,39	5,25	12,74
pień mózgu brain stem	pt	3,04	7,16	6,19	18,20
	zdrowy healthy	0,74	4,80	4,26	12,67
móżdżek cerebellum	pt	2,19	5,99	6,53	14,20
	zdrowy healthy	3,78	5,16	6,53	15,18

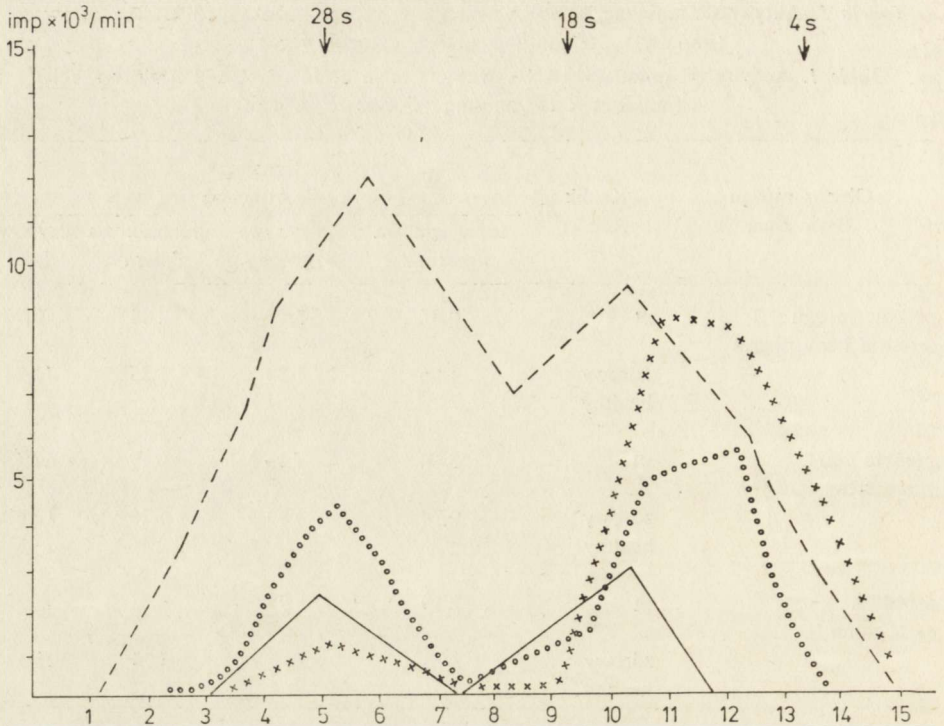
wione w tabeli 1 stanowią dane uzyskane z 5 doświadczeń przeprowadzonych na 10 królikach pt oraz 5 królikach zdrowych.

Niezależnie od rodzaju badanego królika, jak i od obszaru mózgu, z którego otrzymano cytozol, najwyższą aktywność wykazano po inkubacji z radioaktywną lizyną (do kilkunastu tysięcy impulsów/min/mg białka cytozolowego), najniższą zaś w przypadku radioaktywnego kwasu asparaginowego (do 3 tys. imp/min/mg białka). Po inkubacji cytozolu z ^{14}C -glicyną lub ^{14}C -kwasem glutaminowym, wartości kształtowały się w granicach 3—7 tys. imp/min/mg białka cytozolowego.

Porównując aminoacylo-tRNA syntetazy w poszczególnych obszarach mózgu królika pt można ogólnie stwierdzić, że najniższa aktywność występuje w półkulach mózgowych, a stosunkowo najwyższa w pniu mózgowym. Natomiast u królika zdrowego stwierdza się najwyższą aktywność w móżdżku.

Następne doświadczenia dotyczyły występowania aminoacylo-tRNA syntetaz pod postacią kompleksów o różnym ciężarze cząsteczkowym. Zastosowano wirowanie w gradiencie glicerolu białek cytozolu otrzymanego z półkul mózgowych królików pt, a następnie przeprowadzono pomiar radioaktywności poszczególnych frakcji po inkubacji z czterema badanymi ^{14}C -aminokwasami.

Jak wynika z danych przedstawionych na rycinie 1, syntetazy asparaginianowa, glutaminianowa oraz lizylowa występują w cytozolu w



Ryc. 1. Rozkład aktywności 4 aminoacylo-tRNA syntetaz w cytozolu półkul mózgowych królika pt, po wirowaniu w gradiencie glicerolu ○○○○ — aa-tRNA syntetaza asparaginowa, ---- — aa-tRNA syntetaza lizynowa, ——— — aa-tRNA syntetaza glutaminowa, x x x x — aa-tRNA syntetaza glicynowa. Na osi rzędnej wyznaczono aktywność aminokwasu związanego z tRNA po inkubacji z 100 μl próbki pobranej z poszczególnych frakcji gradientu. Na osi odciętych wyznaczono w ml objętość gradientu począwszy od dna próbówki

Fig. 1. Distribution of activity of four aminoacyl-tRNA synthetases in cytosol of cerebral hemispheres of pt rabbit, after centrifugation in gradient of glycerol. ○○○○ — aa-tRNA Asp, ---- — aa-tRNA Lys, ——— — aa-tRNA Glu, x x x x — aa-tRNA Gly. Ordinate axis — activity of amino acid bound with tRNA after incubation in the presence of 100 μl sample taken from consecutive fractions of the gradient. Abscissa — volume of gradient beginning from the bottom of the tube

dwóch formach, a mianowicie wysoko- i niskomolekularnej, natomiast syntetaza glicynowa prawie wyłącznie w postaci niskomolekularnej.

W celu uzyskania orientacyjnych danych z rozmieszczenia aktywności badanych syntetaz we frakcji ciężkiej (H) i lekkiej (L) cytozolu połączono poszczególne frakcje z gradientu odpowiadające frakcji ciężkiej i oddzielnie odpowiadające frakcji lekkiej. Następnie przeprowadzono w nich ilościowe oznaczenie białka oraz pomiar radioaktywności. Wyniki przedstawia tabela 2.

Otrzymane dane wskazują, że 47—54% aktywności całkowitej dla trzech badanych syntetaz występuje we frakcji ciężkiej cytozolu i odpowiednio 46—53% we frakcji lekkiej. Wyjątek stanowi syntetaza glicynowa, której 89% aktywności przypada na frakcję lekką. Na uwagę za-

Tabela 2. Rozmieszczenie aktywności aminoacylo-tRNA syntetaz we frakcji ciężkiej (H) i lekkiej (L) cytozolu półkul mózgowych królika pt

Table 2. Activities of aminoacyl-tRNA synthetases in heavy (H) and light (L) fractions of cytosol from cerebral hemispheres of pt rabbit

aa-tRNA syntetaza aa-tRNA synthetase	Frakcja H Fraction H		Frakcja L Fraction L		Rozmieszczenie w % Distribution in %	
	aktywność całkowita total activity imp/min	aktywność activity imp/min/mg białka imp/min/mg protein	aktywność całkowita total activity imp/min	aktywność activity imp/min/mg białka imp/min/mg protein	frakcja fraction H	frakcja fraction L
asparaginowa asparginic	3369	2246	3591	718	48,4	51,6
glicynowa glycyl	2702	1801	21858	4372	11,0	89,0
glutaminowa glutamic	10678	7119	12042	2408	47,0	53,0
lizynowa lysyl	38606	25737	32754	6551	54,1	45,9

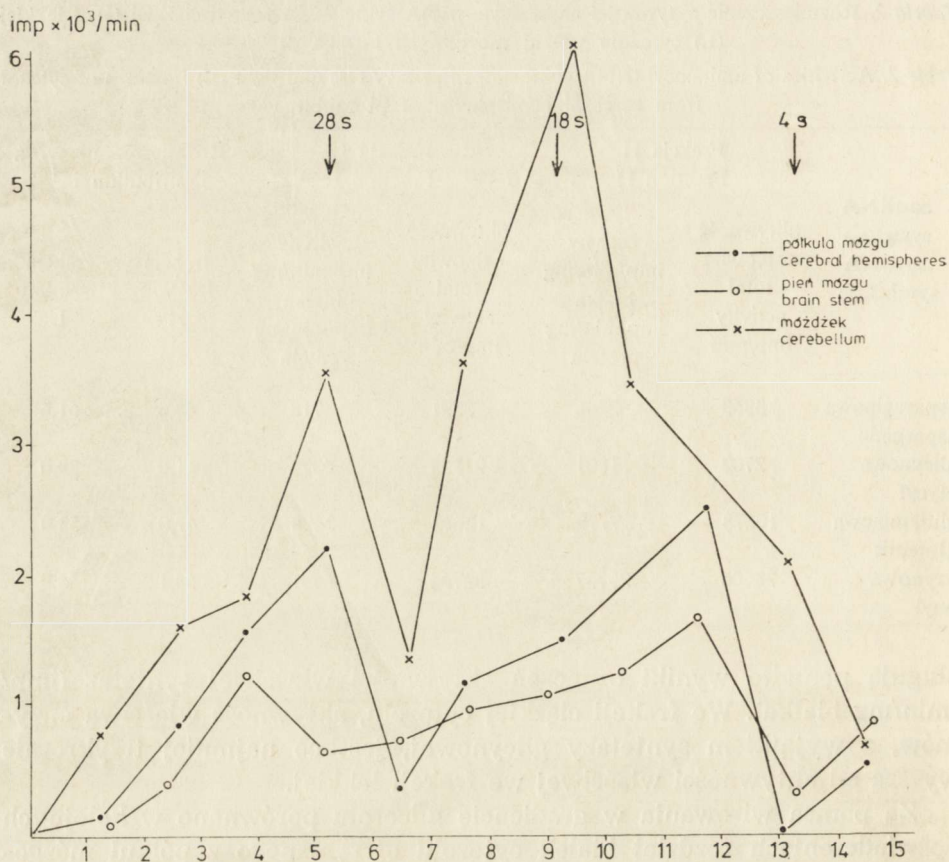
sługują ponadto wyniki oznaczeń aktywności właściwej syntetaz (imp/min/mg białka). We frakcji ciężkiej cytozolu, aktywność właściwa enzymów, z wyjątkiem syntetazy glicynowej, jest co najmniej trzykrotnie wyższa od aktywności właściwej we frakcji lekkiej.

Za pomocą wirowania w gradiencie glicerolu porównano w kolejnych doświadczeniach rozdział białek cytozolu otrzymanego z półkul mózgowych, pnia mózgu oraz mózdzku królika pt i królika zdrowego. Radioaktywność poszczególnych frakcji oznaczano po inkubacji z ^{14}C -kwasem asparaginowym (ryc. 2,3) oraz oddzielnie z ^{14}C -lizyną (ryc. 4,5).

Jak wynika z przedstawionych wykresów, obie badane aminoacylo-tRNA syntetazy występują w cytozolu trzech obszarów anatomicznych mózgu w formie wysoko- i niskomolekularnej, przy czym rozdział aktywności nie jest jednakowy. W przypadku doświadczeń z radioaktywnym kwasem asparaginowym najwyższą aktywność skupiała frakcja ciężka cytozolu otrzymanego z pnia mózgowego królika pt, natomiast u królika zdrowego frakcja lekka cytozolu mózdzku. Po inkubacji z radioaktywną lizyną dominowała u królika pt frakcja ciężka cytozolu pnia mózgowego, u królika zaś zdrowego frakcja ciężka cytozolu uzyskanego z mózdzku.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Jak można było się spodziewać, aktywność 4 badanych aminoacylo-tRNA syntetaz w cytozolu tkanki ośrodkowego układu nerwowego jest różnicowana i zależy między innymi od obszaru anatomicznego mózgu.

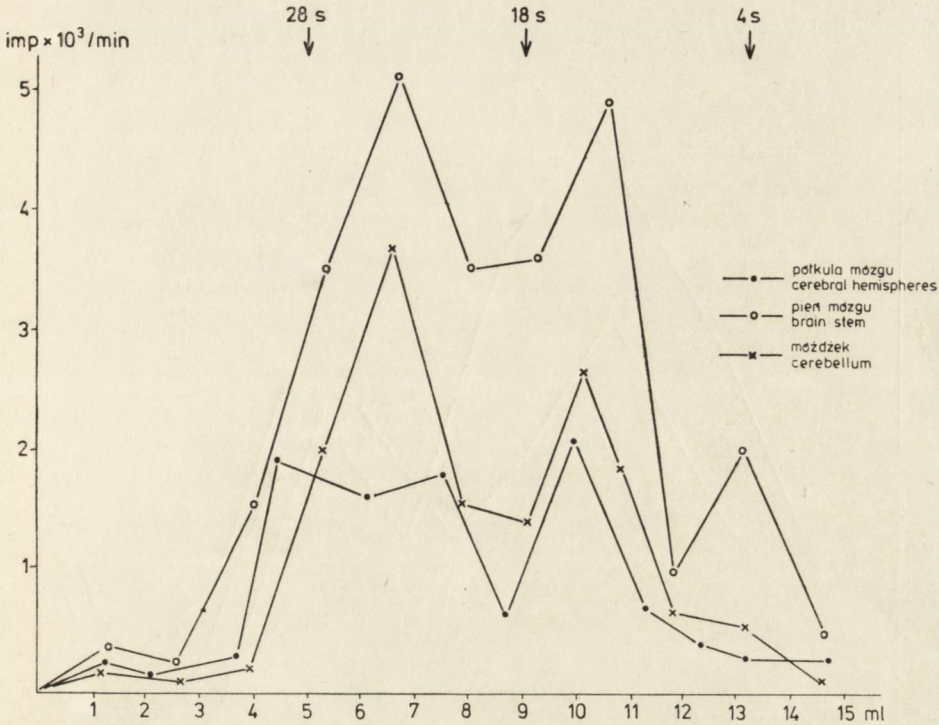


Ryc. 2. Rozkład aktywności aminoacylo-tRNA syntetazy asparaginowej w cytozolu trzech obszarów anatomicznych mózgu królika zdrowego po wirowaniu w gradientie glicerolu. Oznakowanie osi rzędnych i odciętych jak na ryc. 1

Fig. 2. Distribution of activity of aa-tRNA synthetase Asp in cytosol of three anatomical structures of healthy rabbit brain, after centrifugation in gradient of glycerol. Denotation on ordinate axis and abscissa as in Fig. 1

Najwyższe aktywności tych enzymów stwierdzano w mózdzku królika zdrowego, a najniższe w półkulach mózgowych. Jest to niewątpliwie związane z różną strukturą morfologiczną tych obszarów. Porównując wyniki aktywności tych enzymów uzyskane dla cytozolu preparatów ośrodkowego układu nerwowego królików pt z wynikami uzyskanymi u królików kontrolnych, zauważa się istotny wzrost aktywności wszystkich badanych syntetaz w pniu mózgowym królika pt. W pozostałych obszarach anatomicznych mózgu różnice te nie były jednoznaczne. Na tym etapie badań ten wzrost aktywności syntetaz w pniu mózgowym królika pt trudny jest do interpretacji.

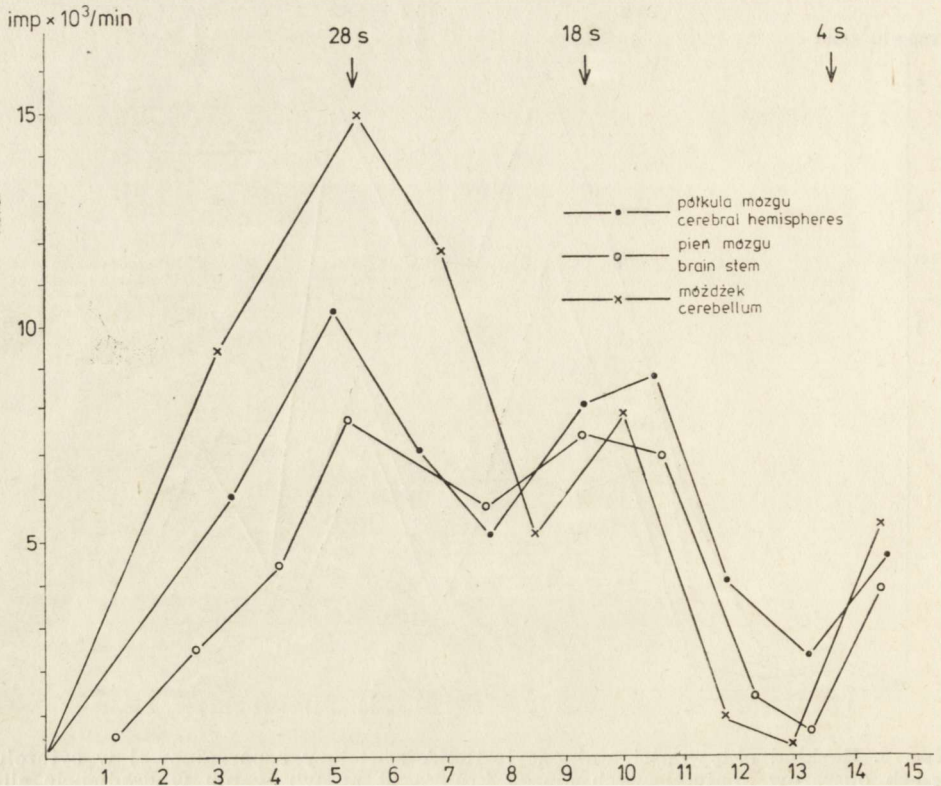
Z licznych publikacji znanym jest fakt występowania aminoacylo-tRNA syntetaz w formie wysokomolekularnych kompleksów. Zbiornicą



Ryc. 3. Rozkład aktywności aminoacylo-tRNA syntetazy asparaginowej w cytozolu trzech obszarów anatomicznych mózgu królika pt po wirowaniu w gradiencie glicerolu. Oznakowanie osi rzędnych i odciętych jak na ryc. 1

Fig. 3. Distribution of activity of aa-tRNA synthetase Asp in cytosol of three anatomical structures of pt rabbit brain, after centrifugation in gradient of glycerol. Denotation on ordinate axis and abscissa as in Fig. 1

informację na ten temat opublikował Dang i wsp. (1982). Istnieją uzasadnione sugestie, że masa cząsteczkowa i skład enzymatyczny tych kompleksów są specyficzne gatunkowo (Kellerman i wsp. 1982), a być może i tkankowo. W obecnej pracy zastosowaliśmy jednostopniową procedurę rozdzielania nisko- i wysokomolekularnych form aminoacylo-tRNA syntetaz z cytozolu tkanki mózgowej. Spośród 4 badanych syntetaz wszystkie one występują w postaci nisko- i wysokomolekularnej. Jednakże rozmieszczenie aktywności w obu formach nie było jednakowe dla poszczególnych enzymów. Charakterystyczna jest śladowa aktywność syntetazy glicynowej we frakcji wysokomolekularnej. Uzyskane wyniki w zastosowanej przez nas metodzie są zgodne z wynikami innych autorów (Kellerman i wsp. 1982), którzy w siedmioenzymatycznym wielko-cząsteczkowym kompleksie wykazywali obecność między innymi syntetazy lizylowej, glutaminowej i asparaginowej. W naszych badaniach syntetaza lizynowa rozdzielała się nie dość ostro na frakcje nisko- i wysokomolekularne. Ostatnio Curakoglu i Waller (1985) stwierdzili, że en-



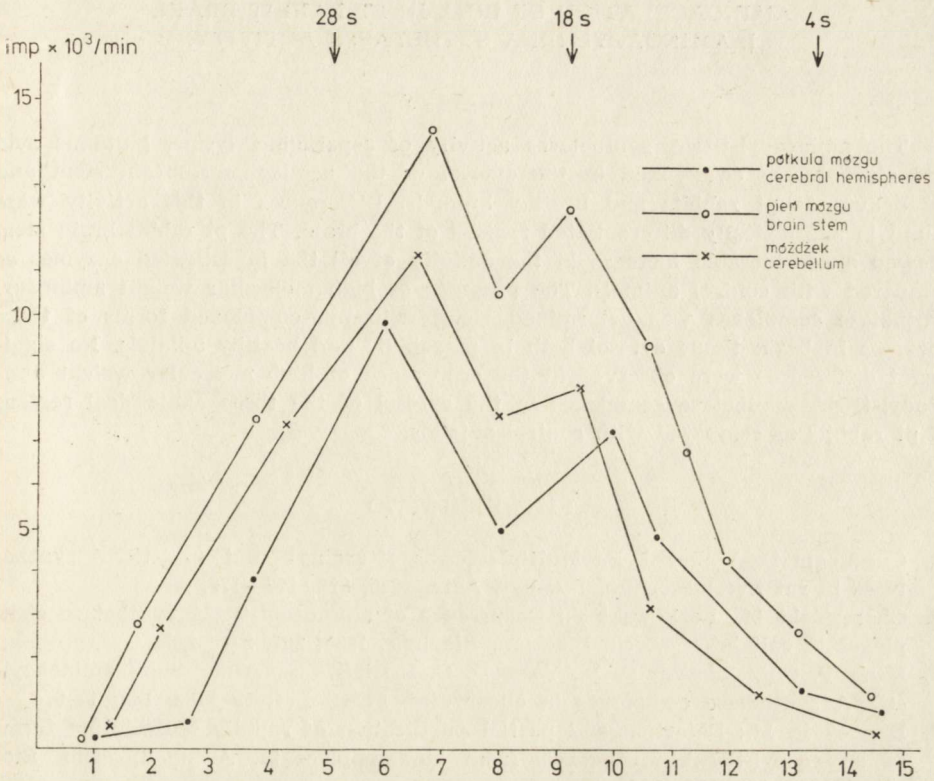
Ryc. 4. Rozkład aktywności aminoacylo-tRNA syntetazy lizynowej w cytozolu trzech anatomicznie zróżnicowanych obszarów mózgu królika zdrowego po wirowaniu w gradiencie glicerolu. Oznakowanie osi rzędnych i odciętych jak na ryc. 1

Fig. 4. Distribution of activity of aa-tRNA synthetase Lys in cytosol of three anatomically differentiated areas of healthy rabbit brain, after centrifugation in gradient of glycerol. Denotation on ordinate axis and abscissa as in Fig. 1

zym ten w wątrobie szczura występuje wyłącznie w formie wysokomolekularnego kompleksu. Być może, w warunkach wirowania cytozolu w gradiencie glicerolu syntetaza lizynowa podlega częściowemu oddysocjowaniu od wielkocząsteczkowego kompleksu.

Analizując rozdział na frakcję ciężką i lekką syntetazy lizynowej i asparaginowej w cytozolu trzech obszarów anatomicznych mózgu królików pt nie stwierdzono znamiennych różnic w porównaniu z królikami kontrolnymi. Dla cytozolu pnia mózgowego zaznacza się przesunięcie w kierunku frakcji ciężkich u królika pt. Te niewielkie różnice mogą być spowodowane samym postępowaniem preparacyjnym i trudno z tych obserwacji wyciągać daleko idące wnioski.

Reasumując, podwyższonej aktywności badanych aminoacylo-tRNA syntetaz w cytozolu pnia mózgowego królików pt nie towarzyszą znamienne różnice w zawartości nisko- i wysokomolekularnych form tych enzymów.



Ryc. 5. Rozkład aktywności aminoacylo-tRNA syntetazy lizynowej w cytozolu trzech anatomicznie zróżnicowanych obszarów mózgu królika pt po wirowaniu w gradientie glicerolu. Oznakowanie osi rzędnych i odciętych jak na ryc. 1

Fig. 5. Distribution of activity of aa-tRNA synthetase Lys in cytosol of three anatomically differentiated areas of pt rabbit brain, after centrifugation in gradient of glycerol. Denotation of ordinate axis and abscissa as in Fig. 1

АМИНОАЦИЛЯЦИЯ тРНК В МОЗГЕ КРОЛИКА ПТ I. АКТИВНОСТЬ СИНТЕТАЗ АМИНОАЦИЛО-тРНК

Резюме

Были проведены исследования активности синтетаз аминокислот-тРНК: аспарагиновой, лизинозой, глутаминовой и глициновой в цитозоле полушарий головного мозга, ствола и мозжечка кроликов пт и здоровых кроликов. Оказалось, что существует разница в этой активности в разных областях мозга.

В мозговом стволе кроликов пт наблюдалось отчетливое повышение активности всех исследованных ферментов по сравнению с контрольными кроликами. Был найден высокомолекулярный комплекс синтетаз аминокислот тРНК и некомплексированные формы этих ферментов в цитозоле мозговой ткани как кроликов пт так и здоровых кроликов. Не было значительной разницы между высокомолекулярными комплексами синтетаз аминокислот тРНК в цитозоле трех анатомических областей мозга кроликов пт по сравнению с контрольными кроликами.

AMINOACYLATION OF tRNA IN PT RABBIT BRAIN.
I. AMINOACYL-tRNA SYNTHETASES ACTIVITY.

Summary

The aminoacyl-tRNA synthetases activity of asparagine, lysine, glutamic acid and glycine was determined in the cytosol of the hemispheres, brain stem and cerebellum in pt rabbits and healthy animals. Differences in this activity were found in anatomically differentiated regions of the brain. The pt rabbit brain stem showed a considerable increase in the activity of all the investigated enzymes as compared with control animals. The presence of high molecular weight aminoacyl synthetase complexes was determined along with non-complexed forms of these enzymes in brain tissue cytosol both in pt rabbits and healthy animals. No significant differences were observed in the occurrence of high molecular weight aminoacyl-tRNA synthetase complexes in the cytosol of the three anatomical regions of pt rabbits as compared with control animals.

PIŚMIENICTWO

1. Curakoglu B., Waller J. P.: Multiple forms of arginyl- and lysyl-tRNA synthetases in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 829, 173—179.
2. Chareźniński M., Borkowski T.: Occurrence of aminoacyl-tRNA synthetase complexes in calf brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, 207, 241—247.
3. Dang V. Chi, Johnson D. L., Yang D. C. H.: High molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complexes in eucaryotes. *FEBS Letters* 1982, 142, 1—6.
4. Denney R. M.: Detection and partial purification of rapidly sedimenting forms of aminoacyl-tRNA synthetases from human placenta. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1977, 183, 156—167.
5. Domańska-Janik K., Wikieł A., Zelman I., Strosznajder J.: Brain lipids of myelin deficient rabbit mutant during development. *Dev. Brain Res.*, 1985 (in press).
6. Kellermann O., Tonetti N., Brevet A., Mirande M., Pailies J. P., Waller J. P.: Macromolecular complexes from sheep and rabbit containing seven aminoacyl-tRNA synthetases. I. Species specificity of the polypeptide composition. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 11041—11048.
7. Kellermann O., Viel C., Waller J. P.: Methionyl-tRNA synthetases from sheep mammary gland. Purification of fully active monomeric derived from high-molecular-weight complexes by controlled proteolysis. *Eur. J. Biochem.*, 1978, 88, 197—204.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
9. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 71—85.
10. Sein K. T., Bacarevic A., Kanasir D.: A simple modified method for the extraction of rat liver sRNA. *Annal. Biochem.*, 1969, 28, 65—69.
11. 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.
12. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mieliny w mózgu królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205—218.

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

DANUTA JESIONEK, BOLESŁAW FLORIAŃCZYK,
DARIUSZ SAWA, IRENA BORKOWSKA

AMINOACYLACJA tRNA W MÓZGU KRÓLIKA pt
II. POZIOM AMINOACYLO-tRNA W MÓZGU KRÓLIKA *IN VIVO*

Katedra i Zakład Chemii Fizjologicznej AM, Lublin

Uwarunkowane genetycznie zaburzenie czynności ośrodkowego układu nerwowego u królika pt (Osetowska i wsp. 1975) jest niewątpliwie związane z utrwaloną zmianą informacji zawartej w mózgowym DNA. Zaburzenia tej informacji mogą znaleźć wyraz w subtelnym zmianach mechanizmu biosyntezy białka. Istotą translacji jest precyzyjnie przebiegający proces aminoacylacji-tRNA. Uzależnione to jest zarówno od aktywności aminoacylo-tRNA syntetaz, jak też ilości specyficznych dla każdego aminokwasu cząsteczek tRNA. Intensywność aminoacylacji wyrażona stopniem powstawania aminoacylo-tRNA *in vivo* może być wskaźnikiem regulacji procesów metabolizmu białkowego (Allen i wsp. 1969).

W niniejszej pracy podjęto badania nad określeniem ilości aminoacylowanych *in vivo* cząsteczek tRNA w mózgu królika pt. Porównawczo badania te przeprowadzono również na królikach zdrowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na królikach pt, w wieku od 6 do 8 tygodni. Grupę kontrolną stanowiły zdrowe 8-tygodniowe króliki. Zwierzęta zabijano przez dekapitację. Do doświadczeń używano bądź całych mózgów, bądź też półkul mózgowych oraz oddzielnie pnia mózgowego wraz z mózdzkiem.

Stosując metodę Johnson i Chou (1973), preparowano z izolowanych tkanek aminoacylo-tRNA, a z frakcji postmikrosomalnej syntetazę aminoacylo-tRNA. Proces oczyszczania preparatów tRNA oraz ich utleniania nadjodanem przeprowadzano według schematu opisanego przez Suchożebrską-Jesionek i wsp. (1984).

Zawartość tRNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości 260 nm, białko zaś enzymatycznie metodą kolorymetryczną (Lowry i wsp. 1951).

Do procesu aminoacylacji *in vitro* stosowano aminokwasy znakowane ^{14}C produkcji UVVVR (Czechosłowacja) o następujących aktywnościach właściwych: L- ^{14}C -alanina 4,44 GBq/mmol, L- ^{14}C -fenyloalanina 13,32 GBq/mmol, L- ^{14}C -walina 7,40 GBq/mmol, L- ^{14}C -lizyna 8,88 GBq/mmol i L- ^{14}C -kwas glutaminowy 7,36 GBq/mmol.

Reakcję aminoacylacji przeprowadzano w medium inkubacyjnym zawierającym w 0,25 ml: 5 μmoli Tris-HCl pH 7,2, 1 μmol dithiotreitolu, 0,28—0,38 μmola ATP, 0,3—2,5 μmola MgCl_2 , 1,0 A_{260} jedn. tRNA, 0,3 mg białka enzymatycznego, 18,5 kBq ^{14}C -aminokwasu. Stosunek MgCl_2 do ATP wynosił odpowiednio dla alaniny i fenyloalaniny 6,57, waliny i lizyny 8,92, a kwasu glutaminowego 0,78. Próby kontrolne nie zawierały tRNA. Po 20-minutowej inkubacji w 37°C określano stopień wiązania ^{14}C -aminokwasów przez tRNA za pomocą pomiaru radioaktywności w liczniku scyntylicyjnym typu SL-30 Intertechnique, zgodnie z procedurą podaną przez Suchożebrską-Jesionek i wsp. (1984).

Procentową zawartość tRNA występującego *in vivo* w formie związanej z aminokwasami obliczono drogą porównania stopnia wiązania radioaktywnych aminokwasów *in vitro* przez tRNA nie utleniony oraz utleniony nadjodanem, posługując się wzorem

$$\% \text{ aminoacylo-tRNA } in \text{ vivo} = \frac{A' \cdot 100}{A};$$

gdzie: A — ilość pikomoli aminokwasu wiązana *in vitro* przez tRNA nie utleniony NaJO_4 (tRNA całkowity), A' — ilość pikomoli aminokwasu wiązana *in vitro* przez tRNA utleniony NaJO_4 .

WYNIKI I OMÓWIENIE

W niniejszej pracy skoncentrowano uwagę na porównaniu stopnia aminoacylacji tRNA *in vivo* w mózgu królika pt i królika zdrowego. Aby uzyskać informację na ten temat posłużono się metodą Johnsona i Chou (1973). Polega ona na ekstrakcji kwasów nukleinowych w środowisku kwaśnym zabezpieczającym wiązanie estrowe aminokwasu z tRNA przed rozłożeniem, oraz na utlenianiu nadjodanem tych cząsteczek tRNA, które występują *in vivo* w postaci nie związanej z aminokwasami. W wyniku zastosowania tej techniki otrzymuje się równocześnie dwa preparaty tRNA. Jeden, w którym zastosowano nadjodan, a następnie przeprowadzono deacylację, posiada zdolność wiązania aminokwasów *in vitro* tylko przez te cząsteczki tRNA, które *in vivo* były związane z aminokwasem. Natomiast w drugim preparacie, w którym nie stosuje się nadjodanu, a tylko deacylację, wszystkie cząsteczki tRNA biorą udział w procesie aminoacylacji *in vitro*. Porównanie tych dwóch preparatów w reakcji wiązania radioaktywnych aminokwasów *in vitro* pozwala obliczyć procentową zawartość aminoacylo-tRNA *in vivo* (patrz metody badań).

W oparciu o tę zasadę przeprowadzono wstępne doświadczenia, w których izolowano tRNA z zamrożonych mózgow uzyskanych z królików pt po przyżyciowej perfuzji mózgu przeprowadzonej w Ośrodku Doświadczalnym Neurologii Porównawczej CMDiK PAN w Mińsku Mazowieckim. Okazało się, że w wyniku tak przygotowanej tkanki, dochodzi do rozłożenia występującego *in vivo* aminoacylo-tRNA, co manifestowało się brakiem wiązania radioaktywnych aminokwasów w procesie aminoacylacji *in vitro* przez utleniony nadjodanem tRNA.

Wobec powyższych spostrzeżeń przystąpiono do badań, w których izolowano tRNA ze świeżej tkanki mózgow wypreparowanych bezpośrednio po dekapitacji zwierząt.

W pierwszej serii doświadczeń starano się określić różnice w ilości wiązania różnych aminokwasów *in vitro*, przez preparaty tRNA utleniane i nie utleniane nadjodanem. Badanie przeprowadzono trzykrotnie, przygotowując do każdego doświadczenia tRNA z całej tkanki mózgu królików pt lub królików zdrowych. W reakcji aminoacylacji przebadano 5 radioaktywnych aminokwasów stosując preparat enzymatyczny (syntetazę ami-

Tabela 1. Stopień wiązania aminokwasów *in vitro* przez tRNA izolowany z całej tkanki mózgu królika pt oraz królika zdrowego

Table 1. *In vitro* amino acids binding by tRNA isolated from whole brain of pt and healthy rabbits

¹⁴ C-aminokwas ¹⁴ C-amino acid	Królik Rabbit	pmole aminokwasu/1A ₂₆₀ jedn. tRNA pmoles amino acid/1A ₂₆₀ tRNA units			
		tRNA nie utleniany JO ₄ ⁻ tRNA unoxidated with JO ₄ ⁻ \bar{x}		tRNA utleniany JO ₄ ⁻ tRNA oxidated with JO ₄ ⁻ \bar{x}	
Alanina Alanine	zdrowy healthy	83,61–117,0	92,13 (n = 6)	40,31–60,22	46,18 (n = 4)
	pt	76,83–93,72	88,35 (n = 5)	39,44–44,24	42,24 (n = 4)
Fenylalanina Phenylalanine	zdrowy healthy	36,12–44,72	40,27 (n = 6)	17,81–21,92	20,08 (n = 4)
	pt	32,95–38,84	35,82 (n = 6)	61,78–20,55	18,95 (n = 4)
Walina Valine	zdrowy healthy	32,89–36,12	34,38 (n = 4)	21,41–23,37	22,45 (n = 4)
	pt	28,24–35,33	30,43 (n = 7)	14,95–23,46	19,09 (n = 7)
Lizyna Lysine	zdrowy healthy	39,24–44,09	41,40 (n = 6)	18,20–26,82	21,43 (n = 4)
	pt	36,06–52,04	43,12 (n = 3)	17,47–29,69	19,08 (n = 3)
Kwas glutaminowy Glutamic acid	zdrowy healthy	56,23–59,55	57,98 (n = 4)	7,77–10,20	8,57 (n = 4)
	pt	51,07–58,64	55,03 (n = 3)	6,89–7,14	7,02 (n = 3)

n – liczba zwierząt

n – number of animals

noacylo-tRNA) otrzymywany z całej tkanki mózgu królika zdrowego. Wyniki z uwzględnieniem ilości oznaczeń (n) przedstawia tabela 1.

Uzyskane rezultaty wykazały, że nie utleniane preparaty tRNA otrzymane zarówno z mózgu zwierząt zdrowych jak i chorych wiązały najwięcej pikomoli alaniny, a następnie w kolejności kwas glutaminowy, lizynę, fenyloalaninę i walinę. Wartości dla tRNA utlenianego nadjodanem były o połowę niższe, przy czym w najmniejszym stopniu wiązany był kwas glutaminowy. Różnice pomiędzy grupą zwierząt zdrowych i chorych były nieznaczne i wahały się w granicach kilku pikomoli aminokwasu w odniesieniu do A_{260} 1 jedn. tRNA.

W kolejnym etapie badań przeprowadzono proces aminoacylacji przy użyciu preparatów tRNA izolowanych z dwóch obszarów mózgu, a mianowicie z półkul mózgowych oraz z pnia mózgowego wraz z mózdzkiem. Rezultaty otrzymane z dwóch doświadczeń zawiera tabela 2.

Tabela 2. Stopień wiązania aminokwasów *in vitro* przez tRNA izolowany z dwóch obszarów anatomicznych mózgu królika pt i królika zdrowego

Table 2. *In vitro* amino acids binding by tRNA isolated from two anatomical regions of pt healthy rabbits brains

^{14}C -aminokwas ^{14}C -amino acid	Królik Rabbit	pmole aminokwasu/ $1A_{260}$ jedn. tRNA pmol amino acid/ $1A_{260}$ tRNA units							
		półkule mózgu cerebral hemispheres				pień mózgu wraz z mózdzkiem brain stem and cerebellum			
		tRNA nie utleniany JO_4^- tRNA		tRNA utleniany JO_4^- tRNA		tRNA nie utleniany JO_4^- tRNA		tRNA utleniany JO_4^- tRNA	
		unoxidated with JO_4^- \bar{x}	oxidated with JO_4^- \bar{x}	unoxidated with JO_4^- \bar{x}	oxidated with JO_4^- \bar{x}				
Alanina Alanine	zdrowy healthy pt	69,65 (n = 2)	32,61 (n = 2)	63,98 (n = 2)	32,21 (n = 2)	69,54 (n = 2)	32,84 (n = 2)	79,75 (n = 2)	37,12 (n = 2)
Fenyloalanina Phenylalanine	zdrowy healthy pt	33,88 (n = 2)	16,92 (n = 2)	31,98 (n = 2)	14,97 (n = 2)	27,50 (n = 2)	13,75 (n = 2)	32,31 (n = 2)	15,07 (n = 2)
Walina Valine	zdrowy healthy pt	26,73 (n = 2)	15,86 (n = 2)	28,69 (n = 2)	18,93 (n = 2)	27,70 (n = 2)	15,52 (n = 2)	28,89 (n = 2)	15,61 (n = 2)
Lizyna Lysine	zdrowy healthy pt	43,47 (n = 2)	20,99 (n = 2)	39,43 (n = 2)	19,92 (n = 2)	43,45 (n = 2)	20,78 (n = 2)	44,58 (n = 2)	19,53 (n = 2)
Kwas glutami- nowy Glutamic acid	zdrowy healthy pt	54,37 (n = 2)	9,17 (n = 2)	39,66 (n = 2)	8,96 (n = 2)	49,15 (n = 2)	7,75 (n = 2)	47,78 (n = 2)	7,30 (n = 2)

n — liczba zwierząt

n — number of animals

Jak wynika z przedstawionych danych, tRNA z półkul mózgowych królika pt wiąże *in vitro* podobną ilość poszczególnych aminokwasów co tRNA izolowany z mózgu królika zdrowego.

Zbliżone wyniki uzyskano również w przypadku preparatów tRNA izolowanych z pnia mózgu wraz z mózdzkiem. Jedyne wyjątek stanowił tRNA całkowity z królika pt wiążący alaninę, uzyskana bowiem wartość była znacznie wyższa w porównaniu do wyniku dla zwierzęcia zdrowego. Należy jednak zaznaczyć, że w doświadczeniach przy użyciu ^{14}C -alaniny otrzymywano dość duży rozrzut wartości.

Opierając się na uzyskanych wynikach wiązania *in vitro* ^{14}C -aminokwasów przez tRNA utleniany i nie utleniany nadjodanem można było ustalić proporcje pomiędzy tRNA występującym w mózgu w postaci wolnej i w postaci związanej z aminokwasem. W tym celu, wykorzystując dane zawarte w tabelach 1 i 2 oraz wzór podany w metodach badań, obliczono procentową zawartość aminoacylo-tRNA w mózgu *in vivo*. Wyniki przedstawia tabela 3.

Tabela 3. Poziom aminoacylo-tRNA w mózgu królika pt i królika zdrowego

Table 3. Level of aminoacyl-tRNA in pt and healthy rabbit brain

Aminokwas Amino acid	Królik Rabbit	Procent aminoacylacji tRNA <i>in vivo</i> Percent of tRNA aminoacylation <i>in vivo</i>		
		mózg cały whole brain	półkule mózgowie cerebral hemispheres	pień mózgowy wraz z mózdzkiem brain stem and cerebellum
Alanina Alanine	zdrowy healthy	50,12	46,82	50,34
	pt	47,81	47,22	46,54
Fenylalanina Phenylalanine	zdrowy healthy	49,86	49,94	46,81
	pt	52,90	50,0	46,64
Walina Valine	zdrowy healthy	65,30	59,33	65,98
	pt	62,73	56,03	54,03
Lizyna Lysine	zdrowy healthy	51,76	48,29	50,52
	pt	44,25	47,82	43,81
Kwas glutaminowy Glutamic acid	zdrowy healthy	14,78	16,86	22,59
	pt	12,76	15,77	15,28

Otrzymane dane wykazały, że kwasy rybonukleinowe transportujące alaninę, fenylalaninę oraz lizynę występują w mózgu w około 50 procentach pod postacią związaną z danym aminokwasem. tRNA dla waliny występuje w 55—65 procentach jako aminoacylo-tRNA, natomiast

tRNA dla kwasu glutaminowego zaledwie w kilkunastu procentach. Niski stopień aminoacylacji *in vivo* kwasu glutaminowym wykazaliśmy również we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych na mózgu embriónów kurzych (Suchożębrska-Jesionek i wsp. 1984). Być może wiąże się to ze szczególną rolą kwasu glutaminowego jako prekursora GABA.

Porównując grupę królików pt z grupą królików zdrowych można ogólnie stwierdzić, że nie ma zasadniczych różnic w poziomie aminoacylacji tRNA *in vivo*, w odniesieniu do badanych aminokwasów.

АМИНОАЦИЛАЦИЯ тРНК В МОЗГЕ КРОЛИКА pt
II. УРОВЕНЬ АМИНОАЦИЛО тРНК В МОЗГЕ КРОЛИКА *in vivo*

Резюме

Из мозгов кроликов pt и здоровых кроликов изолировалась тРНК, которую после окисления периодатом инкубировано с ^{14}C -аминокислотами, чтобы определить уровень aminoacylации *in vivo*. Оказалось, что 45—65% тРНК для аланина, фенилоаланина, валина и лизина существует *in vivo* в форме aminoacyло тРНК. тРНК для глютаминовой кислоты только в 20% связана с аминокислотой. Независимо от исследованной области мозга (полушария, ствол мозга и мозжечек) не была найдена значительная разница в уровне aminoacylации *in vivo* тРНК у кроликов pt и контрольных животных.

AMINOACYLATION OF tRNA IN PT RABBIT BRAIN.
II. AMINOACYL-tRNA LEVEL IN RABBIT BRAIN *IN VIVO*

Summary

tRNA was isolated from healthy and pt rabbit brains for determination of the percentage of its *in vivo* aminoacylated forms and after periodate oxidation charged with ^{14}C -amino acids.

The results indicate that tRNAs for alanine, phenylalanine, valine and lysine occur in 45—65 per cent as aminoacyl-tRNA *in vivo*, whereas tRNA for glutamic acid exists only in 13—20 per cent in the form of glutamyl-tRNA. Apart from the investigated brain regions (hemispheres, brain stem and cerebellum), no significant differences were observed in the level of aminoacyl-tRNA in the pt rabbit as compared with that of control animals.

PIŚMIENICTWO

1. Allen R., Raines P. L., Regen D.: Regulatory significance of transfer RNA charging levels. I. Measurement of charging levels in livers of chow-fed rats, fasting rats and rats fed balanced or imbalanced mixture of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 190, 323—336.
2. Johnson T. C., Chou L.: Level and amino acid acceptor activity of mouse brain tRNA during neural development. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 405—411.
3. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.

4. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 71—85.
5. Suchożebrska-Jesionek D., Szymonik-Lesiuk S., Borkowska I.: Shortlasting effect of L-phenylalanine on the level of aminoacyl-tRNA in chick embryo's brain. *Bull. Pol. Acad. Sci. Biol. Sci.*, 1984, 32, 1—8.

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

MILENA LAURE-KAMIONOWSKA, MARIA DĄMBSKA

MIELINIZACJA WYBRANYCH DRÓG PŁATA SKRONIOWEGO W NORMIE I W PRZEWLEKŁYCH SCHORZENIACH OKRESU WCZESNODZIECIĘCEGO

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Rozwój układu nerwowego człowieka, postępujący szybko w okresie życia płodowego, trwa nadal po urodzeniu i jest uchwytany za pomocą badań morfologicznych do około trzeciego roku życia. Ocena wpływu czynników chorobowych na mózg w okresie przedporodowym wykazała, że mogą one nie tylko powodować uszkodzenia, ale często stanowią przyczynę opóźnienia jego dojrzewania (Laure-Kamionowska 1980; Laure-Kamionowska i wsp. 1980). Wyniki tych badań pozwalają przypuszczać, że uszkodzenia okołoporodowe oraz schorzenia okresu wczesnodziecięcego zaburzające wewnętrzną homeostazę ustroju, mogą wpływać niekorzystnie na końcowe etapy rozwoju układu nerwowego upośledzając rozwój psychoruchowy dzieci przewlekle chorych.

Celem niniejszego opracowania jest sprawdzenie tej hipotezy za pomocą porównania prawidłowego przebiegu mielinizacji wybranych dróg płata skroniowego z mielinizacją tych samych struktur u dzieci obciążonych patologią w pierwszych trzech latach życia. Do badań wybrano mózgi dzieci, które przebyły uszkadzającą zamartwicę okołoporodową, bądź też rozwijały się obciążone ciężkimi schorzeniami wrodzonymi, wadami serca lub postępującą chorobą nowotworową narządów wewnętrznych.

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na 60 mózgach dzieci zmarłych w wieku 0—3 lat. Grupę kontrolną stanowiło 30 mózgów. Do tej grupy wybrano dzieci, które pochodziły z ciąż prawidłowych i zmarłych z powodu schorzeń pozamózgowych: w następstwie urazu porodowego (4 przyp.), zachłyśnięcia (4 przyp.), uwięźniętej przepukliny pachwinowej (3 przyp.),

Tabela 1. Wiek przypadków z grupy kontrolnej

Table 1. Age of cases in the control group

Wiek Age	0	2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	1,5	2	3
	tyg. weeks	mies. month	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	mies. mos	rok year	roku year	lata years	lata years
Liczba przypadków Number of cases	5	2	3	1	2	4	3	1	1	1	1	1	1	2	1	1

Tabela 2. Dane kliniczne dotyczące grupy dzieci zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej

Table 2. Clinical data — infants died of neoplastic diseases

Nr przyp. Case	Wiek Age	Rodzaj nowotworu Neoplasm	Leczenie Treatment
99/79	2 mies.	Neuroblastoma	Rentgenoterapia. Czas leczenia 12 dni
	2 months	Przerzuty do węzłów chłonnych	
32/80	4 mies.	Neuroblastoma. Metastases	Roentgenotherapy. Period of treatment 12 days
	4 months	Hepatoblastoma	Chemioterapia (winkrystyna, cyklofosfamid)
102/79	8 mies.	Hepatoblastoma	Zgon 4 dni po rozpoczęciu leczenia
	8 months	Histiocytosis mal.	Chemotherapy. Died 4 days after beginning of treatment
79/79	8 mies.	Przerzuty do węzłów chłonnych	Chemioterapia.
	8 months	Histiocytosis mal. Metastases	Zgon 6 dni po rozpoczęciu leczenia
	8 months	Neuroblastoma	Chemotherapy. Died 6 days after beginning of treatment
23/84	1 rok	Przerzuty do węzłów chłonnych	Chemioterapia (winkrystyna, cyklofosfamid)
	1 year	Neuroblastoma. Metastases	Napromienianie węzłów szyjnych
	1 year	Nephroblastoma	Chemotherapy. Roentgenotherapy
10/83	1 rok	Nephroblastoma	Nie leczony
	2 mies.	Nephroblastoma	Not treated
	1 year	Neuroblastoma	Nie leczony
	2 months	Przerzuty do węzłów chłonnych	
101/79	1 rok	Neuroblastoma. Metastases	Not treated
	5 mies.	Histiocytosis malignum	Chemioterapia (zinblastyna, cyklofosfamid, metatrexat, winkrystyna).
	1 year	Histiocytosis malignum	Czas leczenia 2,5 mies.
	5 months	Histiocytosis malignum	Chemotherapy. Period of treatment 2,5 months
37/80	3 lata	Lymphosarcoma malignum	Chemioterapia (winkrystyna, metatrexat).
	3 years	Lymphosarcoma malignum	Czas leczenia 4 mies.
35/82	3 lata	Lymphosarcoma malignum	Chemotherapy. Period of treatment 4 months
	3 years	Rhabdomyosarcoma orbitae	Operacja Chemioterapia. Czas leczenia 8,5 mies.
	3 years	Rhabdomyosarcoma	Surgery. Chemotherapy. Period of treatment — 8.5 months
61/82	3 lata	Nephroblastoma.	Chemioterapia
	3 years	Przerzuty do węzłów chłonnych	
	3 years	Nephroblastoma. Metastases	Chemotherapy

Tabela 3. Dane kliniczne dotyczące grupy dzieci zmarłych z objawami niedotlenienia okołoporodowego

Table 3. Clinical data of children died of perinatal anoxia

Nr przyp. Case	Wiek Age	Przebieg ciąży, porodu, okresu poporodowego Course of pregnancy, delivery, postnatal period
42/83	0	Niewydolność łożyska. Noworodek donoszony. Zamartwica okołoporodowa. Apgar 4.
	0	Placental insufficiency. Mature newborn. Perinatal asphyxia. Apgar's score 4.
47/80	0	Gestoza u matki w czasie ciąży. Okręcenie pępowiny wokół szyi płodu. Urodzony w 38 tygodniu ciąży. Apgar 2.
	0	Mother's gestosis during pregnancy. Umbilical cord twisted around the fetuses neck. Born in 38th week of gestation. Apgar's score 2.
19/84	2 mies.	Noworodek donoszony. Stan po zamartwicy okołoporodowej, konflikcie Rh, transfuzjach wymiennych. Zapalenie płuc.
	2 months	Mature newborn. Status after perinatal asphyxia, Rh incompatibility, exchange transfusions. Pneumonia.
3/83	3 mies.	Zamartwica okołoporodowa. Posocznica. Mikroзаторowość płuc.
	3 months	Perinatal asphyxia. Sepsis. Microembolization of lungs.
9/84	9 mies.	Uszkodzenie okołoporodowe o.u.n. Zespół zaburzeń wchłaniania. Niedobiałczenie.
	9 months	Perinatal lesion of c.n.s. Malabsorption syndrome. Hypoproteinemia.

Table 4. Clinical data for children with congenital heart disease

Nr przyp. Case	Wiek Age	Rodzaj wady, leczenie, choroby towarzyszące Type of failure, treatment, concomitant diseases
19/83	2 dni 2 days	Serce jednokomorowe i jednoprzedsionkowe. Wspólny pień tętniczy. Ostra niewydolność krążenia Single ventricle and common atrium. Common arterial trunk. Insuf. of circulation
95/75	5 dni 5 days	Serce jednokomorowe i jednoprzedsionkowe Single ventricle and common atrium
196/75	12 dni 12 days	Wspólna komora, przełożenia wielkich naczyń Single ventricle, complete transposition of the aorta and pulmonary trunk
54/83	17 dni 17 days	Przełożenie wielkich naczyń tętniczych. Ubytek w przegrodzie międzykomorowej i międzyprzedsionkowej. Przewężenie lewego przedsionka Complete transposition of the aorta and pulmonary trunk. Atrial and ventricular septal defect
247/76	5 tyg. 5 weeks	Tetralogia Fallota Fallot's tetrad
80/74	2 mies. 2 months	Tetralogia Fallota Fallot's tetrad
39/83	2,5 mies. 2.5 months	Wspólna komora, przełożenie wielkich naczyń. Ubytek w przegrodzie międzykomorowej i międzyprzedsionkowej Common ventricle, complete transposition of the vessels. Atrial and ventricular septal defect
281/77	3,5 mies. 3.5 months	Tetralogia Fallota Fallot's tetrad
20/83	3,5 mies. 3.5 months	Otwór przegrody komorowej. Stan po operacji – krążenie pozaustrojowe. Zgon 10 dni po operacji Ventricular septal defect. Surgery. Death – 10 days after operation.
41/83	4 mies. 4 months	Tetralogia Fallota. Atrezja tętnicy płucnej. Stan po operacji. Zgon w dniu operacji Fallot's tetrad. Atresia of the pulmonary trunk. Surgery. Death on operation day
284/77	5 mies. 5 months	Tetralogia Fallota. Zapalenie płuc Fallot's tetrad. Pneumonia
17/83	6 mies. 6 months	Ubytek w przegrodzie międzyprzedsionkowej. Zgon w dniu operacji Atrial septal defect. Death on operation day
6/84	9 mies. 9 months	Otwór w przegrodzie międzyprzedsionkowej i międzykomorowej. Zgon kilka dni po operacji Atrial and ventricular septal defect. Death 5 days after operation
8/84	16 mies. 16 months	Serce jednokomorowe. Zwężenie tętnicy płucnej. Stan po operacji Single ventricle. Pulmonary stenosis. Surgery

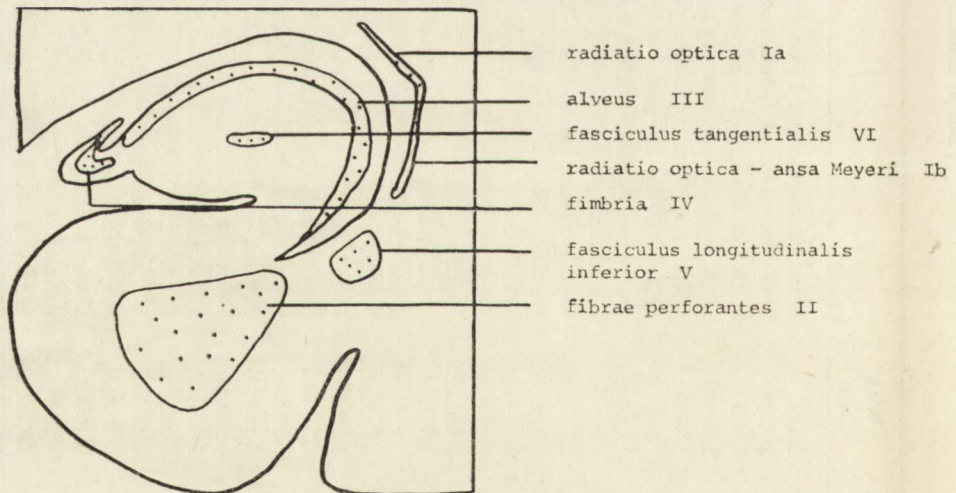
ostrej niedrożności jelit (6 przyp.), zatrucia substancjami toksycznymi (4 przyp.), wypadku (5 przyp.), oparzenia II/III° (4 przyp.). Dzieci te nie przebywały na oddechu kontrolowanym, względnie okres oddechu kontrolowanego był krótki. Wiek dzieci z grupy kontrolnej przedstawia tabela 1. Grupy badane obejmowały 30 przypadków, w tym 6 przypadków niemowląt, które przeżyły niedotlenienie okołoporodowe, 14 dzieci z wadami serca i 10 zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej. Dane kliniczne grupy dzieci zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej przedstawia tabela 2, grupy dzieci z cechami zamartwicy okołoporodowej i uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego — tabela 3, grupy dzieci z wrodzonymi wadami serca — tabela 4.

Do badań neuropatologicznych pobrano reprezentatywne skrawki z półkul mózgu i mózdzku oraz przekroje przez pień mózgu. Materiał zatapiany w parafinie barwiono hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, metodą Van Gieson—Orceina oraz metodą Klüver—Barrery.

Ocenę stopnia mielinizacji przeprowadzano na preparatach z płata skroniowego. Poziom mielinizacji poszczególnych dróg oceniano według czterostopniowej skali:

- 0 — brak mieliny w badaniu mikroskopowym,
- 1 — mielina widoczna w badaniu pod mikroskopem,
- 2 — mielina widoczna okiem nieuzbrojonym,
- 3 — intensywność barwienia mieliny odpowiada mielinie dojrzałej.

Powyższą skalę zastosowano opierając się na pracy Gillesa i wsp. (1983). Ocenie poddano następujące drogi: droga wzrokowa (I), istota biała zakrętu parahipokampalnego — perforant pathway (II), koryto —



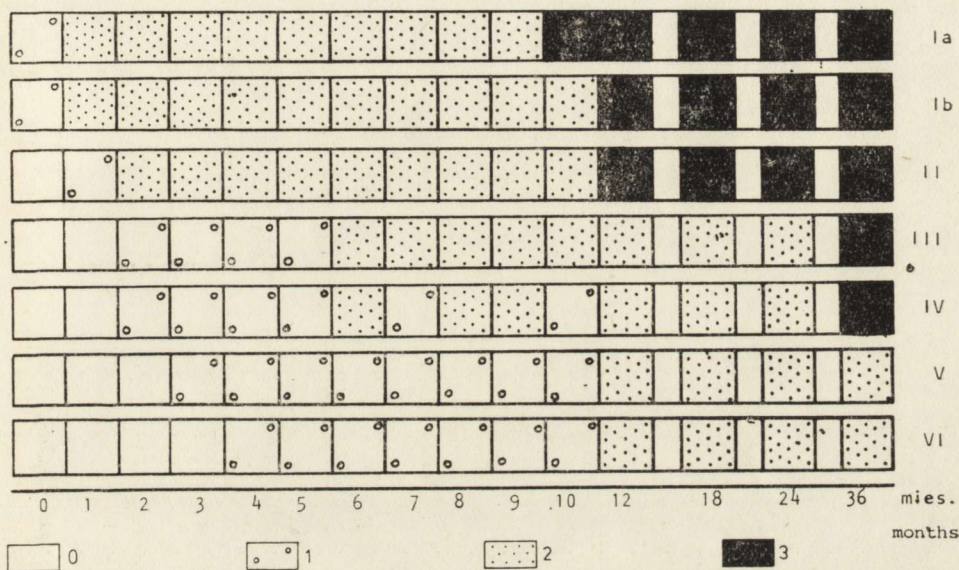
Ryc. 1. Schemat dróg płata skroniowego wybranych do oceny mielinizacji
 Fig. 1. Diagram of selected tracts in the temporal lobe for evaluation of myelination

alveus (III), włókna wewnętrzne warstwy molekularnej zakrętu hipokampa (VI), strzępek — *fimbria* (IV) oraz pęczek podłużny dolny (V). Schematyczny rysunek dróg, których mielinizację oceniano przedstawia ryc. 1.

WYNIKI

Mielinizacja w grupie kontrolnej

Przebieg mielinizacji poszczególnych dróg płata skroniowego w grupie kontrolnej przedstawia rycina 2. Ocena przypadków najmłodszych wska-



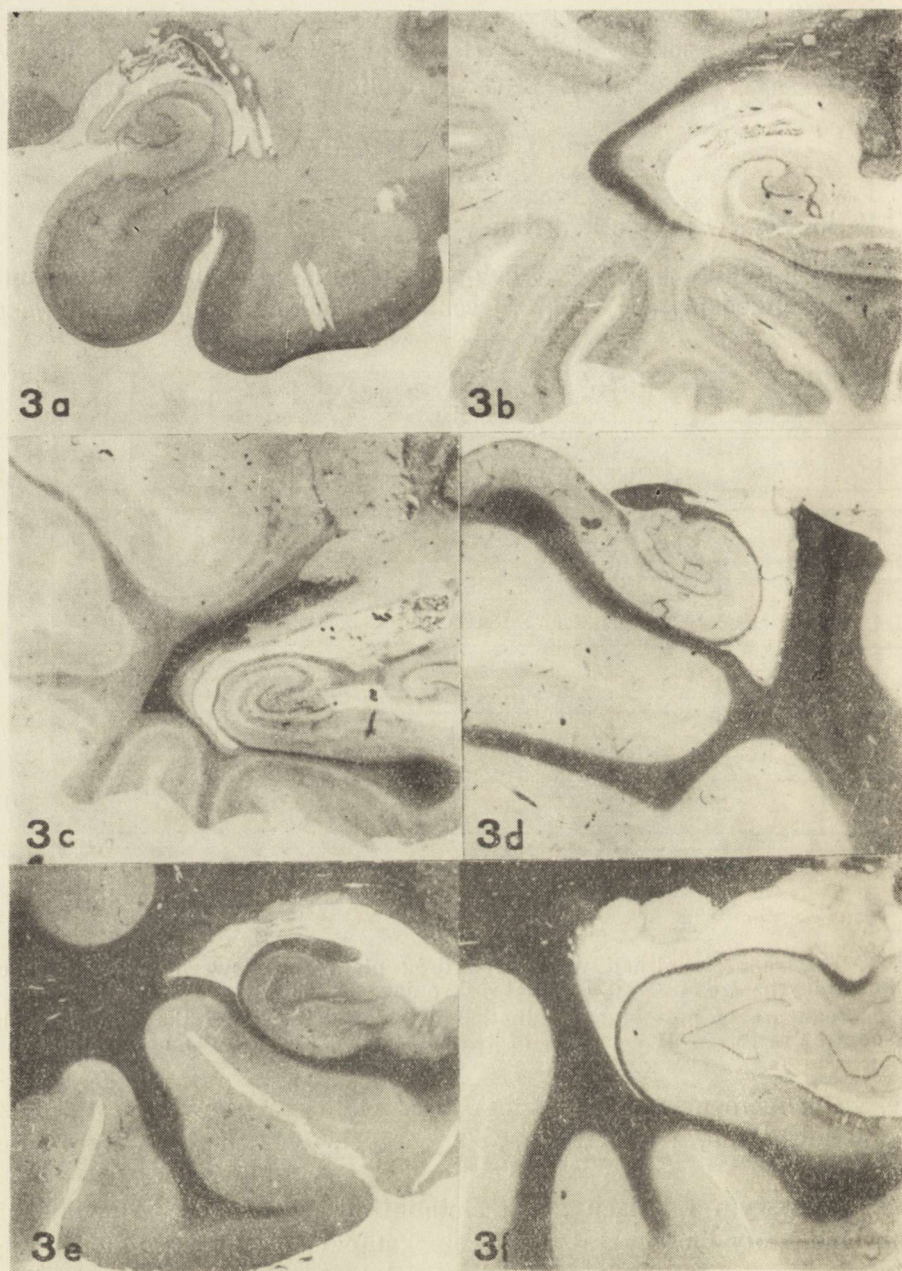
Ryc. 2. Przebieg mielinizacji wybranych dróg płata skroniowego w przypadkach kontrolnych. I—VI — drogi płata skroniowego, 0—3 stopień mielinizacji

Fig. 2. Sequence of postnatal myelination of selected tracts of the temporal lobe in control cases. I—VI — tracts of temporal lobe, 0—3 degree of myelination

zuje, że w momencie porodu istota biała płata skroniowego jest jeszcze niezmielinizowana, z wyjątkiem pojedynczych włókien drogi wzrokowej (ryc. 3a).

W pierwszym miesiącu życia zmielinizowane włókna pojawiają się w obrębie istoty białej zakrętu parahipokampalnego, a w drugim miesiącu są widoczne pod mikroskopem również w obrębie *alveus*. Włókna łączące i projekcyjne w obrębie strzępków i pęczka podłużnego dolnego są jeszcze zupełnie pozbawione mieliny.

Około 3—4 miesiąca życia mielina pojawia się w strzępku, pęczku podłużnym dolnym oraz w istocie białej zakrętu hipokampa. Droga wzrokowa i istota biała zakrętu parahipokampa wykazują w tym czasie intensywny postęp mielinizacji (ryc. 3b).

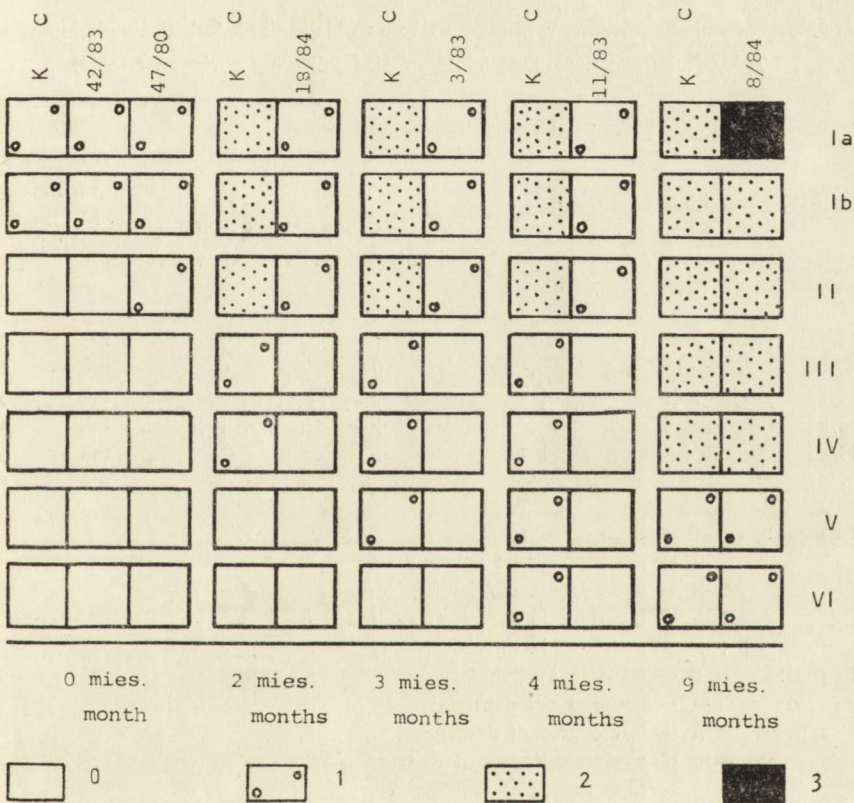


Ryc. 3a—3f. Myelinizacja płata skroniowego. Grupa kontrolna. Klüver-Barrera Pow. lupowe. 3a — noworodek donoszony, 3b — niemowlę w trzecim miesiącu życia, 3c — dziecko w szóstym miesiącu życia, 3d — dziecko roczne, 3e — dziecko półtoraroczne, 3f — dziecko trzyletnie

Figs 3a—3f. Myelination of the temporal lobe. Control cases. Klüver-Barrera. Magn. glass. 3a — newborn at birth, 3b — infant three months old, 3c — child six months old, 3d — child one year old, 3e — child one and half a year old, 3f — child three years old

W szóstym miesiącu życia (ryc. 3c) mielinizacja drogi wzrokowej jest zaawansowana. Długie drogi łączące w obrębie strzępków mielinizują się intensywnie, natomiast krótkie drogi łączące są nadal we wstępnej fazie mielinizacji, z wyjątkiem istoty białej zakrętu parahipokampalnego, która wykazuje intensywną mielinizację.

W pierwszym roku życia mielinizacja drogi wzrokowej odpowiada jej mielinizacji w mózgu dojrzałym (ryc. 3d). Większość włókien łączących w płacie skroniowym wykazuje średnio zaawansowaną mielinizację. Tylko krótkie drogi łączące poniżej kory płata skroniowego są nadal tylko częściowo zmielinizowane. Mielinizację płata skroniowego u dziecka półtorarocznego przedstawia rycina 3e. Z wyjątkiem krótkich dróg łączących zakrętów skroniowych, które są w średnim stopniu zmielinizowane, pozostałe są dobrze zmielinizowane.



Ryc. 4. Mielinizacja wybranych dróg płata skroniowego w grupie dzieci zmarłych w przebiegu niedotlenienia okołoporodowego. K — kontrola, I—VI — drogi płata skroniowego, 0—3 — stopień mielinizacji

Fig. 4. Myelination of selected tracts in the temporal lobe in children died after perinatal anoxia. C — control case, I—VI — tracts of the temporal lobe, 0—3 — degree of myelination

U dziecka trzyletniego mielinizacja drogi wzrokowej, istoty białej zakrętu parahipokampalnego, *alveus* oraz strzępka odpowiada mielinizacji dojrzałego układu nerwowego (ryc. 3f).

Mielinizacja dróg płata skroniowego w grupie dzieci zmarłych z objawami niedotlenienia okołoporodowego

Przebieg mielinizacji dróg płata skroniowego u dzieci z przebytych niedotlenieniem okołoporodowym w porównaniu do mielinizacji u dzieci grupy kontrolnej przedstawia rycina 4. Opóźnienie mielinizacji zaobserwowane w 3 przypadkach (19/84, 3/83 i 11/83) dotyczyło wszystkich badanych dróg. Przypadek 11/83 — było to dziecko urodzone w 34 tygodniu ciąży, co może częściowo tłumaczyć mniejszy niż w kontroli stopień mielinizacji. Uszkodzenia komórkowe występują we wszystkich przypadkach tej grupy i są przedstawione w tabeli 5.

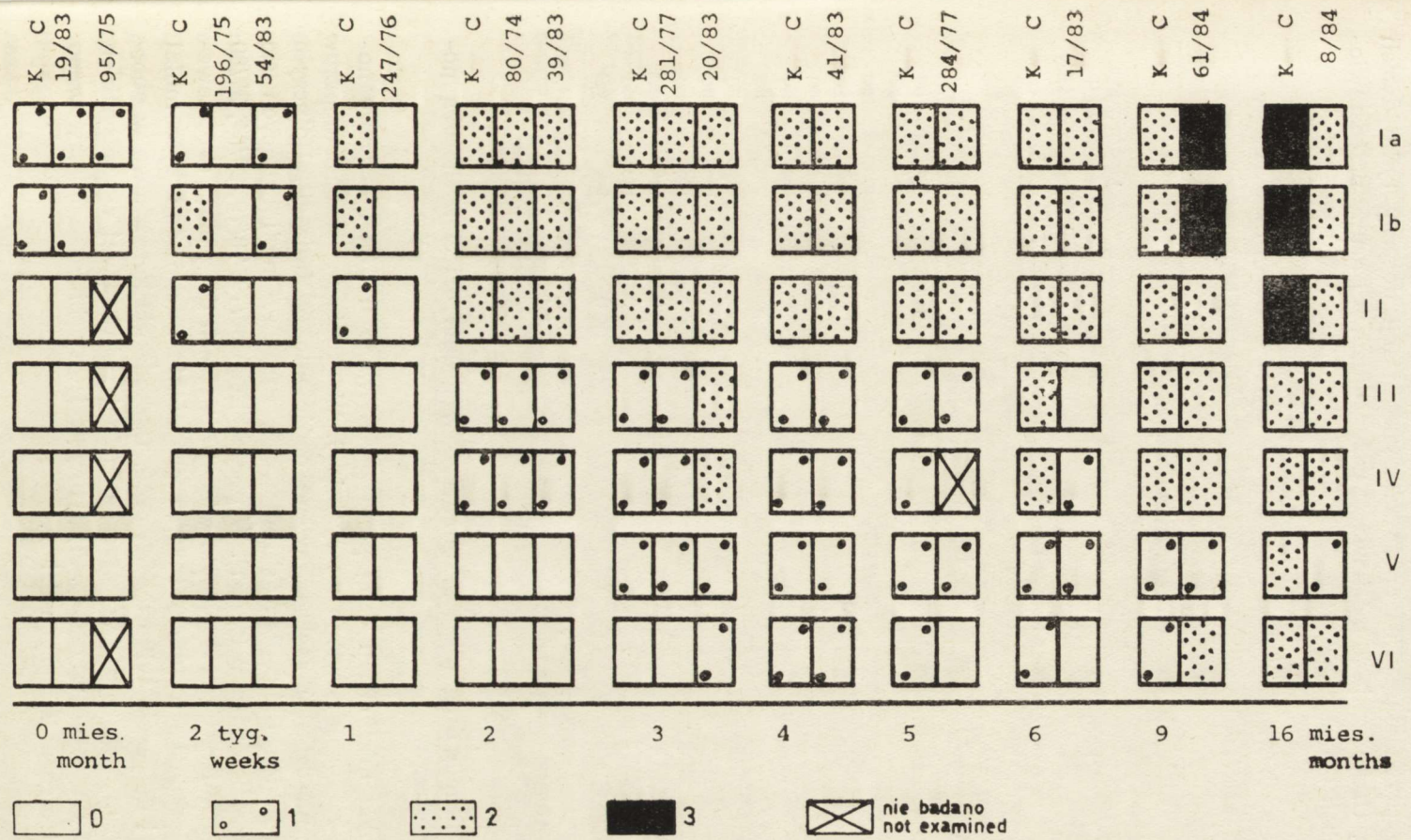
Tabela 5. Uszkodzenia komórkowe w grupie zmarłych z objawami niedotlenienia okołoporodowego
Table 5. Neuronal damage (children died following perinatal anoxia)

Nr przyp. Case	Uszkodzenia komórkowe Neuronal damages				Opóźnienie mielinizacji Myelination delay	
	kora amonalna Ammon's horn	kora skroniowa temporal cortex	kora wyspy insular cortex	kora czołowa frontal cortex		
42/83	+	+	+	+	nie	no
47/80	+	+	0	0	nie	no
19/84	++	++	+	—	tak	yes
3/83	+++	+++	+++	+++	tak	yes
11/83	+++	++	+	+	tak	yes
9/84	+++	+++	++	+	nie	no

Legenda: 0 — brak danych
— — nie uszkodzone neurony
+ — uszkodzenia niewielkiego stopnia
++ — uszkodzenia średniego stopnia
+++ — uszkodzenia dużego stopnia
Legend: 0 — no data available
— — neurons not damaged
+ — low degree of damage
++ — moderate degree of damage
+++ — high degree of damage

Mielinizacja dróg płata skroniowego w grupie dzieci z wadami serca

Rycina 5 przedstawia mielinizację wybranych dróg płata skroniowego w przypadkach kontrolnych oraz przypadkach dzieci z wadami serca. Przypadki 196/75, 247/76 i 8/84 wykazują wyraźne opóźnienie mielini-



Ryc. 5. Mielinizacja wybranych dróg płata skroniowego w grupie dzieci zmarłych w przebiegu wad serca. K — kontrola, I—VI — drogi płata skroniowego, 0—3 stopień mielinizacji

Fig. 5. Myelination of selected tracts in the temporal lobe in children with congenital heart disease. C — control case, I—VI — tracts of the temporal lobe, 0—3 — degree of myelination

zacji, w przypadku 17/83 opóźnienie mielinizacji dotyczy tylko dwóch szlaków. Uszkodzenia komórkowe w przypadkach tej grupy przedstawiono w tabeli 6.

Tabela 6. Uszkodzenia komórkowe w grupie dzieci z wrodzonymi wadami serca
Table 6. Neuronal damage (Children with congenital heart disease)

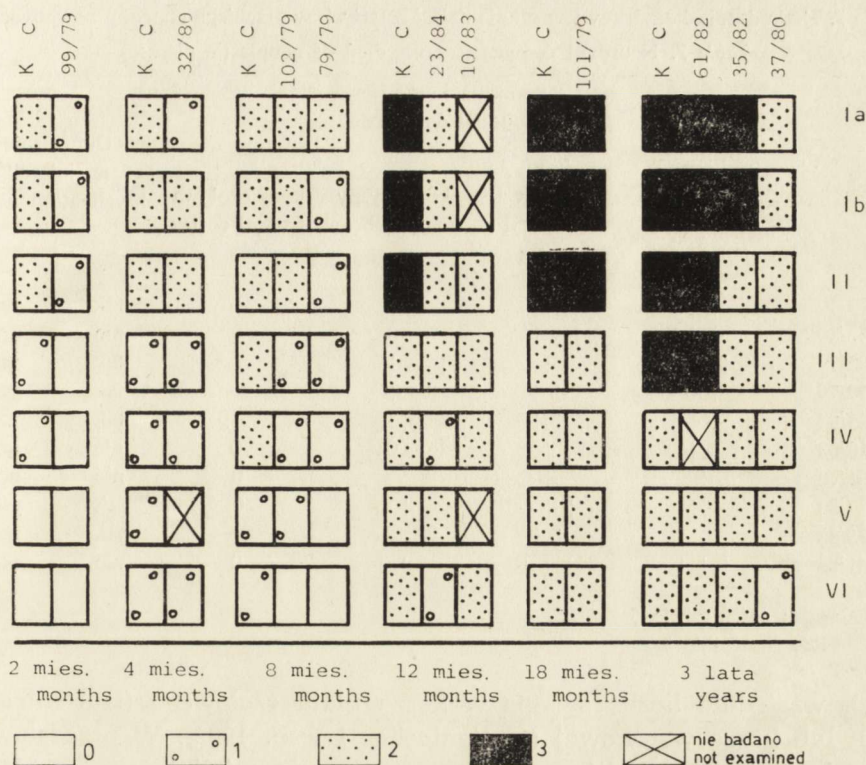
Nr przyp. Case	Uszkodzenia komórkowe Neuronal damages				Opóźnienie mielinizacji Myelination delay	
	kora amonalna Ammon's horn	kora skroniowa temporal cortex	kora wyspy insular cortex	kora czołowa frontal cortex		
19/83	—	—	—	—	nie	no
95/75	+	+	++	++	nie	no
196/75	—	—	—	—	tak	yes
54/83	+++	++	+	0	nie	no
247/76	++	++	++	+	tak	yes
80/74	++	++	+	+	nie	no
39/83	++	+	—	—	nie	no
281/77	—	—	—	—	nie	no
20/83	++	+	+	+	nie	no
41/83	+++	++	++	++	nie	no
284/77	++	++	+++	+	nie	no
17/83	++	+	++	0	tak	yes
6/84	++	+	0	0	nie	no
8/84	+	+	—	0	tak	yes

Legenda: patrz tabela 5

Legend: see table 5

Mielinizacja dróg płata skroniowego w grupie dzieci z chorobą nowotworową

Przebieg mielinizacji dróg płata skroniowego u dzieci z grupy nowotworowej przedstawiono na rycinie 6. W grupie tej w sześciu przypadkach na dziesięć zaobserwowano opóźnienie mielinizacji. Dotyczyło ono wszystkich dróg płata skroniowego, zarówno mielinizujących się wcześniej, jak i później (ryc. 7). W przypadkach 99/79, 79/79, 23/84, 37/80 opóźnienie mielinizacji dotyczyło więcej niż trzech dróg płata skroniowego. W przypadkach 102/79 i 35/82 opóźnienie mielinizacji było mniej nasilone i dotyczyło tylko dwóch dróg. Uszkodzenia komórkowe w obrębie tej grupy występują w korze amonalnej i skroniowej we wszystkich przypadkach tej grupy (tab. 7). Obrzęk istoty białej zaobserwowano tylko u trojga najstarszych dzieci.



Ryc. 6. Mielinizacja wybranych dróg płata skroniowego w grupie dzieci zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej. K — kontrola, I—VI — drogi płata skroniowego, 0—3 — stopień mielinizacji

Fig. 6. Myelination of selected tracts in the temporal lobe in children died in the course of neoplastic diseases. C — control cases, I—VI — tracts of the temporal lobe, 0—3 degree of myelination

OMÓWIENIE

Ustalenie parametrów morfologicznych określających przebieg rozwoju mózgu po urodzeniu jest istotnym zagadnieniem umożliwiającym przeprowadzenie korelacji między dojrzewaniem struktury i funkcji układu nerwowego w okresie wczesnodziecięcym. Badania nad rozwojem mózgu w okresie płodowym mogą opierać się na porównaniu kilku parametrów dojrzałości: uzwojenia i warstwowości kory mózgu i mózdzku, ilości macierzy przykomorowej, mielinizacji dróg pnia mózgu i zwojów podstawy (Laure-Kamionowska 1980). Podobna ocena odnosząca się do okresu poporodowego napotyka trudności ze względu na mniej uchwytne i stosunkowo wolniej zachodzące zmiany w końcowych fazach dojrzewania OUN. Próbowano prześledzić w okresie pourodzeniowym rozwój kolców dendrytycznych (Marin-Padilla 1970; Takashima i wsp.

Tabela 7. Uszkodzenia komórkowe w grupie dzieci zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej
 Table 7. Neuronal damage (Infants died of neoplastic disease)

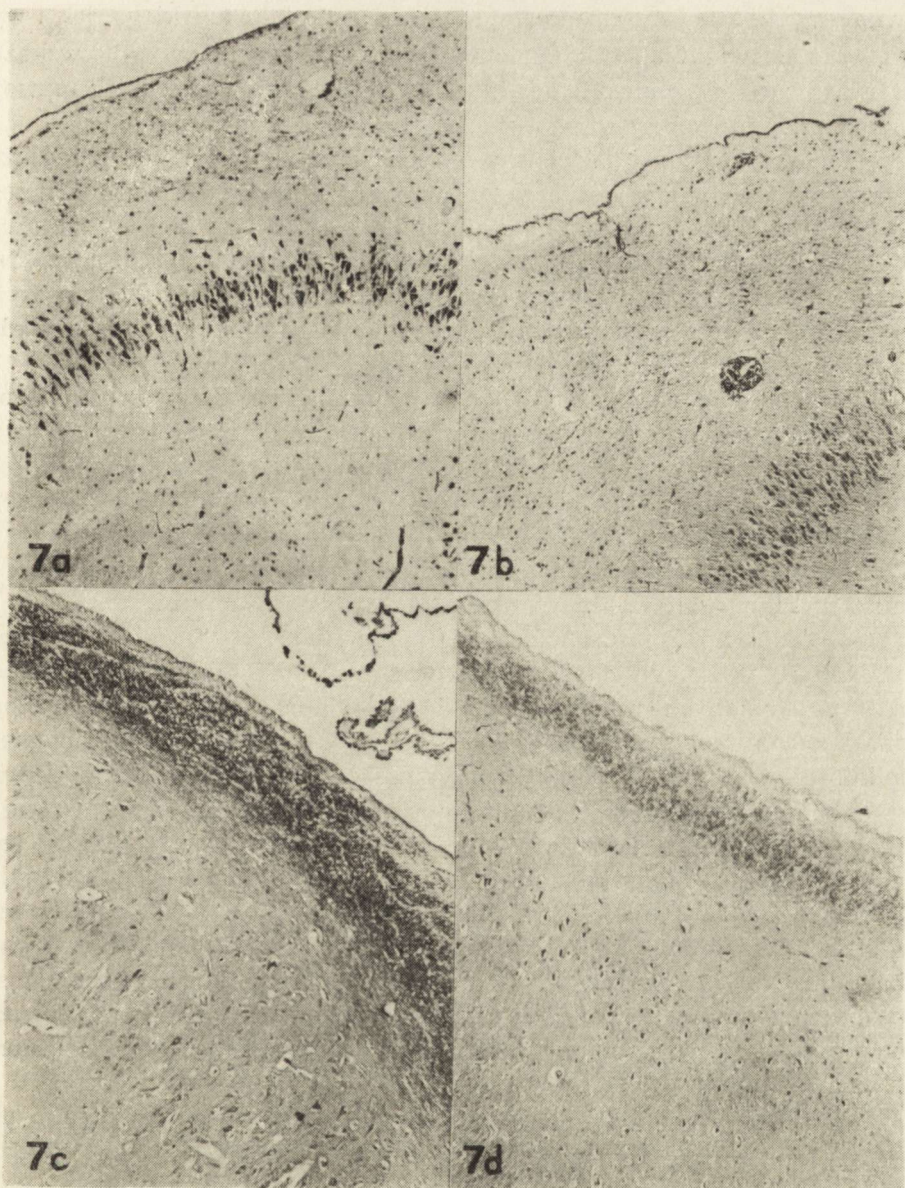
Nr przyp. Case	Uszkodzenia komórkowe Neuronal damages				Opóźnienie melinizacji Myelination delay	
	kora amonalna Ammon's horn	kora skroniowa temporal cortex	kora wyspy insular cortex	kora czołowa frontal cortex		
99/79	++	+	+	+	tak	yes
32/80	++	++	0	0	nie	no
102/79	+++	+	+	—	tak	yes
79/79	++	++	+	+	tak	yes
23/84	++	++	++	++	tak	yes
10/83	++	+	0	0	nie	no
101/79	+	+	—	0	nie	no
37/80	++	+++	++	0	tak	yes
35/82	++	++	+	—	tak	yes
61/82	+++	+++	++	0	nie	no

Legenda: patrz tabela 5

Legend: see table 5

1980), względnie liczbę synaps w korze płata czołowego (Huttenlocher 1979) lub korze wzrokowej (Huttenlocher i wsp. 1982). W przedstawionych badaniach podjęliśmy próbę opracowania mielinizacji niektórych dróg nerwowych jako parametru dojrzałości mózgu po urodzeniu dziecka. Mielinizacja dróg pnia i półkul mózgowych w okresie ciąży została opracowana przez Yakovleva i Lecours (1967), Rorke i Riggs (1969), a ostatnio na bardzo dużej liczbie przypadków przez Gillesa i wsp. (1983). Dane o mielinizacji w okresie poporodowym przedstawione są tylko w podręczniku Dekabana (1959) i odnoszą się do ogólnie potraktowanej mielinizacji istoty białej półkul. Brody z współautorami (1984) zasygnalizowali badania prowadzone nad tym zagadnieniem.

Przeprowadzona przez nas ocena mielinizacji wybranych dróg płata skroniowego w okresie od urodzenia do trzeciego roku życia wykazała, że poszczególne drogi przebiegające w płacie skroniowym wykazują różne tempo mielinizacji. Droga wzrokowa jest częściowo zmielinizowana w momencie porodu i osiąga stopień mielinizacji odpowiadający mielinie dojrzałej w 10 miesiącu życia. Pozostałe drogi są w ogóle niezmielinizowane w chwili przyścia na świat dziecka, mielinizacja postępuje w ciągu pierwszych dwóch lat życia i jest zaawansowana w trzecim roku życia. Mielinizacja pęczka podłużnego dolnego i wewnętrznych dróg łączących warstwy molekularnej zakrętu hipokampa rozpoczyna się najpóźniej i przeciąga poza trzeci rok życia. Różny czas mielinizacji i okres do osiągnięcia pełnej morfologicznej dojrzałości dróg przebiegających w płacie skroniowym wydał się korzystny dla zaplanowanych badań po-



Ryc. 7a—7d. Mielinizacja koryta (*alveus*). Klüver—Barrera. Pow. $60 \times$ 7a — prawidłowa mielinizacja *alveus* w drugim miesiącu życia, 7b — opóźniona mielinizacja *alveus* w drugim miesiącu życia (przypadek 99/79 z grupy dzieci zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej), 7c — prawidłowa mielinizacja *alveus* w ósmym miesiącu życia, 7d — opóźniona mielinizacja *alveus* w ósmym miesiącu życia (przypadek 79/79)

Figs 7a—7d. Myelination of *alveus*, Klüver—Barrera. $\times 60$. 7a —myelination of *alveus* in control case in second month of life, 7b — delay of myelination of *alveus* in child from neoplastic group, aged 2 months (case 99/79), 7c — myelination of *alveus* in eighth month of life in control case, 7d — delay of myelination in eighth month of life (case 79/79)

równawczych. Zarówno obserwacje własne materiału ludzkiego, jak i wyniki prac doświadczalnych (Krigman 1976, Montgomery 1978) wskazują, że zaburzenia ogólnoustrojowe wpływają istotnie na przebieg rozwoju osłonek mielinowych.

Opracowanie grupy dzieci urodzonych w zamartwicy było przedłużeniem poprzednich prac dotyczących opóźnienia dojrzewania układu nerwowego u płodu w przebiegu patologii ciąży. W grupie tej na sześć przebadanych przypadków trzy wykazywały opóźnioną mielinizację. Dwa z nich urodziły się o czasie, jeden był wcześniakiem, urodzonym w 34 tygodniu ciąży, co pozwala odnieść opóźnienie rozwoju mózgu do wieku biologicznego a nie czasu porodu.

Wyodrębnienie pozostałych dwóch grup miało na celu przesledzenie wpływu różnych czynników patogennych na proces mielinizacji. W grupie dzieci z wrodzonymi, w większości sinicznymi wadami układu krążenia opóźnienie mielinizacji zaobserwowano tylko w pojedynczych przypadkach. Na ogólną liczbę 14 przypadków stwierdzono je w 4 przypadkach, przy czym u dwojga dzieci, zmarłych w okresie niemowlęcym nie można wykluczyć niewielkiego wcześniactwa.

Opóźnienie mielinizacji widoczne było najwyraźniej w grupie dzieci zmarłych w przebiegu choroby nowotworowej. W sześciu przypadkach (na 10 przebadanych) mielinizacja była opóźniona w porównaniu do kontroli. Porównując czas choroby, okres i rodzaj leczenia z przebiegiem mielinizacji trudno jest ustalić wpływ poszczególnych czynników. Prawdopodobnie odgrywa rolę zespół zaburzeń wynikających z wyniszczającego wpływu choroby nowotworowej jak i leczenia cytostatykami. W jednym przypadku całokształt obrazu neuropatologicznego sugeruje nałożenie się zmian związanych z chorobą nowotworową na uszkodzenia powstałe w okresie okołoporodowym. Należy zaznaczyć, że u dzieci z chorobą nowotworową, która w poszczególnych przypadkach rozpoczęła się w różnych okresach życia można było zauważyć opóźnienie mielinizacji tych dróg, które w prawidłowych warunkach uzyskują osłonki rdzenne w tym właśnie okresie.

Podkreślić trzeba, że prawie we wszystkich przypadkach z grup obciążonych patologią okresu wczesnodziecięcego stwierdziliśmy uszkodzenia komórkowe, ale ich nasilenie i topografia nie wskazują, że opóźnienie mielinizacji mogłoby być jedynie zjawiskiem wtórnym w stosunku do zmian neuronalnych.

Obserwacje nasze prowadzą do następujących wniosków:

1. Badanie mielinizacji dróg płata skroniowego jest przydatne dla oceny rozwoju ośrodkowego układu nerwowego u dzieci w wieku 0—3 lat.

2. Przewlekłe schorzenia ogólnoustrojowe, zaburzające homeostazę organizmu w tym okresie mogą spowodować opóźnienie w rozwoju osłonek mielinowych.

МИЕЛИНИЗАЦИЯ НЕКОТОРЫХ ПУТЕЙ ВИСОЧНОЙ ДОЛИ В НОРМЕ И В ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ РАННЕГО ДЕТСКОГО ПЕРИОДА

Резюме

Целью исследования является сравнение физиологической миелинизации некоторых путей височной доли с миелинизацией тех же областей у детей с общим патологическим процессом.

Исследования мозга были проведены в 60 случаях детей умерших в возрасте 0—3 года. Контрольная группа содарила 30 случаев внезапно умерших детей. Группа детей, которые пережили повреждающую асфиксию во время рождения, состояла из 6 случаев, у 14 детей были врожденные пороки сердца, 10 детей умерло из-за опухолевой болезни. Анализ случаев в разном возрасте показал, что отдельные пути височной доли миелинизируются с различной скоростью. Это выгодно для сравнительных исследований и для оценки развития центральной нервной системы. Замедление миелинизации, по сравнению с контрольной группой, было наиболее отчетливым у детей умерших из-за опухоли. У детей с опухолевой болезнью, которая началась в различных периодах жизни, наблюдалось замедление миелинизации тех путей, которые в нормальных условиях миелинизируются именно во время болезни ребенка. Замедление миелинизации путей височной доли было отмечено тоже в некоторых случаях детей, рожденных в асфиксии и в группе детей с врожденными пороками сердца. Можно, таким образом, сказать, что хронические заболевания организма, нарушающие его омеостаз, могут быть причиной замедления миелинизации.

MYELINATION OF SOME SELECTED TRACTS OF TEMPORAL LOBE IN NORMAL SUBJECTS AND IN CHRONIC DISEASES OF CHILDHOOD

Summary

The aim of the paper is comparison of the normal course of myelination of some selected tracts of the temporal lobe with myelination of the same regions in children burdened with systemic pathology. The investigations were performed on 60 brains of children who died at the age of 0—3 years. The control group consisted of 30 brains of children which suffered sudden death. The group of children who started life after perinatal asphyxia consisted of 6 cases, 14 children had congenital heart disease and ten died in the course of neoplastic diseases. Analysis of different-aged cases demonstrated that the particular tracts running through the temporal lobe exhibited different rates of myelination. This is advantageous for comparative studies and useful for evaluation of the development of the central nervous system. Delayed myelination in comparison with the control group was most pronounced in the group of children who died of neoplastic disease. In these children in whom the disease started at various ages a delay of myelination could be observed of these tracts which normally receive myelin sheaths just in the period when the child became ill. The delay of myelination of the temporal lobe tracts also occurred in some cases of children born in perinatal asphyxia and those with congenital heart disease. To sum up it may be said that chronic systemic affections disturbing the homeostasis of the organism may cause retarded formation of the myelin sheaths.

PIŚMIENICTWO

1. Brody B. A., Kinney H. C., Kloman A. S., Gilles F. H.: Sequence of human postnatal myelination. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1984, 43, 311 (Abstr).
2. Dekaban A.: Neurology of infancy. The Williams and Wilkins Comp. Baltimore, 1959, 1—30.
3. Gilles F. H., Shankle W., Dooling E. C.: Myelinated tracts: Growth patterns. W: *The Developing Human Brain. Growth and Epidemiologic Neuropathology*. Red. J. Wright, PSG Inc. Boston, Bristol, London 1983, 117—184.
4. Huttenlocher P. R.: Synaptic density in human frontal cortex—developmental changes and effect of aging. *Brain Res.*, 1979, 163, 195—205.
5. Huttenlocher P. R., Courten Ch., Garey L. J., Loos H.: Synaptogenesis in human visual cortex—evidence for synapse elimination during normal development. *Neurosci. Lett.*, 1982, 33, 247—252.
6. Grigman M. R., Hogan E. L.: Undernutrition in the developing rat: effect upon myelination. *Brain Res.*, 1976, 107, 239—255.
7. Laure-Kamionowska M.: Wpływ gestozy na mózg płodu. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 239—257.
8. Laure-Kamionowska M., Dąbska M., Jaczevska E., Czerwiński W.: Dojrzenie mózgu na tle ogólnego rozwoju płodów matek chorych na cukrzycę. *Problemy Cukrzycy w Położnictwie i Neonatologii*. Tom II. Poznań 1980, 43—50.
9. Marin-Padilla M.: Prenatal and early postnatal ontogenesis of human motor cortex. A Golgi study. *Brain Res.*, 1970, 23, 167—183.
10. Montgomery A., Swenarchuk L.: Further observations on myelinated axon numbers in normal and dystrophic mice. *J. Neurol. Sci.*, 1978, 38, 77—82.
11. Rorke L., Riggs H.: Myelination of the brain in the newborn. J. B. Lippincott Company, Philadelphia, Toronto, 1969, 1—106.
12. Takashima S., Chan F., Becker L. E., Armstrong D. L.: Morphology of the developing visual cortex of the human infant. A qualitative and quantitative Golgi study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1980, 39, 487—501.
13. Yakovlev P. J., Lecours A. R.: The myelogenetic cycles of regional maturation of the brain. W: *Regional Development of the brain in early life*. Red. A. Minowski, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburgh, 1967, 3—70.

Adres autorów: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
EUGENIUSZ SROCYŃSKI, ANDRZEJ ŻÓRAWSKI

EFFECT OF CYANIDE INTOXICATION ON FREE FATTY
ACID PATTERN IN THE BRAIN OF RATS DEVELOPING
ON A DIET WITH VARIOUS AMOUNTS OF LIPIDS *

Department of Neurology, Medical School, Poznań

The basic morphological changes in the brain in cyanide intoxication comprise demyelination in the commisural systems and degenerative lesions of neurocytes in several cerebral structures (Levine, Stypulkowski 1959; Hirano et al. 1967). When the intoxication is less intense, the only morphological changes in the brain involve some rarefaction and degeneration of neurocytes in the cerebral and cerebellar cortex. In these experimental conditions, the only deviations of the myelin lipid spectrum, in the early period after intoxication, is the enhanced cholesterol estrification. In the later phase there occur also some shifts in the proportions of lipid components of myelin in the form of a decrease in cerebroside content and some minor changes in the content of particular phospholipid classes (Wender et al. 1986).

In the above cited experiments we have also established that changes of fatty acids content in the diet during brain maturation influence only insignificantly the reaction of myelin lipids to cyanide intoxication.

Continuing our studies on the toxic effect of cyanide, of an intensity not leading to myelin destruction, we have performed an analysis of free fatty acids pattern in the brain of rats, developing on a diet with various amounts of lipids. We hope, that the studies performed at the predemyelination phase of the experimental disease produced by cyanide intoxication, may help to solve the problem of whether and how cyanide intoxication produces the primary myelin lesions.

* The investigations were supported by the Polish Academy of Sciences, Research Project No. 10.4.06.3.2.

MATERIAL AND METHODS

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

The above presented experiments were performed on rats developing on normal, lipid-deficient and lipid-enriched diets. Pregnant females were divided into three groups. One group was fed a specially composed diet containing 0.12% rape seed oil (fat-deficient diet), the second group was fed the same diet supplemented with 20% rape seed oil (fat-enriched diet) and the third one, serving as the control group was fed a diet containing 2% of rape seed oil. The detailed formula of the experimental diets is presented in our previous paper (Wender et al. 1986). The experimental diets were given to all groups of pregnant rats, starting 6 days before the expected delivery and then continued, as the only source of food for both the nursing mothers and their offspring, over the whole postnatal period. The food as well as drinking water were available *ad libitum*. The experimental animals were sacrificed by decapitation 4 and 18 hours and 14 days after HCN intoxication.

Histological methods. Morphological evaluation of the experimental process involved analysis of histological sections stained by the techniques of Nissl, Woelcke or with hematoxylin-eosin following embedding of the material in celloidin.

Chemical methods. Extraction of free long-chain fatty acids from samples of white and grey cerebral matter was performed according to Dole and Meinertz (1960). The n-heptane phase containing free fatty acids was processed by thin-layer chromatography, according to Fischwick (1968) in the modification of Sroczyński and Fiedler (1978) and free fatty acids after methylation were separated from each other by means of gas-liquid-chromatography on a Pye 104 gas chromatograph equipped with a flame-ionising detector.

The fatty acids were identified by comparison of the respective peaks in the studied chromatograms with those corresponding to a mixture of standard fatty acid methyl esters (Applied Sciences Laboratory).

The chromatograms were processed quantitatively by the computing areas of respective peaks from retention times and heights of the peaks. The results are expressed in per cents.

RESULTS

Results of clinical and morphological observations were identical to those described in our previous publication (Wender et al. 1986).

The results obtained in our studies of the free fatty acids spectra in the cerebral white matter are presented in Table 1. From gas-liquid-chromatography analysis it would appear that, in animals developing on the normal diet, deviations from the control spectrum were most pronounced essentially in the early phase after intoxication (4 hrs). The proportion of palmitic acid (16:0) showed a decrease, whereas the content of stearic acid (18:0) and of oleic acid (18:1) exceeded those found in control animals. The percentage of total trienes was decreased, and that of monoenes increased. The free fatty acid spectra 18 hrs and 14 days after HCN intoxication approached the control one. However, the decrease of the relative content of total trienes persisted.

The deviations in free fatty acid composition of the white matter of rats developing on a fat-deficient diet and intoxicated with HCN (relative decrease in palmitic acid (16:0) and relative increase in stearic acid (18:0)) were more pronounced in the early period after intoxication than in the group of normally fed animals. The detected deviations tended to revert to normal values in the subsequent investigated periods. Distinct deviations were noticed in the proportion of oleic acid (18:1). After an initial increase, a very marked fall was observed in the later period of the experiment. In the same group of animals in studies performed 14 days after intoxication a significant shift in the ratio of saturated to unsaturated free fatty acids was found, at the expense of unsaturated ones.

The changes after HCN intoxication, noted in animals maturing on the fat-enriched diet, are similar in the early period of the experiment to those found in the previous groups (relative decrease in palmitic acid (16:0) and increase in stearic acid (18:0)). Subsequently (18 hrs after intoxication) a marked decrease in the relative content of oleic acid (18:1) was also found, which led to a lowered content of total monoenoic acids.

The detailed pattern of free fatty acids in the cerebral grey matter is given in Table 2. The alterations observed in the group of normally fed rats were less pronounced than those found in the white matter and generally below the significance limits. The only exceptions involved the significant decrease in trienes in the early phase, and in monoenes 18 hrs and 14 days after HCN intoxication. The deviations noticed

Table 1. Influence of HCN intoxication on composition of free fatty acids in cerebral white matter of rats fed during development a diet containing various amounts of lipids

Tabela 1. Wpływ zatrucia HCN na skład wolnych kwasów tłuszczowych w istocie białej mózgu szczurów żywionych w czasie rozwoju dietą z różną zawartością lipidów

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	Control Norma	4 hours after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN			18 hours after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN			14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN		
		control diet	deficient diet	enriched diet	control diet	deficient diet	enriched diet	control diet	deficient diet	enriched diet
		normalna dieta	niedobór lipidów	nadmiar lipidów	normalna dieta	niedobór lipidów	nadmiar lipidów	normalna dieta	niedobór lipidów	nadmiar lipidów
12:0	0.1±0.4	0.1±0.04	0.1±0.0	0.2±0.1	0.4±0.1	0.4±0.2	0.4±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1
14:0	1.1±0.2	0.5±0.2	0.5±0.1	1.1±0.5	2.0±0.8	2.5±0.3	3.6±1.6	2.7±0.3	1.7±0.2	1.2±0.6
15:0	0.6±0.1	0.2±0.1	0.2±0.05	0.4±0.2	0.9±0.4	0.9±0.1	0.6±0.1	1.0±0.2	0.8±0.3	0.4±0.1
16:0	42.3±1.8	32.6±1.5	28.6±2.8	29.6±1.3	38.7±1.4	38.6±0.2	40.1±2.6	35.6±1.2	41.4±2.2	33.4±1.7
16:1	1.8±0.3	0.7±0.1	0.5±0.05	0.6±0.2	2.7±1.1	1.9±0.5	1.2±0.3	3.6±1.0	1.2±0.3	1.0±0.3
17:0	0.4±0.1	0.2±0.05	0.1±0.04	0.5±0.2	1.0±0.4	0.6±0.1	0.6±0.1	0.9±0.3	0.5±0.1	0.4±0.1
18:0	27.2±3.4	36.6±0.6	38.6±2.2	37.8±2.6	31.0±3.6	28.1±1.5	29.2±2.4	32.8±4.2	33.7±3.4	36.5±1.7
18:1	19.4±1.3	24.3±1.8	27.3±3.0	19.3±3.8	16.3±0.4	14.2±1.2	10.8±1.5	15.7±3.1	8.9±1.1	18.0±2.5
18:2	0.7±0.2	0.1±0.04	0.1±0.0	0.6±0.2	0.6±0.2	0.3±0.1	0.7±0.4	0.6±0.2	0.5±0.1	0.3±0.1
18:3	0.5±0.2	0.4±0.1	0.4±0.1	0.8±0.3	0.6±0.2	0.3±0.1	1.2±0.2	0.7±0.1	0.6±0.2	0.6±0.1
20:0	0.6±0.04	1.1±0.3	1.3±0.2	0.9±0.1	0.9±0.1	0.6±0.2	0.8±0.04	0.8±0.2	0.7±0.2	0.9±0.1
20:1	0.3±0.1	0.5±0.2	0.1±0.0	0.2±0.1	0.1±0.03	0.3±0.1	0.4±0.2	0.1±0.04	0.2±0.1	0.1±0.03
20:2	0.2±0.1	0.2±0.1	0.2±0.03	0.4±0.2	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.8±0.2	0.7±0.2	0.3±0.1
20:3	3.5±1.1	0.9±0.4	0.8±0.3	2.8±1.4	1.6±0.4	4.8±0.6	5.0±1.1	1.5±0.3	3.7±0.2	3.2±0.7
20:4	0.0	0.1±0.04	0.2±0.1	0.4±0.2	0.7±0.3	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.7±0.2	0.4±0.1

20:5	0.0	0.2±0.2	0.2±0.04	0.9±0.5	0.1±0.1	1.2±0.3	0.8±0.2	0.2±0.1	1.1±0.2	0.6±0.1
24:0	1.3±0.6	0.8±0.3	0.6±0.2	2.8±1.4	1.7±0.3	3.3±0.3	3.1±0.5	1.5±0.3	2.8±0.3	2.1±0.8
24:1	0.0	0.2±0.03	0.1±0.03	0.8±0.6	0.3±0.3	0.5±0.5	0.7±0.3	0.2±0.1	0.2±0.2	0.2±0.2
Unidentified										
Niezidentyfikowane	0.0	0.3±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.0	0.0	0.4±0.2	0.3±0.1	0.2±0.2	0.2±0.2
Total saturated FA										
Calkowite nasycone	73.6±0.8	72.1±0.4	70.0±0.7	73.3±0.8	76.6±0.9	75.0±0.5	78.1±0.9	75.9±0.8	82.0±0.8	75.1±0.6
kwasy tłuszczowe										
Total unsaturated FA										
Calkowite nienasycone	26.4±0.3	27.6±0.3	29.9±0.4	26.5±0.5	23.4±0.3	25.0±0.4	21.5±0.4	23.8±0.4	17.8±0.3	24.7±0.5
kwasy tłuszczowe										
Monoenes	21.5±0.4	25.7±0.05	28.0±0.8	20.9±1.2	19.4±0.5	16.9±0.6	13.1±0.6	19.6±1.1	10.5±0.4	19.3±0.7
1-nienasycone										
Dienes	0.9±0.1	0.3±0.1	0.3±0.2	0.7±0.1	1.0±0.1	0.6±0.1	1.1±0.2	1.4±0.2	1.2±0.2	0.6±0.1
2-nienasycone										
Trienes	4.0±0.6	1.3±0.3	1.2±0.2	3.6±0.8	2.2±0.3	5.9±0.5	6.2±0.6	2.2±0.2	4.3±0.2	3.8±0.1
3-nienasycone										
Tetraenes	0.0	0.1±0.1	0.2±0.1	0.4±0.2	0.7±0.5	0.4±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.7±0.2	0.4±0.1
4-nienasycone										
Pentaenes	0.0	0.2±0.1	0.2±0.2	0.9±0.5	0.1±0.1	1.2±0.3	0.2±0.2	0.2±0.1	1.1±0.2	0.6±0.1
5-nienasycone										

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Table 2. Influence of HCN intoxication on composition of free fatty acids in cerebral grey matter of rats fed during development a diet containing various amounts of lipids

Tabela 2. Wpływ zatrucia HCN na skład wolnych kwasów tłuszczowych w istocie szarej mózgu szczurów żywionych w czasie rozwoju dietą z różną zawartością lipidów

Fatty acids Kwasy tłuszczowe	Control Norma	4 hours after HCN intoxication 4 godz. po zatruciu HCN			18 hours after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN			14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN		
		control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów	control diet dieta normalna	deficient diet niedobór lipidów	enriched diet nadmiar lipidów
12:0	0.2±0.04	0.1±0.02	0.1±0.02	0.1±0.0	0.3±0.1	0.2±0.1	0.2±0.1	0.4±0.2	0.5±0.1	0.2±0.1
14:0	0.9±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	1.2±0.3	1.5±0.3	1.4±0.4	1.5±0.2	1.6±1.5	2.1±0.2	1.3±0.2
15:0	0.4±0.04	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.8±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.6±0.2	0.8±0.1	0.6±0.1
16:0	29.2±3.0	38.2±2.4	33.1±2.1	38.4±2.5	40.2±1.1	39.8±1.7	39.5±2.0	42.2±2.5	39.0±2.4	38.4±2.5
16:1	1.4±0.3	0.9±0.1	0.9±0.3	0.7±0.3	2.5±0.3	1.9±0.6	1.6±0.4	1.5±0.6	1.9±0.4	1.4±0.3
17:0	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.7±0.1	0.5±0.1	0.8±0.3	0.4±0.1	0.7±0.1	0.5±0.05
18:0	48.6±3.3	41.1±2.4	40.1±2.2	40.4±2.1	34.7±1.1	34.6±2.7	32.8±2.0	39.3±0.3	30.8±1.6	35.3±3.4
18:1	13.8±3.9	16.1±2.1	19.6±1.5	13.1±1.9	14.1±1.2	13.4±1.5	11.0±1.7	11.3±2.1	8.9±0.7	11.0±1.5
18:2	0.5±0.02	0.3±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.6±0.1	0.7±0.3	0.2±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1
18:3	0.2±0.1	0.2±0.04	0.4±0.1	0.4±0.1	0.6±0.05	0.6±0.1	0.6±0.2	0.3±0.1	0.9±0.3	0.7±0.2
20:0	0.4±0.2	0.4±0.1	0.7±0.1	0.3±0.03	0.6±0.1	0.5±0.1	0.7±0.2	0.3±0.1	0.7±0.3	0.6±0.1
20:1	0.2±0.1	0.1±0.03	0.2±0.1	0.2±0.03	0.1±0.05	0.1±0.04	0.3±0.05	0.2±0.04	0.3±0.1	0.2±0.1
20:2	0.1±0.01	0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.6±0.4	0.7±0.4	0.4±0.2	0.7±0.2	0.5±0.2
20:3	2.5±0.4	0.3±0.04	1.2±0.5	2.2±0.8	1.0±0.1	2.9±1.1	3.2±0.5	0.3±0.1	4.7±1.0	3.3±0.4

20:4	0.1±0.1	0.1±0.02	0.2±0.1	0.1±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1	1.0±0.4	0.1±0.1	0.7±0.3	0.2±0.1
20:5	0.2±0.1	0.1±0.04	0.5±0.3	0.4±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	1.1±0.3	0.1±0.1	1.4±0.2	1.1±0.2
24:0	1.0±0.4	0.4±0.1	1.2±0.6	1.2±0.3	1.6±0.3	1.7±0.5	2.9±0.5	0.5±0.2	4.5±1.2	2.9±0.3
24:1	0.0	0.2±0.1	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.1	0.0	0.3±0.1	0.1±0.1	0.2±0.2	0.3±0.1
Unidentified Niezidentyfikowane	0.0	0.3±0.2	0.2±0.2	0.1±0.1	0.0	0.0	0.5±0.3	0.2±0.1	0.7±0.4	1.1±0.1
Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe	81.0±1.0	81.3±0.7	76.2±0.7	82.1±0.7	80.4±0.4	79.4±0.7	79.0±1.7	85.3±0.6	79.1±0.7	79.8±0.8
Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe	19.0±0.5	18.4±0.3	23.6±0.3	17.8±0.4	19.6±0.3	20.6±0.2	20.5±0.4	14.5±0.3	20.2±0.3	19.1±0.3
Monoenes 1-nienasycone	15.4±1.0	17.2±0.2	28.0±0.5	14.1±0.7	16.8±0.4	15.4±0.5	13.2±0.6	13.1±0.7	11.3±0.3	12.9±0.5
Dienes 2-nienasycone	0.6±0.01	0.5±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	1.2±0.3	1.4±0.3	0.6±0.1	1.2±0.1	0.9±0.1
Trienes 3-nienasycone	2.7±0.3	0.5±0.01	1.6±0.3	2.6±0.4	1.6±0.1	3.5±0.6	3.8±0.4	0.6±0.1	5.6±0.6	4.0±0.3
Tetraenes 4-nienasycone	0.1±0.1	0.1±0.04	0.2±0.1	0.1±0.1	0.4±0.1	0.2±0.1	1.0±0.4	0.1±0.1	0.7±0.3	0.2±0.1
Pentaenes 5-nienasycone	0.2±0.1	0.1±0.04	0.5±0.3	0.4±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	1.1±0.3	0.1±0.1	1.4±0.2	1.1±0.2

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

in animals developing on the fat-deficient diet were similar to those observed in the group of normally fed rats. The only marked difference involved the marked relative decrease in trienes in the early period of the experiment in the latter group. The most pronounced deviations were noted in animals maturing on the fat-enriched diet. The marked decrease in the proportion of stearic acid (18:0) and in the percentage of monoenes in the brains with a concomitant increase of palmitic acid (16:0) were noted at all studied periods.

DISCUSSION

The effect of ischemia and hypoxia on brain lipid metabolism is partially known from the studies of Bazan (1970), Strosznajder et al. (1972), Cendella et al. (1975), De Medio et al. (1980) and others. The main finding in postdecapitation ischemia is a release of free fatty acids from membrane phospholipids, provoked by activation of catabolic processes and probably also by inhibition of phospholipid synthesis. Transient ischemia produces also an increase in the free fatty acids pool in the brain. The major components of this pool include palmitic, stearic, oleic and arachidonic acids, with no greater deviations from the normal pattern. However, bilateral ischemia produces an increase in the relative concentration of 20:4 and 22:6 fatty acids, originating from various phospholipids as well as from diglyceride production. According to Strosznajder et al. (1972), the liberated free fatty acids represent one of the important factors responsible for the development of irreversible brain damage after ischemia.

In our studies, concerning the predemyelination stage of cyanide-induced encephalopathy, we have noticed transient changes in the free fatty acids pattern, with only minor deviations lasting for a longer period of time after intoxication. The early changes have proven concomitant with the enhanced cholesterol estrification, the only deviation observed in the myelin fraction after cyanide intoxication (Wender et al. 1986).

It should be stressed that after mild cyanide intoxication we have not noticed in the pool of free fatty acids in the brain any enrichment of arachidonates, which represents, as mentioned above, one of the very characteristic biochemical symptoms of the early post-ischemic period (De Medio et al. 1980). Since in our experiments we have neither observed any major structural injury in the brain, it seems possible to assume that the pathological changes quickly progress only when the intensity of such noxious agents as ischemia or hypoxia, reaches some critical level. One of the important biochemical events is the increased arachidonate production, which provokes subsequently irreversible brain damage. Changes in the free fatty acids pool in the brain after mild

cyanide intoxication noted in this study cannot be compared with those which we have observed (Wender et al. 1975) in the phospholipid fraction of the brain in cyanide-induced encephalopathy (increased proportion of polyunsaturated fatty acids — 22 : 5 and 24 : 5 and in the later period also of 20 : 3).

The myelin lipid spectrum has shown only a slight tendency to changes less pronounced in the experimental conditions of fat deficiency or fat excess during brain maturation, and thus we are not entitled to conclude that the diet affects susceptibility of brain myelin to cyanide intoxication (Wender et al. 1986). As regards the dietary effect on the influence of cyanide intoxication on the pattern of free fatty acids in the brain we have to mention the greater influence of the fat-enriched than of the fat-deficient diet. However, the experimental model is a complex one, involving the action of two external factors on brain metabolism, and the detected differences are not particularly pronounced. Therefore, we cannot conclude that the unsuitable diet during development significantly influences the effect of hypoxia, provoked by cyanide intoxication, on the pattern of free fatty acids in the brain and, subsequently, the intensity of structural brain lesions. This conclusion is in accordance with the mentioned above observations of only insignificant differences in structural and biochemical changes in the myelin sheath between these experimental conditions.

WPLYW ZATRUCIA CYJANKAMI
NA OBRAZ WOLNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH MÓZGU U SZCZURÓW
ROZWIJAJĄCYCH SIĘ NA DIECIE Z RÓŻNĄ ZAWARTOŚCIĄ LIPIDÓW

Streszczenie

Badano trujący wpływ cyjanków, o natężeniu nie prowadzącym do demielinizacji na obraz wolnych kwasów tłuszczowych mózgu u szczurów rasy Wister, rozwijających się na diecie z różną zawartością lipidów. Stwierdzono większy wpływ diety wzbogaconej w tłuszcze, niż diety niedoborowej. Zaobserwowane różnice nie były dostatecznie wyraźne, żeby można było wyciągnąć wnioszek, że niewłaściwa dieta w czasie rozwoju zmienia istotnie wpływ niedotlenienia, wywołanego przez zatrucie cyjankami, na obraz wolnych kwasów tłuszczowych mózgu i następowo wpływa na natężenie strukturalnych zmian w mózgu.

ВЛИЯНИЕ ИНТОКСИКАЦИИ ЦИАНИДАМИ
НА СВОБОДНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ МОЗГА РАЗВИВАЮЩИХСЯ КРЫС,
ПОЛУЧАЮЩИХ ДИЕТУ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ЛИПИДОВ

Резюме

Было исследовано токсическое влияние цианидов в концентрации не ведущей к демиелинизации, на свободные жирные кислоты мозга развивающихся крыс расы Вистар, получающих диету с различным содержанием липидов. Обогащенная липидами диета влияла

сильнее, чем диета с недобором липидов. Неотчетливая разница не позволяет сделать вывод, что неуместная диета в развитии изменяет существенно влияние гипоксии, вызванной цианидами, на свободные жирные кислоты мозга, и следовательно, влияет на степень структурных изменений в мозгу.

REFERENCES

1. Bazan N.: Effects of ischemia and electroconvulsive shock on free fatty acid pool in the brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 218, 1—10.
2. Cenedella R. J., Galli C., Paoletti R.: Brain free fatty acids level in rats sacrificed by decapitation versus focused microwave irradiation. *Lipids*, 1975, 10, 290—293.
3. De Medio G., Goracci G., Horrocks L., Łazarewicz J., Mazzari S., Porcellati G., Strosznajder J., Trovarelli G.: The effect of transient ischemia on fatty acid and lipid metabolism in the gerbil brain. *Ital. J. Biochem.*, 1980, 29, 411—432.
4. Dole V., Meinertz H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2595—2599.
5. Fishwick B.: Changes in the lipids of turkey muscle during storage at chilling and freezing temperatures. *J. Sci. Food Agricult.*, 1968, 19, 440—445.
6. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observation of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 200—213.
7. Levine S., Stypulkowski W.: Experimental cyanide encephalopathy. *A. M. A. Arch. Pathol.*, 1959, 67, 306—323.
8. Sroczyński E., Fiedler A.: Ocena stopnia zjełczenia tłuszczu drobiowego. *Przemysł Spożywczy*, 1978, 11, 420—421.
9. Strosznajder J., Gromek A., Łazarewicz J.: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 447—455.
10. Wender M., Adamczewska Z.: Fatty acid pattern of cerebral lipids in cyanide encephalopathy. *Exp. Pathol.*, 1975, 11, 233—238.
11. 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 on a diet containing various amounts of lipids. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 43—56.

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

IRENA NIEBRÓJ-DOBOSZ,
JANINA RAFAŁOWSKA, MARIA BARCIKOWSKA-LITWIN

BRAIN MYELIN IN SENILE PATIENTS WITH BRAIN INFARCTION

Department of Neurology, Medical School, Warszawa

In the course of brain infarction generalized basic metabolic alterations and cellular dysfunctions occur (Raichle 1983). Despite widespread changes occurring in those conditions clinicians present the opinion that the course of brain infarction in senile patients is milder than in younger ones. This is possibly due to several morphological and biochemical processes occurring in the course of brain aging. Much attention has recently been devoted to nerve cell alterations during the aging process (Brody 1978). The nerve cell structure and function are known to be much impaired in that process. Few data are available, however, on the behaviour of myelinated axons in aged human brain (Berlet et al. 1982; Linte, Brook 1983). No investigation data are available based on morphological and biochemical characteristics of brain myelin in senile patients in the course of brain infarction. For this reason it was interesting to compare myelin in morphological and biochemical studies in the course of brain infarction.

MATERIAL AND METHODS

The material consisted of 21 autopsy specimens taken from patients who died because of brain infarction (Table 1). Two other cases were also examined. One aged 51, who died because of amyotrophic lateral sclerosis, the other one, 91 years old died without any evident cause except signs of atherosclerosis observed during autopsy. In all cases autopsy was performed in the 24 hours after death. For histological studies formalin-fixed and paraffin-embedded sections of the hemisphere with apparent infarction and the heterolateral one referred to as the "healthy" hemisphere were stained with hematoxylin-eosin and by the van Gieson and Klüver—Barrera methods. Edema was evaluated ac-

Table 1. Material and morphological results

Tabela 1. Materiał i ocena morfologiczna

	Case No Nr przyp.	Age yrs Wiek lata	Sex Płeć	Time of survival days Czas przeżycia dni	Hyper-tension Nadciśnienie	Athero-sclerosis Miażdżycę	Hemisphere with infarction Półkula z zawałem			"Healthy" hemisphere Półkula „zdrowa”			
							Edema Obrzęk	Macro-phages Makro-fagi	Leuco-cytes Leuko-cyty	Edema Obrzęk	Macro-phages Makro-fagi	Leuco-cytes Leuko-cyty	Poor myelin staining „Zblednięcie” mieliny
Senile group Grupa starcza	1	81	F	2	+	4+	2+	-	-	1+	-	-	2+
	2	83	F	2	+	3+	2+	1+	2+	1+	-	-	2+
	3	88	F	3	-	3+	2+	1+	2+	1+	-	-	2+
	4	85	F	4	-	1+	3+	-	+/-	1+	-	-	2+
	5	92	F	4	-	3+	3+	1+	1+	-	-	-	2+
	6	97	F	4	+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	-	3+
	7	86	F	5	-	0	2+	-	1+	1+	-	-	2+
	8	91	F	6	-	3+	3+	-	-	1+	-	-	2+
	9	101	F	6	-	2+/3+	2+	1+	-	1+	-	-	1+
	10	89	F	8	-	3+	3+	-	1+	1+	-	-	3+
Control group Grupa kontrolna C ₁	1	57	F	1	-	2+	3+	1+	1+	2+	-	-	2+
	2	53	F	1	+	2+	3+	1+	-	1+	-	-	3+
	3	53	M	2	-	2+	2+	1+	1+	1+	-	-	3+
	4	49	F	3	-	0	3+	2+	1+	2+	-	-	3+
	5	55	M	4	-	1+	2+	2+	2+	1+	-	-	2+
	6	45	M	5	-	0	1+	3+	-	1+	1+	-	2+
	7	48	F	7	-	0	2+	1+	1+	3+	1+	-	2+
	8	50	M	12	-	1+	3+	-	-	1+	-	-	1+
C ₂	1	60	M	39	-	2+	2+	3+	-	2+	-	-	2+
	2	56	F	71	-	1+	1+	3+	-	-	-	-	2+
	3	60	M	3 yrs	-	2+	1+	-	-	1+	-	-	2+

ording to a 0 to 3+ score on the basis of disintegration of fibres, enlargement of the Virchow-Robin space and tissue rarefaction. The number of macrophages and leukocytes was determined. When myelin seemed to be poorly stained only in the semioval center, the staining was assessed 1+ in the score, when it appeared in the whole hemisphere, the staining was marked 3+.

Sections of the formalin-fixed brain were used for biochemical investigations. The material was washed several times in water at 4°C to remove formalin, dried on Whatman paper No 1 and weighed. White matter dry weight was determined using the gravimetric method. Myelin was separated by the method of Agrawal et al. (1974) in a VAC 601 ultracentrifuge in a discontinuous sucrose gradient. The separated fractions at sucrose concentrations of 0.32 M, 0.55 to 0.75 M and 0.85 M were washed in distilled water and weighed after centrifugation at 100 000 g. The purity of the fractions was determined by electron microscopy examination. Lipids were extracted from the fractions by the method of Folch et al. (1957). The total amount of lipids (Skipski et al. 1969), phospholipids (Bartlett 1959) and cerebrosides (Hess, Lewin 1965) were determined. Neutral lipids composition was analysed by thin-layer chromatography (Müller, Vahar-Matiar 1974). R_f values were compared to those of Sigma standards. The percentual composition of individual neutral lipids in myelin fractions was determined by planimetry of absorption curves at 560 nm in an ERJ-63 densitometr.

RESULTS

In morphological studies edema was more evident in the hemispheres with infarction as compared with the healthy ones (Fig. 1). Tissue necrosis was more pronounced in the controls, both in those with short survival time (C_1) as well as those who died a longer time after brain infarction (C_2). Poor myelin staining was noted in necrotic foci of the hemispheres with infarction and in "healthy" ones of all tested groups.

White dry matter weight values were lower in the hemispheres with infarction as compared with those in "healthy" hemispheres. This change seemed to be most pronounced in one of the control groups (C_2). The "healthy" hemispheres did not differ in dry weight from the two examined normals — N_1 , N_2 (Fig. 2). A lower amount of myelin in the senile healthy hemisphere as compared with the normal value (N_2) was observed (Fig. 2). In the hemisphere with infarction the decline in myelin content was more evident, however, only in one of the control group (C_1). The proportion of particular myelin fractions changed with age (Fig. 3). In healthy hemispheres of one of the control groups (C_1) the myelin fractions proportion was similar to that observed normally in advanced age (N_2). In the C_2 control group the proportion of myelin

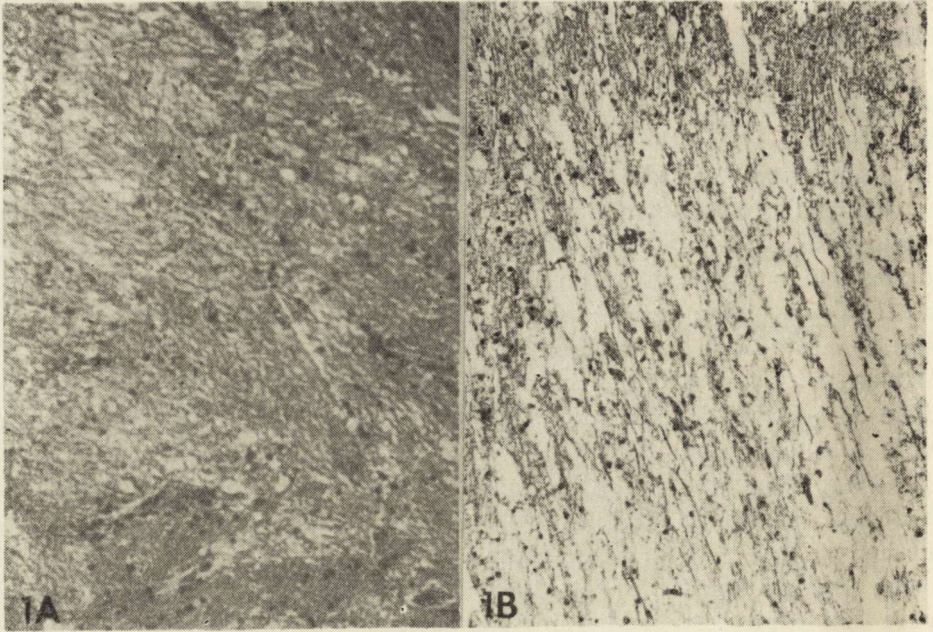


Fig. 1A—B. Brain edema of "healthy" hemisphere (1A) and of hemisphere with infarction (1B). H—E. $\times 30$

Ryc. 1A—B. Obrzęk mózgu w półkuli „zdrowej” (1A) i w półkuli z zawałem (1B). H—E Pow. $30\times$

"HEALTHY" HEMISPHERE HEMISPHERE WITH INFARCTION
 PÓŁKULA „ZDROWA” PÓŁKULA Z ZAWAŁEM

(% of dry weight)
 (% suchej wagi)

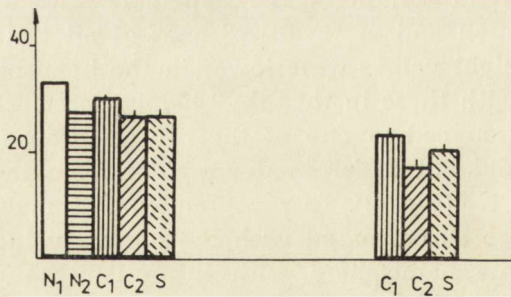


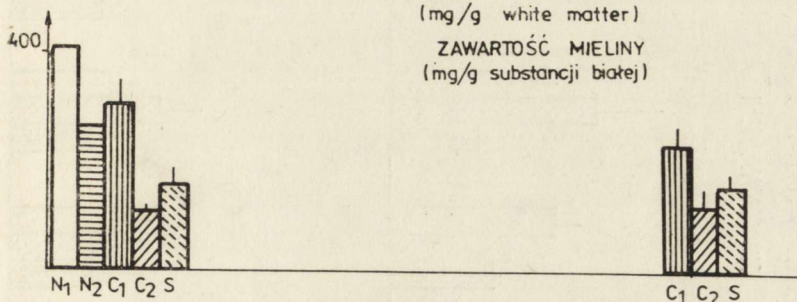
Fig. 2. Brain edema in the course of brain infarction. N₁ — normal value at the age of 51, N₂ — normal value at the age of 91, C₁ — controls with short survival time, C₂ — controls with long survival time, S — senile cases (short survival time)

Ryc. 2. Obrzęk mózgu w przebiegu zawału. N₁ — kontrola w wieku 51 lat, N₂ — kontrola w wieku 91 lat, C₁ — kontrola z krótkim czasem przeżycia, C₂ — kontrola z krótkim czasem przeżycia, S — przypadki starcze (krótki czas przeżycia)

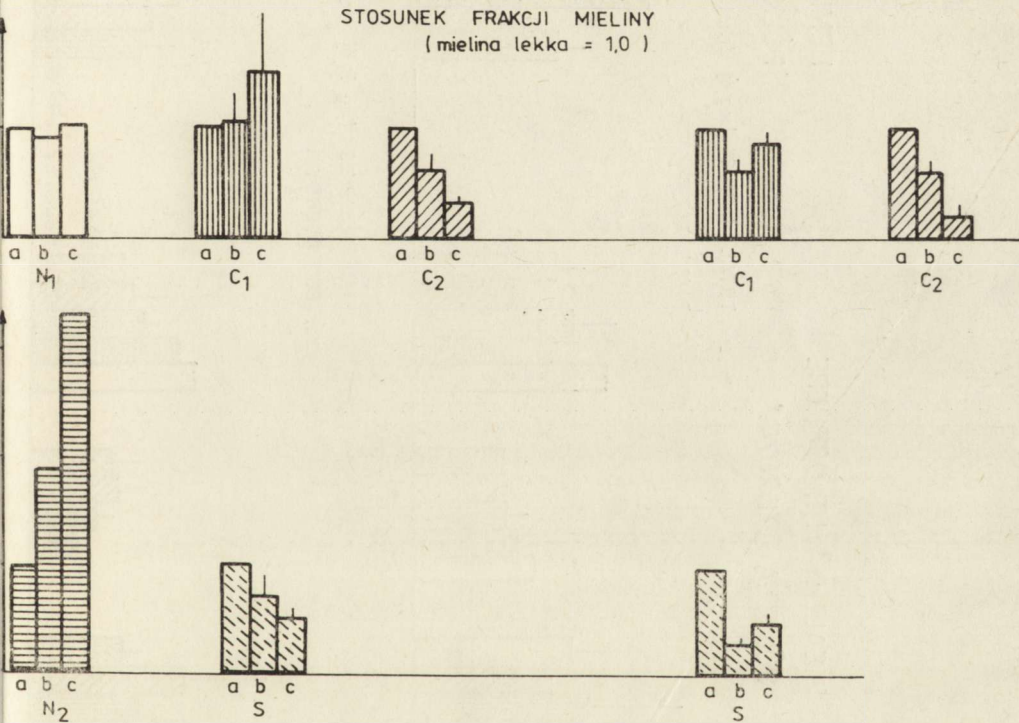
"HEALTHY" HEMISPHERE
PÓŁKULA „ZDROWA”

HEMISPHERE WITH INFARCTION
PÓŁKULA Z ZAWALEM

MYELIN CONTENT
(mg/g white matter)
ZAWARTOŚĆ MIELINY
(mg/g substancji białej)



PROPORTION OF MYELIN FRACTIONS
(light myelin = 1,0)
STOSUNEK FRAKCJI MIELINY
(mielina lekka = 1,0)



a - light myelin b - heavy myelin c - membrane fraction
a - mielina lekka b - mielina ciężka c - frakcja błonowa

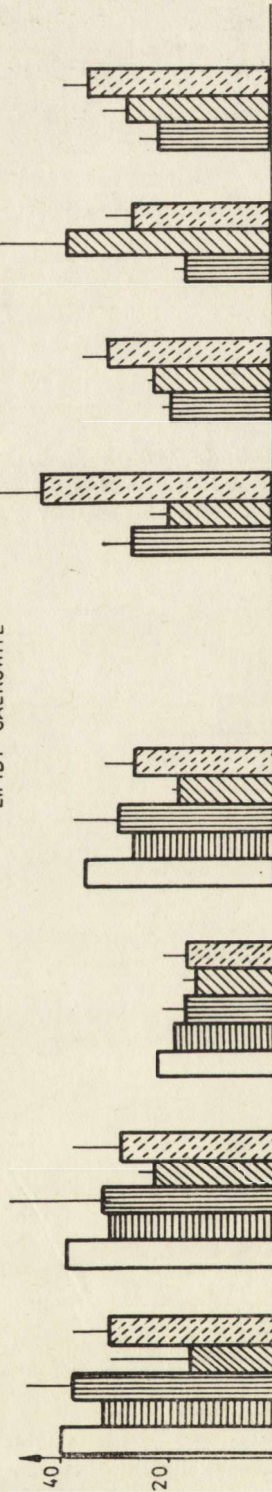
Fig. 3. Brain myelin content in the course of brain infarction. N₁ — normal value at the age of 51, N₂ — normal value at the age of 91, C₁ — controls with short survival time, C₂ — controls with long survival time, S — senile group with short survival time

Ryc. 3. Ilość mieliny w zawale mózgu. N₁ — kontrola w wieku 51 lat, N₂ — kontrola w wieku 91 lat, C₁ — kontrola z krótkim czasem przeżycia, C₂ — kontrola z długim czasem przeżycia, S — przypadki starcze (krótki czas przeżycia)

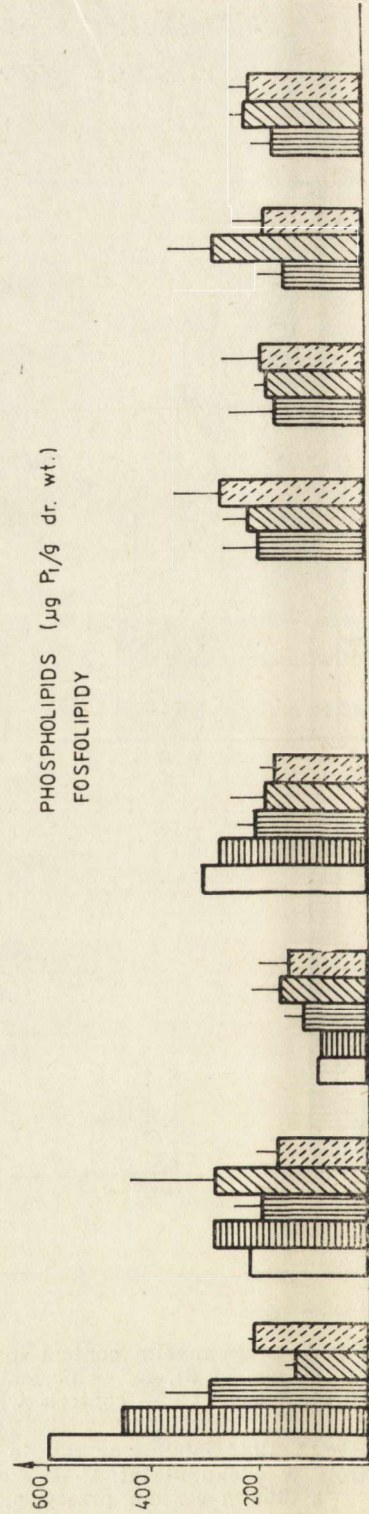
"HEALTHY" HEMISPHERE
PÓŁKULA "ZDROWA"

HEMISPHERE WITH INFARCTION
PÓŁKULA Z ZAWAŁEM

TOTAL LIPIDS (mg/g dr. wt.)
LIPIDY CAŁKOWITE



PHOSPHOLIPIDS ($\mu\text{g P}_1/\text{g dr. wt.}$)
FOSFOLIPIDY



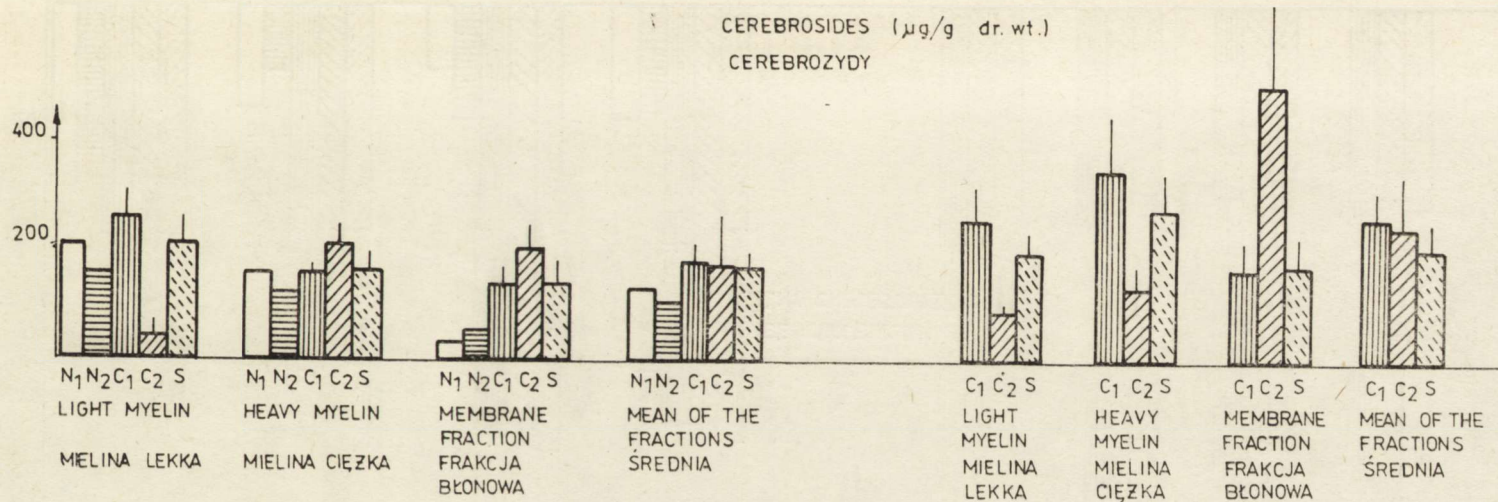
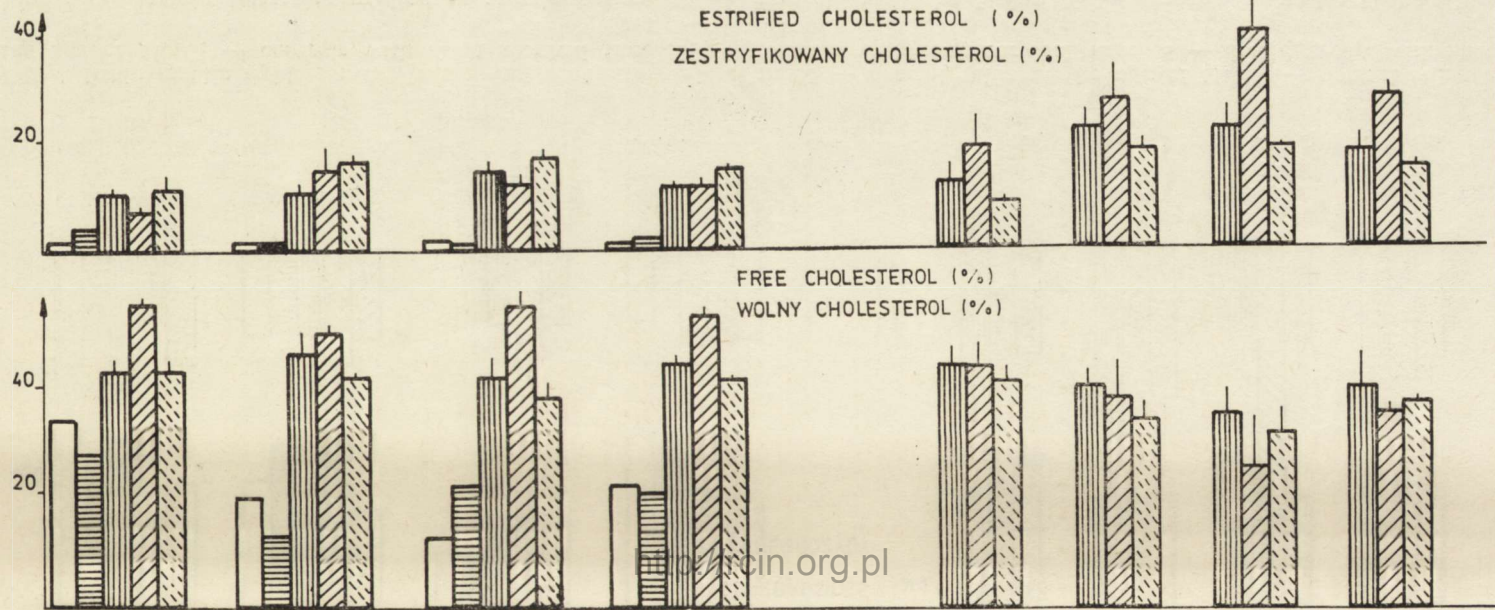


Fig. 4. Brain myelin lipids content in the course of brain infarction. N₁ — normal value at the age of 51, N₂ — normal value at the age of 91, C₁ — controls with short survival time, C₂ — controls with long survival time, S — senile group with short survival time

Ryc. 4. Zawartość tłuszczów mieliny w zawale mózgu. N₁ — kontrola w wieku 51 lat, N₂ — kontrola w wieku 91 lat, C₁ — kontrola z krótkim czasem przeżycia, C₂ — kontrola z długim czasem przeżycia, S — przypadki starcze (krótki czas przeżycia)

"HEALTHY" HEMISPHERE
PÓLKULA „ZDROWA”

HEMISPHERE WITH INFARCTION
PÓLKULA Z ZAWAŁEM



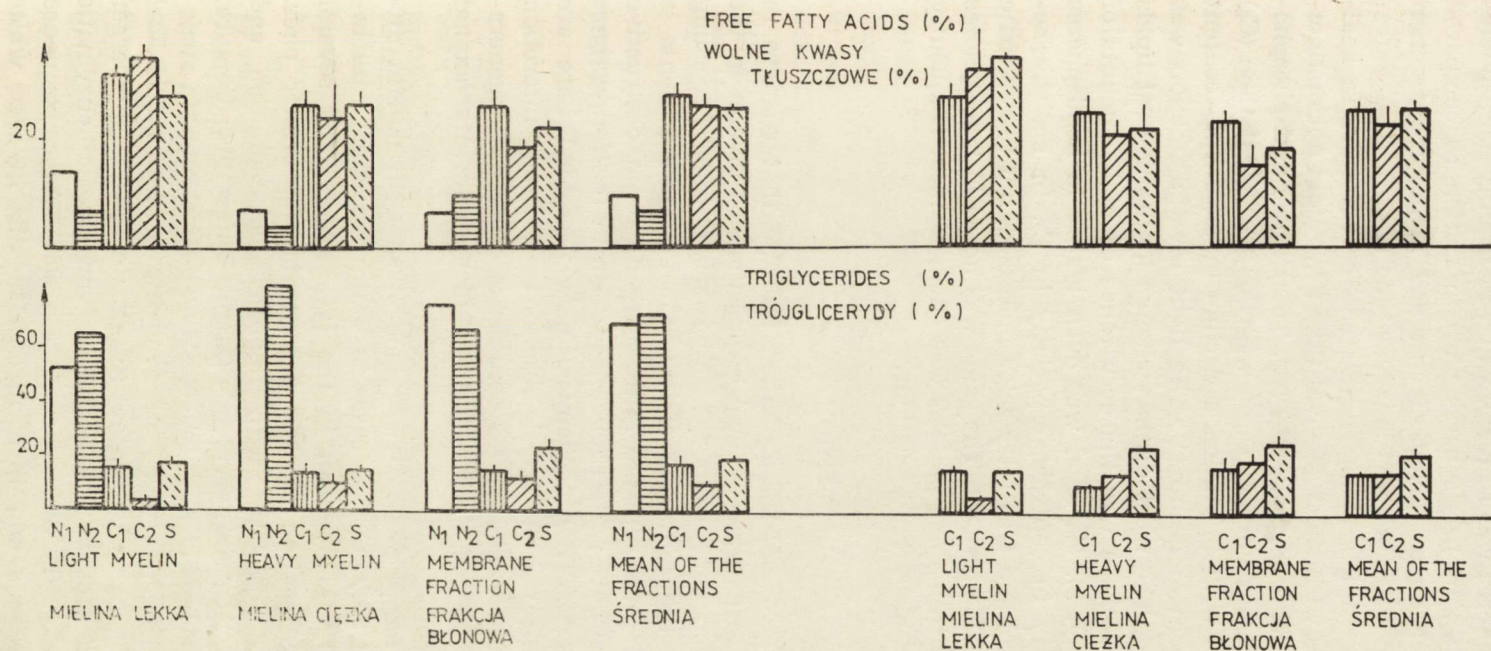


Fig. 5. Brain myelin neutral lipids pattern in course of brain infarction. N₁ — normal value at the age of 51, N₂ — normal value at the age of 91, C₁ — controls with short survival time, C₂ — controls with long survival time, S — senile group with short survival time

Ryc. 5. Tłuszcze obojętne mieliny w zawale mózgu. N₁ — kontrola w wieku 51 lat, N₂ — kontrola w wieku 91 lat, C₁ — kontrola z krótkim czasem przeżycia, C₂ — kontrola z długim czasem przeżycia, S — przypadki starcze (krótki czas przeżycia)

fractions in both hemispheres was similar to that in healthy hemispheres of aged human brain (S). In hemispheres with infarction as compared to healthy ones the decline of heavy myelin and membrane fraction was more pronounced in cases of short survival time (C_1 , S).

The total amounts of lipids, phospholipids and cerebrosides in healthy hemispheres in cases with short survival time (C_1 , S) did not distinctly change as compared with normals (N_1 , N_2). Total lipids and phospholipids content decreased, but only in cases with long survival time (C_2) (Fig. 4). In hemispheres with infarction a decline in total lipid content occurred only in the control group C_1 . The light myelin fraction was most frequently affected. The most distinct change in the neutral lipids pattern in healthy hemisphere was the occurrence of high amounts of esterified cholesterol (Fig. 5). Its level was even higher in hemispheres with infarction, but only in controls, especially in C_2 . In healthy hemispheres free cholesterol and free fatty acids increased, but the opposite was observed in triglyceride content. The same was noted in hemispheres with infarction. The neutral lipids pattern was changed most frequently in the heavy myelin and membrane fractions.

DISCUSSION

The results of the studies here presented indicate that changes in the morphological picture and biochemical composition of myelin in the course of brain infarction depend on age and survival time. According to clinical observation, the course of the disease in senile patients is milder than in younger ones. In the latter patients brain destructive changes occur rapidly and are more pronounced than in the former ones (Barcikowska-Litwin 1983). The biochemical data presented here are in good agreement with morphological observations. Brain infarction destroys white matter fibres, and causes occurrence of axonal degeneration with biochemical changes similar to those in experimental axonal degeneration (Norton 1977).

The age-dependent morphological and biochemical CNS myelin differences between senile and younger cases in brain infarction arise because of continued rapid metabolism in the latter cases, and several features of axonal degeneration already present in the former ones. Human brain aging is associated with lipofuscin accumulation and progressive reduction of RNA in nerve cells (Mann, Yates 1974; Uemura, Hartmann 1978) with changes in the nerve cells nuclear chromatin structure (Berkowitz et al. 1983), atrophy of dendritic processes (Scheibel et al. 1976), decrease of ganglioside content (Rahmann 1980; Higersberger et al. 1981), and changes of mitochondrial and microsomal enzymatic activities (Gaiti et al. 1980; Sitkiewicz et al. 1982). As consequence atrophy of nerve cell axons and their myelin sheaths in aged white

matter occurs (Himwich, Himwich 1957; Horrocks et al. 1975; Brunetti et al. 1983). A greater resistance of senile brain arises possibly from the fact, that in aged human brain biological and metabolic machinery operates more and more slowly. Therefore, brain function, cells membrane integrity and cellular structures are protected. The growing lack of active oxygen species in ischemic aged human brain (Flamm et al. 1977; Demopoulos et al. 1977) is also an important possible factor. Another factor may be a lower release of neurotransmitters capable of stimulating interactions. The positive influence of slowed down metabolic processes in brain infarction may be supported by the impact of barbiturates, limiting the infarction range (Yatsu et al. 1972; Smith et al. 1974; Michenfelder, Milde 1975). For all those reasons in the course of brain infarction in senile age, the first step of axonal degeneration observed consists in lipid-protein disruption (Adams, Tuquan 1961) and protein degradation, however, in younger cases noticeable lipid composition alterations are present.

Slowly progressing age-related changes in brain metabolism probably result from slower homeostasis in senile patients. For that reason suddenly occurring additional disturbances in the course of brain ischemia in senile patients are less harmful than in younger ones. The findings described in this paper require, however, further studies.

ACKNOWLEDGEMENT: This work was supported by the Medical School in Warsaw (No W 464). The authors wish to thank Professor I. Hausmanowa-Petrusewicz for her suggestions and critical reading of this paper.

MIELINA W MÓZGU Z ZAWAŁEM U PACJENTÓW W PODESZŁYM WIEKU

Streszczenie

Przeprowadzono korelacyjne badania morfologiczno-biochemiczne mieliny istoty białej półkul mózgowych u zmarłych z zawałem mózgu. Materiał stanowiło 10 przypadków w wieku 80—101 lat oraz 11 przypadków kontrolnych w wieku 45—60 lat. Badanie histopatologiczne wykazało martwicę i zblednięcie mieliny w półkuli z zawałem oraz drobne ogniska martwicy i zblednięcie mieliny, odpowiadające encefalopatii miażdżycowej w półkuli przeciwstronnej. We wszystkich przypadkach obrzęk był wyraźniejszy w półkuli z zawałem niż w półkuli „zdrowej”.

Badania biochemiczne wykazały spadek ilości mieliny w półkuli „zdrowej” grupy starszej i kontrolnej z długotrwałym przebiegiem. W grupie kontrolnej z krótkotrwałym przebiegiem stosunek frakcji mieliny w półkuli zdrowej był podobny do zmian w grupie starszej. W grupie kontrolnej o długotrwałym przebiegu stosunek frakcji mieliny był w obu półkulach podobny do starczych frakcji mieliny. Ekstrakcja lipidów z frakcji mieliny wykazała przede wszystkim ich zmniejszenie w grupie kontrolnej. Zawartość fosfolipidów była zmniejszona we wszystkich grupach. Ocena tłuszczów obojętnych wykazała znaczne zwiększenie ilości zestryfikowanego cholesterolu oraz zwiększenie ilości wolnego cholesterolu i wolnych kwasów tłuszczowych we wszystkich grupach. Trójglicerydy były obniżone.

Wyniki badań wskazują, że biochemiczny skład mieliny istoty białej mózgu u chorych z zawałem zależy od wieku oraz czasu przeżycia. W wieku starczym zmiany w zawartości lipidów mieliny i ich składzie są mniej wyraźne niż w wieku średnim, przy czym stwierdzono je zarówno w półkuli z zawałem, jak i w półkuli zdrowej. Badania morfologiczne i biochemiczne wykazały, że proces rozpadu mózgu przebiega w wieku starczym mniej gwałtownie niż w wieku średnim. Zmiany w mielinie wykazują podobieństwo do zmian opisywanych w zwyrodnieniu aksonalnym.

МИЕЛИН БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА В РАЗМЯГЧЕНИИ МОЗГА В СТАРЧЕСКОМ ВОЗРАСТЕ

Резюме

Авторы провели корреляционные морфологические и биохимические исследования миелина белого вещества мозга у умерших из-за инфаркта мозга. Материал содержал 10 случаев в возрасте 81—101 год и 11 контрольных случаев в возрасте с 45 по 60 лет. Гистопатологическое исследование обнаружило размягчение и побледнение миелина в полушарии с инфарктом. В противоположном, „здоровом” полушарии были небольшие очаги некроза, а побледнение миелина соответствовало субкортикальной артериосклеротической энцефалопатии. Отек был более отчетливый в полушариях с размягчением в сравнении со „здоровыми” полушариями.

Биохимические исследования показали понижение количества миелина в „здоровых” полушариях старческих случаев и контрольной группы с длинным течением болезни. В контрольных случаях с кратковременным течением болезни отношение миелиновых фракций в „здоровом” полушарии было похоже на сдвиги фракций в старческой группе. Фракции миелина в обоих полушариях длительно болеющих контрольных случаев были похожи на миелиновые фракции старческого возраста.

Экстракция липидов из фракции миелина показала понижение тотального их количества прежде всего в контрольных случаях. Содержание фосфолипидов было понижено во всех исследованных случаях. Исследование нейтральных липидов обнаружило значительное повышение этерифицированного холестерина, свободного холестерина и свободных жирных кислот во всех исследованных группах. Триглицериды были понижены.

Вышеизложенные данные свидетельствуют о том, что химический состав миелина белого вещества головного мозга зависит от возраста больных и длительности болезни.

В старческом возрасте сдвиги в содержании липидов миелина и их составе менее выражены, чем в среднем возрасте, причем эти сдвиги были обнаружены как в полушарии с инфарктом, так и в „здоровом” полушарии.

Морфологические и биохимические исследования показывают, что процесс распада в старческом возрасте менее интенсивный, чем в среднем возрасте. Биохимические изменения миелина напоминают аксиональное перерождение.

REFERENCES

1. Adams C. W. M., Tuquan N. A.: Histochemistry of myelin. I. Proteins and lipid-protein complexes in the normal sheath. *J. Neurochem.*, 1961, 6, 334—343.
2. Agrawal H. C., Trotter J. L., Burton R. M., Mitchell R. F.: Metabolic studies on myelin. Evidence for a precursor role of a myelin subfraction. *Biochem. J.*, 1974, 140, 99—109.
3. Barcikowska-Litwin M.: Morphological picture of brain infarctions in senile age (in Polish). Thesis. Medical School, Warsaw, 1983, 1—88.

4. Bartlett G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466—468.
5. Berkowitz E. M., Sanborn A. C., Vaughan D. W.: Chromatin structure in neuronal cell nuclei as a function of age. *J. Neurochem.*, 1983, 41, 516—523.
6. Berlet H. H., Ilzenhöfer H., Echtenacher B., Volk B.: Old age alterations in density of myelin isolated from human brain. In: *The aging brain. Physiological and pathophysiological aspects*. Ed. S. Hoyer. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1982, 167—174.
7. Brody H.: Cell counts in cerebral cortex and brain stem. In: *Aging. Alzheimer disease, senile dementia and related disorders*. Eds. R. Katzman, R. D. Terry, K. K. Bick. Raven Press, New York, 1978, 7, 345—353.
8. Brunetti M., Porcelatti G., Gaiti A., Calderini G., Teolato S., Toffano G.: Lipid changes during aging in central nervous system. In: *Molecular aspects of neurological disorders*. Eds. L. Austin, P. J. Jeffrey. Acad. Press, Sydney-New York-London, 1983. 311—320.
9. Demopoulos H., Flamm E., Seligman M., Power R., Pietronigro D., Ransohoff J.: Molecular pathology of lipids in CNS membranes. In: *Oxygen and physiological function*. Ed. FF. Jobsis. Professional Information Library, Dallas, Texas, 1977, 491—508.
10. Flamm E. S., Demopoulos H. B., Seligman M., Ransohoff I.: Possible molecular mechanisms of barbiturate mediated protection in regional cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.*, 1977, suppl. 64, 56, 150—151.
11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H.: A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—509.
12. Gaiti A., Brunetti M., Sitkiewicz D., Porcelatti G., Woelk H.: Lipid changes in aging brain. In: *Aging. Aging of the brain and dementia*. Eds: L. Amaducci, A. N. Davison, P. Antuano. Raven Press, New York, 1980, 13, 65—73.
13. Hess H. H., Lewin E.: Microassay of biochemical structural components in nervous tissue. II. Method for cerebrosides, proteolipid, proteins and residue proteins. *J. Neurochem.*, 1965, 12, 205—211.
14. Higersberger M. R., Budka H., Bernheimer H.: Changes in cortical ganglioside levels in the senile brain. *Gerontology*, 1981, 27, 105.
15. Himwich W. A., Himwich H. E.: Brain composition during the whole life span. *Geriatrics*, 1957, 1, 19—27.
16. Horrocks L. A., Sun G. Y., d'Amato R. A.: Changes in brain myelin during aging. In: *Neurobiology of aging*. Eds J. M. Ordry, K. R. Brizzee. Plenum Press, New York-London, 1975, 359—367.
17. Linte P., Brook H.: Loss of intracortical myelinated fibers: A distinctive age-related alterations in the human striate area. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1983, 61, 178—182.
18. Mann D. M., Yates P. O.: Lipoprotein pigments — their relationship to aging in the human nervous system. *Brain*, 1974, 97, 481—488.
19. Michenfelder J. D., Milde J. H.: Influence of anesthetics on metabolic, functional and pathological responses to cerebral ischemia. *Stroke*, 1975, 6, 405—410.
20. Müller J., Vahar-Matiar H.: Eine chromatografische Micromethode zur Bestimmung der Lipide in Liquor cerebrospinalis. *Z. Neurol.*, 1974, 206, 333—334.
21. Norton W. T.: Chemical pathology of diseases involving myelin. In: *Myelin*. Ed. P. Morell, Plenum Press, New York-London, 1977, 383—413.
22. Rahman M.: Gangliosides in the senescent rat brain. In: *Aging. Aging of the brain and dementia*. Eds.: L. Amaducci, A. N. Davison, P. Antuano. Raven Press, New York, 1980, 19, 75—79.

23. Raichle M. E.: The pathophysiology of brain ischemia. *Ann. Neurol.*, 1983, 13, 2—10.
24. Scheibel M. E., Lindsay R. D., Tomiyasu V., Scheibel A. B.: Progressive dendritic changes in aging human limbic system. *Exp. Neurol.*, 1976, 53, 420—430.
25. Sitkiewicz D., Skonieczna M., Rychła T., Gaździk D., Podymniak S., Bicz W.: Modification of brain mitochondrial enzymes by oxygen analogue of Ronnel at various stages of development and aging. *J. Neurochem.*, 1982, 41, 516—523.
26. Skipski W. P., Barclay M.; Thin-layer chromatography of lipids. In: *Methods in enzymology*. Eds: S. P. Colowick, H. O. Kaplan. Acad. Press, New York, 1969, 530—598.
27. Smith A. L., Hoff J. T., Nielsen S. L., Larson C. P.: Barbiturate protection in an acute cerebral ischemia. *Stroke*, 1974, 5, 1—7.
28. Uemura E., Hartmann H. A.: RNA content and volume of nerve cell bodies in Immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1978, 37, 487—496.
29. Yatsu F. M., Diamond I., Graziano C., Lindquist P.: Experimental brain ischemia: Protection from irreversible damage with rapid acting barbiturate (methohexital). *Stroke*, 1972, 3, 726—741.

Authors' address: Department of Neurology, Medical School, 4, Lindleya Str., 02-005 Warszawa.

MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, HALINA WEINRAUDER

GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN AND S100 PROTEIN IN ABNORMAL ASTROCYTES IN WILSON'S DISEASE

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

Wilson's disease, alongside with hepatogenic encephalopathies resulting from acquired liver damage and/or abnormal portal circulation are neuropathologically characterized by a dominant alteration of astrocytes. Therefore, both these clinical conditions are considered as primary gliopathies (Mossakowski 1966; Seitelberger 1970; Diemer 1978; Norenberg 1981). The leading feature of brain pathology in these cases are progressive astrocytic changes, taking the form of generalized proliferation and hypertrophy concomitant with regressive alterations expressed as non-specific degeneration of astrocytes. These non-specific changes are accompanied by special forms of abnormal astrocytes, which are considered as typical for both genetically-conditioned and acquired forms of hepatocerebral degeneration. These are Alzheimer cells type I and II and Opalski cells. Hitherto Alzheimer cells, type I were described exclusively in Wilson's disease while Opalski cells were observed both in hepatolenticular degeneration and in non-specific hepatogenic encephalopathies. Least specific are Alzheimer cells, type II. They were described not only in both forms of hepatocerebral degeneration but also in a number of other pathological conditions among them in severe cerebral ischemia (Maślińska, Oniszczuk 1970) and in acute infectious diseases of childhood (Opalski 1936).

The abundance and great variability of pathological astrocytic forms in both genetical and acquired hepato-cerebral degeneration, offer an unique opportunity to study their immunomorphological properties. Contrary to the profuse literature, concerning antigenic properties of astrocytes in normal conditions and in neoplastic proliferation (Bignami et al. 1972; Bignami, Dahl 1973, 1974; Antanitus et al. 1975; Bock et al. 1975, 1980; Weinrauder, Lach 1975, 1977; Martinez-Hernandez et al. 1977; Eng, Rubinstein 1978; De Armond et al. 1980 and others), data con-

cerning this aspect of hepatocerebral degeneration are scarce. The publications of Sobal et al. (1981) and Kimura and Budka (1984) are limited to problems of acquired hepatogenic encephalopathy, while Norenberg (1981) deals with experimental hepatic encephalopathy. The studies of Mossakowski and Weinrauder (1984) were performed under model conditions in tissue culture.

This inclined us to perform immunomorphological studies in a case of clinically, biochemically and neuropathologically verified Wilson's disease. Rabbit antisera to glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S100 protein were used.

MATERIAL AND METHODS

Studies were carried out on paraffin sections from a cerebral hemisphere, including frontal cortex, white matter and the anterior part of basal ganglia from a case of Wilson's disease, previously published by one of us (Mossakowski et al. 1964). The reason for publication was the atypical localization of tissue abnormalities, consisting in severe diffuse spongiosis of subcortical white matter with relatively slight involvement of basal ganglia. The surroundings of the large spongiotic focus contained numerous pathological glial forms, such as hypertrophied gemistocyte-like astrocytes, Alzheimer cells, type I and Opalski cells. They were found also in other grey structures, such as cerebral cortex and basal ganglia, and Opalski cells additionally in the white matter. In most grey structures abundant Alzheimer type II cells were present, alongside with hypertrophied and degenerated astrocytes, showing considerable fragmentation of their processes.

Immunohistochemical staining was performed according to the procedure described by Hsu and Raine (1981) and Hsu et al. (1981). Microtome sections, taken from 20-year-old paraffin blocks, were deparaffinized in toluene and absolute ethanol and then transferred through graded alcohol solutions to distilled water. Endogeneous peroxidase was blocked by 5-min immersion in 3% hydrogen peroxide in phosphate buffer, pH 7.2. After 5 min rinsing in the same buffer, the sections were subjected to 30-min incubation in normal goat serum, diluted 1:50. Both this and all other incubations were carried out at room temperature.

Antiserum to GFAP was diluted 1:100, and that against S100 protein — 1:200. Incubation in the respective sera lasted 60 min. Then the sections were rinsed for 10 min in phosphate buffer, pH 7.2. The next step consisted in incubation of sections in biotinylated goat anti-rabbit antiserum (1:200) (biotinylated goat antiserum, avidin and biotinylated peroxidase produced by Vector Laboratories, Burlingame, USA). Incubation time was 30 min. After short rinsing in phosphate buffer the sections were transferred for the next 30 min to the avidin-biotinylated

peroxidase complex, diluted 1:100. Rinsing in phosphate buffer preceded transfer of sections to TRIS-HCl buffer, pH 7.6 and 10-min incubation in 0.05% solution of diamine benzidine (in TRIS-HCl buffer) with addition of 0.01% H_2O_2 .

After several washings in distilled water, the sections were shortly counterstained in hematoxylin (10 sec) and, after rinsing with a tap water, they were dipped for 3 sec in a concentrated solution of lithium carbonate ($LiCO_3$) and again washed in water. The last step consisted in their dehydration in graded ethanol solutions and toluene and mounting with use of Eukitt medium.

RESULTS

The results obtained with the use of both immune sera were essentially similar, however, some differences in the immunomorphological picture justify their separate presentation.

Anti-GFAP serum

The most striking feature of the general picture of the cerebral cortex consisted in a concentration of strongly positive astrocytes in the molecular layer with a much less abundant astrocytic population in the intermediate ones. Numerous astrocytes appeared also in deep cortical layers (Fig. 1). Subpial astrocytes were hypertrophied, their perikarya and processes were densely filled with products of immunocytochemical reaction (Fig. 2). Astrocytes in deep cortical layers, some of them with evident features of hypertrophy, were characterized by considerable fragmentation of their processes. In many cases only their perikarya were stained. As a rule, perivascular rings of astrocytic sucker feet were visualized (Fig. 3). Astrocytes of edematous white matter were stained moderately. In most of them reaction products visualized only cellular perikarya with short residual processes (Fig. 4). Gemistocytes surrounding a large spongiotic focus within the subcortical white matter revealed a strong immunochemical reaction (Fig. 5). The most intense reaction characterized Opalski cells (Fig. 6). It was diffuse in nature and showed no relation with fibrillary cytoplasmic structures. The same was typical of what is called intermediate cells, which differ from Opalski cells by their smaller diameter and presence of residual processes. Alzheimer cells, type I were stained intensively (Fig. 7). Typical of them was uneven distribution of the reaction products in their cytoplasm. Most of the Alzheimer cells, type II did not show any reaction products around their sharply delineated nuclei (Fig. 8A). In some of them, however, a thin rim of brown cytoplasm was present (Fig. 8B).

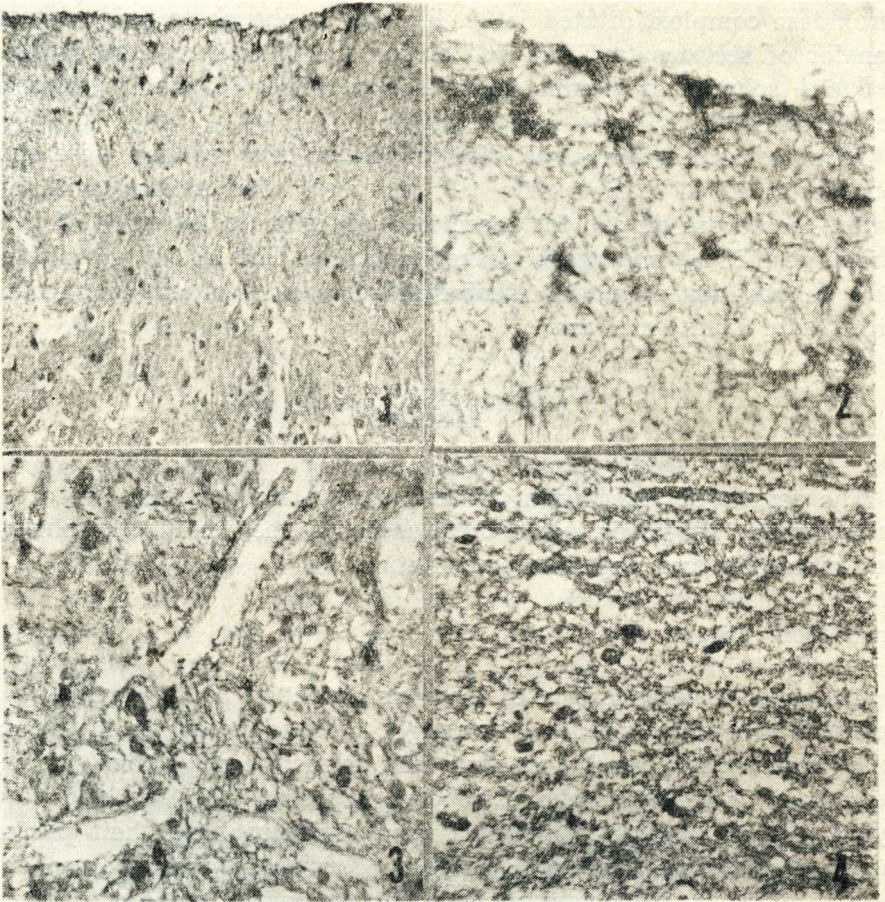


Fig. 1. GFAP. Cerebral cortex. Numerous positively stained astrocytes in the molecular layer and very scanty in the deeper ones. $\times 100$

Ryc. 1. GFAP. Kora mózgu. Widoczne liczne żywo dodatnie astrocyty w warstwie drobinowej i pojedyncze w warstwach głębokich. Pow. $100 \times$

Fig. 2. GFAP. Hypertrophied astrocytes in the molecular cortical layer with positive immunohistochemical reaction in perikarya and processes. $\times 400$

Ryc. 2. GFAP. Przerosłe astrocyty warstwy drobinowej kory z dodatnim odczynem immunohistochemicznym w perykarionach i wypustkach. Pow. $400 \times$

Fig. 3. GFAP. Astrocytes from deep cortical layer with features of klastodendrosis. Note intensive staining of perivascular processes. $\times 200$

Ryc. 3. GFAP. Astrocyty z cechami klastodendrozy w głębokiej warstwie kory mózgu. Zwraca uwagę zagęszczenie dodatnich wypustek okołonaczyniowych. Pow. $200 \times$

Fig. 4. GFAP. Scanty astrocytes of the white matter with fragmented processes displaying moderate immunohistochemical reaction. $\times 200$

Ryc. 4. GFAP. Skąpe astrocyty istoty białej mózgu z niewyraźnie zaznaczonymi wypustkami, wykazujące umiarkowany odczyn immunohistochemiczny. Pow. $200 \times$

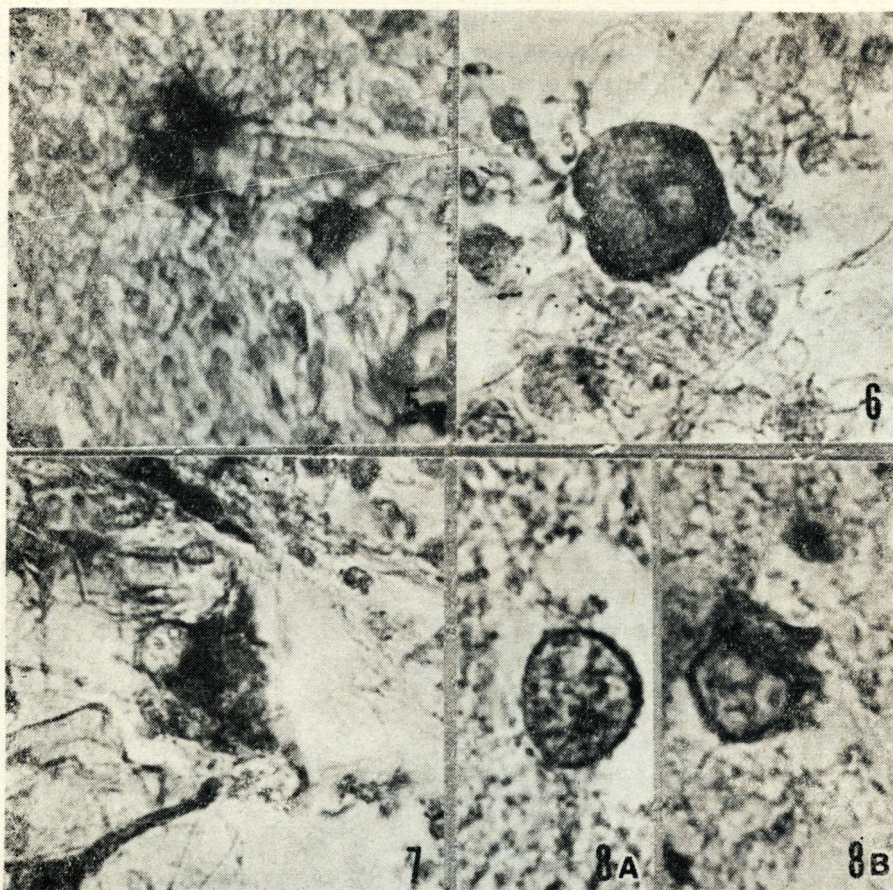


Fig. 5. GFAP. Gemistocytes with intense immunohistochemical reaction in the vicinity of spongiotic focus. $\times 400$

Ryc. 5. GFAP. Gemistocyty z intensywnym odczynem immunohistochemicznym w otoczeniu ogniska zgnębzenia tkanki. Pow. $400 \times$

Fig. 6. GFAP. Opalski cells with strong immunohistochemical reaction. $\times 400$

Ryc. 6. GFAP. Komórka Opalskiego z silnym odczynem immunohistochemicznym. Pow. $400 \times$

Fig. 7. GFAP. Alzheimer cell, type I. Note uneven distribution of the end product of immunohistochemical reaction. $\times 400$

Ryc. 7. GFAP. Komórka Alzheimerera typu I. Zwraca uwagę nierównomierny rozkład produktu odczynu immunohistochemicznego. Pow. $400 \times$

Fig. 8. GFAP. Alzheimer cells, type II. $\times 1000$. A. Negative immunohistochemical reaction; B. Showing narrow rim of positively stained cytoplasm

Ryc. 8. GFAP. Komórki Alzheimerera, typ II. Pow. $1000 \times$. A. Ujemny odczyn immunohistochemiczny; B. Wykazująca wąski rąbek zabarwionej cytoplazmy

Anti — S100 protein serum

A general impression of more intense immunohistochemical reaction was typical of sections, processed with anti-S100 protein serum, as compared with those for which anti-GFAP serum was used. This was mostly

due to the appearance of a positively stained fibrillary network in all structures of the central nervous system, not excluding foci of extensive tissue spongiosis. Different was also the distribution of stained astrocytes within the cerebral cortex. Astrocytes were evenly spread in all

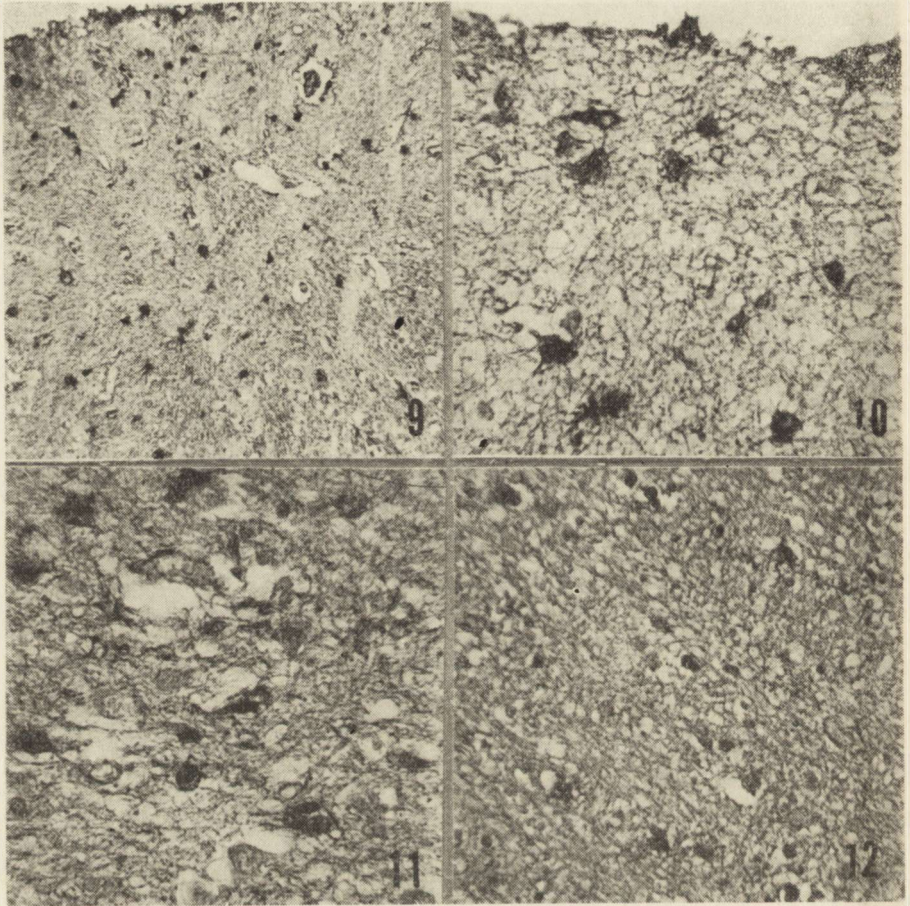


Fig. 9. S100. Cerebral cortex with evenly distributed astrocytes revealing positive immunostaining. $\times 100$

Ryc. 9. S100. Kora mózgu z równomiernie rozproszonymi astrocytami wykazującymi dodatni odczyn immunohistochemiczny. Pow. $100 \times$

Fig. 10. S100. Hypertrophied astrocytes of the molecular cortical layer, revealing strong immunohistochemical reaction in perikarya and processes. $\times 400$

Ryc. 10. S100. Przerośnięte astrocyty warstwy drobinowej kory z silnym odczynem immunohistochemicznym w cytoplazmie i wypustkach. Pow. $400 \times$

Fig. 11. S100. Astrocytes from deep cortical layer revealing features of klastodendrosis. $\times 400$

Ryc. 11. S100. Dodatnio wybarwione astrocyty głębokiej warstwy kory wykazujące cechy klastodendrozy. Pow. $400 \times$

Fig. 12. S100. White matter astrocytes with features of klastodendrosis revealing strong immunostaining. $\times 200$

Ryc. 12. S100. Astrocyty istoty białej mózgu z cechami fragmentacji wypustek. Pow. $200 \times$

cortical layers, without their condensation in the molecular layer (Fig. 9). Similarly as in the case of anti-GFAP serum, hypertrophied subpial astrocytes in the molecular layer accumulated abundant reaction products in their perikarya and processes (Fig. 10). Processes of damaged astrocytes in the remaining cortical layers were relatively well visuali-

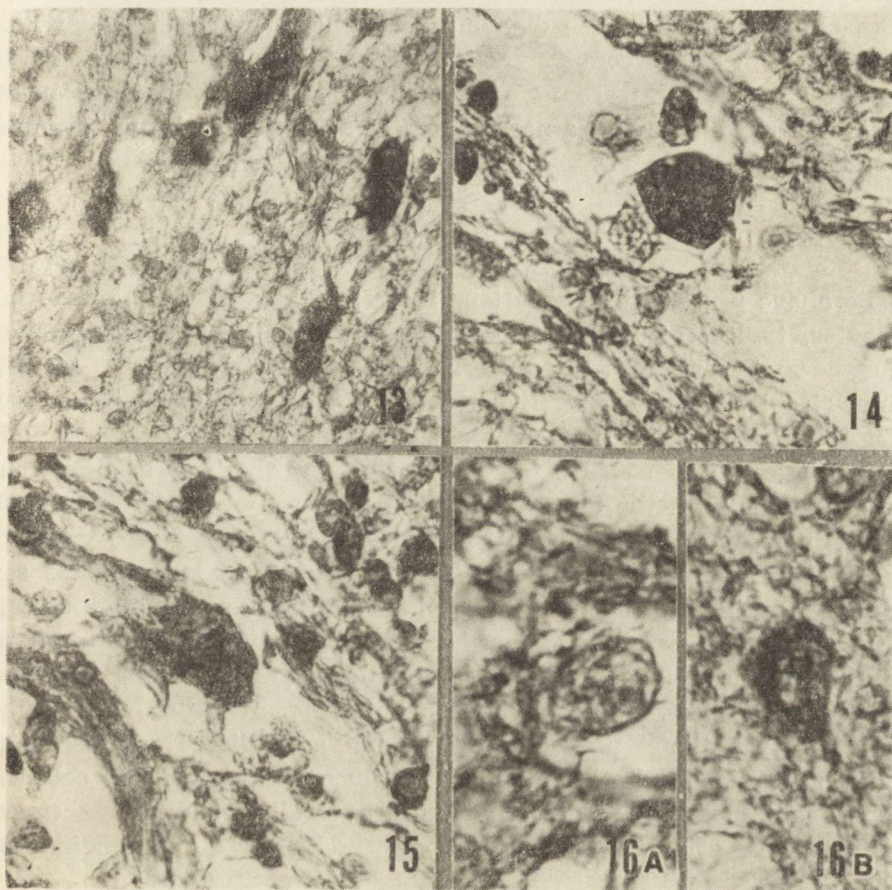


Fig. 13. S100. Gemistocytes from the surroundings of extensive tissue spongiosis, revealing strong immunohistochemical reaction. $\times 400$

Ryc. 13. S100. Gemistocyty z otoczenia ogniska zgąbczenia z bardzo silnym odczynem immunohistochemicznym. Pow. $400 \times$

Fig. 14. S100. Opalski cell with strong immunohistochemical reaction. $\times 400$

Ryc. 14. S100. Komórka Opalskiego z silnym odczynem immunohistochemicznym. Pow. $400 \times$

Fig. 15. S100. Alzheimer cell, type I with uneven distribution of end product of immunohistochemical reaction. $\times 400$

Ryc. 15. S100. Komórka Alzheimerera typu I z nierównomiernym rozkładem produktu końcowego reakcji immunohistochemicznej. Pow. $400 \times$

Fig. 16. S100. Alzheimer cells, type II. $\times 1000$. A. Negative immunohistochemical reaction; B. Surrounded by a rim of positively stained cytoplasm

Ryc. 16. S100. Komórka Alzheimerera typu II. Pow. $1000 \times$. A. Ujemny odczyn immunohistochemiczny; B. Otoczona pierścieniem dodatnio zabarwionej cytoplazmy

zed (Fig. 11). So were astrocytes in the edematous white matter, most of them showing features of advanced klastodendrosis (Fig. 12). Gemistocytic forms of astrocytes in the neighbourhood of focal spongiosis were deeply stained (Fig. 13). So were Opalski cells, localized both here and in the remaining areas of the brain (Fig. 14). Staining of Alzheimer cells, type I was less intense than that of Opalski cells. Like in the case of anti-GFAP serum, uneven distribution of the reaction products within their cytoplasm was a common feature (Fig. 15). In most instances Alzheimer cells, type II were negative (Fig. 16A). However, some naked nuclei were surrounded by a narrow rim of accumulated brown granules (Fig. 16B).

DISCUSSION

The above presented observations indicate that most of the abnormal astrocytes, typical of Wilsonian gliopathy, retain the antigenic properties of normal astroglia. This concerns both astrocytes revealing features of hypertrophy and non-specific degeneration as well as their morphologically modified forms such as Alzheimer type I and Opalski cells. The present observations confirm our previous data, obtained in tissue culture conditions with the use of sera from patients with Wilson's disease and the hyperammonemic form of hepatic coma (Mossakowski, Weinrauder 1984). In those studies anti-GFAP sera were used as well as sera containing antibodies against glutamine synthetase and glial antigen common for oligo- and astrocytes, described by Weinrauder and Lach (1975). The concordance of these results allows to assume that damaged and transformed astrocytes may retain not only antigenic, but also metabolic and functional properties of normal astroglia. The presence of specific astroglial markers both in naturally occurring Opalski cells and in those obtained in model tissue culture conditions confirms clearly their astrocytic origin, despite of some discussion concerning their histogenesis (Greenfield 1972).

The immunomorphological properties of Alzheimer cells, type II require a separate discussion. Despite their constant appearance in all cases of hepatocerebral pathology, both naturally occurring and evoked experimentally, Alzheimer cells, type II are also present in other types of cerebral lesions. In the examined case of Wilson's disease most Alzheimer type II cells did not show the presence of either GFAP and S100 protein. This is concordant with the observations of Sobel et al. (1981) and Kimura and Budka (1984). The constant lack of reaction with immune sera against GFAP inclined Sobel et al. (1981) to consider that transformation of protoplasmic astrocytes into Alzheimer cells, type II is connected with a reduced production of glial fibrillary acidic protein. In our material, however, in a small proportion of naked nuclei, a posi-

tive reaction with both specific astroglial antigens was found. It does not seem possible to explain this divergence by the fact that the studies of Sobel et al. (1981) were performed on material of acquired hepatic encephalopathy, while ours in a case of typical Wilson's disease. In our previous studies carried out in tissue culture conditions with the use of sera from patients both with Wilson's disease and hepatic coma, Alzheimer cells, type II consistently revealed a positive immunocytochemical reaction for specific astrocytic antigens. This took the form of a narrow rim of bright fluorescence surrounding enlarged cellular nuclei. The width of the latter ranged from hardly visible to a well defined ring of fluorescence.

The discordance of immunomorphological results can find explanation in the ultrastructure of Alzheimer cells, type II. As shown in electron microscope studies, carried out in cases of Wilson's disease (Anzil et al. 1974) and in natural (Martinez 1968; Foncin, Nicolaides 1970) and experimentally induced hepatic encephalopathy (Norenberg, Lapham 1974; Ostenda et al. 1976), Alzheimer cells type II correspond to enlarged astrocytic nuclei, surrounded by a narrow rim of cytoplasm, completely or almost completely devoid of any organelles. Transformation of normal or hypertrophied astrocytes to naked nuclei is a progressing process, different phases of which can be observed both in light microscopic and immunomorphological studies.

Another noteworthy question in our material is the immunomorphological picture of the white matter astrocytes, especially that with the use of anti-GFAP serum. According to the observations of Rubinstein et al. (1962) brain edema provokes a rapid fibrous astrocytic reaction. In this context a strong positive reaction with GFAP-antiserum could be expected in the edematous white matter. This was not the case in our material, in which fibrous white matter astrocytes, showing greatly advanced klastodendrosis gave a rather weak immunohistochemical reaction. This phenomenon may be possibly connected with astrocytic damage due to the primary pathological process. A reduced ability of fibre production by astrocytes was observed both in Wilson's disease (Mossakowski 1966) and in experimental hepatic encephalopathy (Diemer 1978; Norenberg 1981). Another possible explanation can be related with the chronic nature of brain edema in a case of Wilson's disease with extensive spongiosis of the white matter. It is well known that prolonged brain edema results in astrocytic lesions, expressed first of all by klastodendrosis (Klatzo 1967). This was the most common type of astrocytic pathology observed in our case. Concomitance of both mechanisms cannot be excluded.

A worth mentioning additional observation concerns the differences in distribution of cortical astrocytes when stained with both immunological sera. Anti-GFAP serum visualized mostly astrocytes in the mole-

cular and deeper cortical layers, while in the intermediate cortical layers the astrocytic population was hardly visible. In the reaction with S100 protein antiserum astrocytes were evenly distributed in all cortical layers. This corresponds to the differences observed in the cerebral cortex of normal experimental animals (Ludwin et al. 1976) and is probably connected with the fact that GFAP, although appearing in all types of astrocytes, is above all a specific marker of fibrillary ones (Eng et al. 1971; Bignami et al. 1972; Antanitus et al. 1975; Bock et al. 1975, 1980), while S100 protein is a more universal astrocytic antigen (Ludwin et al. 1976).

ACKNOWLEDGEMENT: The authors thank Dr. Roger Maunoury for kindly providing antisera and reagents for ABC test.

During printing of this publication, the paper of Kimura T. and Budka H.: Glial fibrillary acidic protein and S-100 protein in human hepatic encephalopathy: Immunocytochemical demonstration of dissociation of two glia-associated proteins, appeared in *Acta Neuropathologica Berl.*, 1986, 70, 17—21.

KWAŚNE WŁÓKIENKOWE BIAŁKO GLEJOWE ORAZ BIAŁKO S100 W PATOLOGICZNYCH POSTACIACH ASTROCYTÓW W CHOROBIE WILSONA

Streszczenie

Przeprowadzono badania immunomorfologiczne dotyczące zawartości kwaśnego białka włókienkowego (GFAP) i białka S100 w patologicznych postaciach astrocytów występujących w ośrodkowym układzie nerwowym w chorobie Wilsona. Wykazano, że zarówno hipertroficzne postaci astrocytów, jak i komórki z cechami zwyrodnienia zawierają swoiste antygeny glejowe. Różnią się jedynie intensywnością odczynu immunochemicznego. Szczególnie znaczne nasilenie osiąga on w gemistocytach otaczających ogniska rozpadu tkankowego, w komórkach Opalskiego, komórkach Alzheimerera typu I oraz w przerosłych astrocytach molekularnej warstwy kory mózgu. Cechą charakterystyczną komórek Alzheimerera typu I było nierównomierne rozmieszczenie produktu reakcji immunohistochemicznej w cytoplazmie. W większości komórek Alzheimerera typu II odczyn był negatywny zarówno w przypadku surowic odpornościowych anti-GFAP, jak i anti-S100. Tylko nieznaczna część ich populacji wykazywała dodatni odczyn przeciwko antygenom, ujawniający się w postaci wąskiego rąbka otaczającego nagie jądra. Różnice te zależą prawdopodobnie od stopnia uszkodzenia struktur cytoplazmatycznych komórek Alzheimerera typu II.

КИСЛЫЙ ФИБРИЛЛЯРНЫЙ БЕЛОК ГЛИИ И БЕЛОК S100 В ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ФОРМАХ АСТРОЦИТОВ В БОЛЕЗНИ ВИЛЬСОНА

Резюме

Проведены иммуноморфологические исследования содержания кислого фибриллярного белка (GFAP) и белка S100 в патологических формах астроцитов, выступающих в центральной нервной системе в болезни Вильсона. Показано, что как гипертрофические формы астроцитов, так и клетки с признаками дегенерации, содержат специфические антигены глии.

Они различаются только интенсивностью иммунологической реакции. Она особенно сильна в гемистоцитах окружающих очаги тканевого распада, в клетках Опальского, в клетках Альцгеймера типа I и в гипертрофических астроцитах молекулярного слоя мозговой коры. Характерной чертой клеток Альцгеймера типа I было неравномерное размещение продукта иммуногистохимической реакции в цитоплазме. В большинстве клеток Альцгеймера типа II не было реакции, как с сыворотками иммунитета против GFAP так и против S100. Незначительная только часть этих клеток проявляла положительную реакцию против антигенов, которая обнаруживалась в виде узкого рубчика, окружающего голые ядра. Эти различия зависят, вероятно, от степени нарушения цитоплазматических структур клеток Альцгеймера типа II.

REFERENCES

1. Antanitus W. S., Choi B. H., Lapham L. W.: Immunofluorescence staining of astrocytes *in vitro* using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.*, 1975, 89, 353—367.
2. Anzil A. P., Herrlinger H., Blinzinger K., Heldrich A.: Ultrastructure of brain and nerve biopsy tissue in Wilson disease. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 94—100.
3. Bignami A., Dahl D.: Differentiation of astrocytes in the newborn rats. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.*, 1973, 49, 393—402.
4. Bignami A., Dahl D.: Heterogenicity of glial fibrillary acidic protein in gliosed human brain. *J. Neurol. Sci.*, 1974, 23, 551—563.
5. Bignami A., Eng L. F., Dahl D., Uyeda C. T.: Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, 1972, 43, 429—435.
6. Bock E., Jörgensen O. S., Dittmann L., Eng L. F.: Determination of brain specific antigens in short-term cultivated astroglial cells and in rat synaptosomes. *J. Neurochem.*, 1975, 25, 867—870.
7. Bock E., Yavin Z., Jörgensen O. S., Yavin E.: Nervous system — specific proteins in developing rat cerebellar cells in culture. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 1297—1302.
8. De Armand S. J., Eng L. F., Rubinstein L. J.: The application of acidic glial (GFA) protein immunohistochemistry in neurooncology. *Pathol. Res. Pract.*, 1980, 168, 378—394.
9. Diemer N. H.: Glial and neuronal changes in experimental hepatic encephalopathy. *Acta neurol. Scand.*, 1978, suppl. 71, 58, 1—144.
10. Eng L. F., Rubinstein L. J.: Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, 26, 513—522.
11. Eng L. F., Vanderhaegen J. S., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351—354.
12. Foncin J. F., Nicolaidis S.: Encephalopathie porto-cave: Contribution a la pathologie ultrastructurale de la glie chez l'homme. *Rev. Neurol.*, 1970, 123, 81—87.
13. Greenfield J. G.: *Neuropathology*. Second Ed. Arnold, London 1972, pp. 179—180.
14. Hsu S. M., Raine L.: Protein A, avidin and biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, 29, 1349—1353.
15. Hsu S. M., Raine L., Fanger H.: The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 1981, 29, 577—580.
16. Kimura T., Budka H.: GFA and S100 proteins in degenerative and neoplastic

- glial diseases: A comparison by immunocytochemistry. Second European Conference for Neuropath. Warsaw, 20—22 Sept. 1984. Abstracts. p. 39.
17. Klatzo I.: Brain Edema. *J. Neuropath. exp Neurol.*, 1967, 26, 1—3.
 18. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase labelled antibodies. *J. comp. Neurol.*, 1976, 165, 179—208.
 19. Martinez A. J.: Electron microscopy of human hepatic encephalopathy. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1968, 11, 82—86.
 20. Martinez-Hernandez A., Bell K. P., Norenberg M. D.: Glutamin synthetase: glial localization in the brain. *Science*, 1977, 195, 1356—1358.
 21. Maślińska D., Oniszczyk J.: Uszkodzenie układu nerwowego płodu donoszonego w przypadku nagłej śmierci matki. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 417—422.
 22. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 231—304.
 23. Mossakowski M. J., Kasperek S., Rościszewska D.: Zwyródnienie wątrobowo-soczewkowe z przewagą uszkodzeń korowo-podkorowych. *Neuropat. Pol.*, 1964, 2, 145—165.
 24. Mossakowski M. J., Weinrauder H.: Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 161—178.
 25. Norenberg M. D.: The astrocyte in liver disease. In: *Advances in Cellular Neurobiology*. Eds. S. Fedoroff, L. Hertz. Vol. 2. Academic Press. New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco 1981, pp. 303—352.
 26. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response to experimental portal-systemic encephalopathy: an electron-microscopic study. *J. Neuropath. exp Neurol.*
 27. Opalski A.: Zur Endstehung der Alzheimerschen Gliazellen. *Bull. Acad. Pol. d. Sc. et d. Lett. Cl. d. Med.*, 1936, 1—2, 1—6.
 28. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—354.
 29. Rubinstein L. J., Klatzo I., Miquel J.: Histochemical observation on oxidative enzyme activity in glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. exp Neurol.*, 1962, 21, 116—128.
 30. Seitelberger F.: General neuropathology of central neuroglia: the concept of glial syndromes. *Proc. VI Intern. Congress Neuropath. Masson. Paris 1970*, 392—403.
 31. Sobel R. A., De Armand S. J., Forno L. S., Eng L. F.: Glial fibrillary acidic protein in hepatic encephalopathy. *J. Neuropath. exp Neurol.*, 1981, 40, 625—632.
 32. Weinrauder H., Lach B.: Immunofluorescence studies on the localization of the brain specific antigens in the central nervous system in rats. *Proc. VII Intern. Congress Neuropath. Eds.: S. Koernyey, G. Gostony. Exc. Med., Academiai Kiado. Amsterdam, Budapest 1975*, pp. 115—118.
 33. Weinrauder H., Lach B.: Localization of organspecific antigens in the nervous system of rat. *Acta Neuropath., (Berl.) 1977*, 39, 109—114.

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

TERESA ZALEWSKA, JERZY W. ŁAZAREWICZ

EFFECT OF CALCIUM ON PROTEIN SYNTHESIS IN RAT BRAIN POSTMITOCHONDRIAL FRACTION

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

Ischemia leads to a marked influx of calcium into brain cells, with concomitant increase of calcium ions activity in cytosol (Nicholson et al. 1977; Hansen, Zeuthen 1981; Harris et al. 1981). The elevated intracellular Ca^{2+} may disturb the cellular regulatory processes including Ca-calmodulin systems and this would result in the activation of lipolysis and proteolysis (Moskowitz et al. 1984; Zimmerman, Schlaepfer 1984a,b) and finally in irreversible cell damage (Łazarewicz et al. 1978a; Farber 1981; Hass 1981; Siesjö 1981).

To our knowledge, little attention has been paid to the effect of calcium ions on anabolic processes and particularly on protein biosynthesis in the central nervous system. The results of *in vitro* studies on brain slices and liver cell-free systems are controversial (Mase et al. 1962; Huttunen 1969; Vernie et al. 1972; Rao et al. 1974; Łazarewicz et al. 1978b). Data concerning the influence of Ca^{2+} on brain protein biosynthesis would be valuable for understanding the intracellular regulatory processes and particularly the mechanisms of the postulated Ca damage to ischemic brain cells.

Therefore, the aim of present experiments was to study the effect of calcium ions on the incorporation of L-[U- ^{14}C]-phenylalanine into proteins of the postmitochondrial fraction from normal rat brain.

MATERIAL AND METHODS

Tissue preparation. The brains of male Wistar rats weighing 250—300 g were removed immediately into ice-cold 0.25 M sucrose in medium „M” containing 20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 40 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 or 5 mM MgCl_2 and 6 mM β -mercaptoethanol. All subsequent procedures, as described by Kleihues et al. (1975b) were carried out at 4°C. The brains

were homogenized by hand in 3 vol (v/w) of the medium with a standard teflon/glass homogenizer. After centrifugation for 10 min at 10 000 g, the postmitochondrial supernatant was passed down a column of Sephadex G-25, equilibrated and eluted with medium „M”. This procedure removes most of the endogenous free amino acids. Fractions of 1.5 ml were collected and the five with the highest extinction at 260 nm were pooled and diluted with medium „M” so that the final concentration of

Protein synthesis in vitro. The assay mixture contained 5 mM ATP,

Protein synthesis in vitro. The assay mixture contained 5 mM ATP, 0.1 mM GTP, 20 μ M solution of each of 19 L-amino acids (except phenylalanine), 0.01 μ Ci (370 Bq) of 0.1 μ M L-[U-¹⁴C]-phenylalanine, 450 μ g creatine phosphate, 24 μ g creatine kinase (EC 2.7.3.2) in 200 μ l of medium „M”. pH was adjusted to 7.5 using 1 M KOH. The activity of calcium ions was maintained constant with the Ca-EGTA buffer system as described by Katz et. al. (1970). Assay mixtures were preincubated for 5 min at 37°C before addition of 300 μ l of postmitochondrial supernatant. After 20 min of incubation at 37°C, reactions were terminated by addition of 3 ml of cold 5% TCA containing 0.1 unlabeled phenylalanine. Samples were left overnight at 4°C and the precipitates were extracted with 5% TCA at 75°C for 15 min, washed at room temperature with 5% TCA, twice with ethanol-ether (3:1, v/v) and ether. After solubilization by NCS the radioactivity of the protein fraction was estimated in 10 ml of a conventional toluene scintillator. The counting efficiency was about 80%. The blank values, obtained for reactions stopped at zero time, were subtracted.

Proteolytic activity. For estimation of protein degradation in the cell-free system the proteins were prelabeled either during *in vitro* incubation or *in vivo*, prior to separation of the postmitochondrial supernatant fraction. The labeling *in vitro* with L-[U-¹⁴C]-phenylalanine was performed exactly as described above for estimation of protein biosynthesis, under optimal conditions (at 10 mM MgCl₂). The *in vivo* labeling was carried out by the intraperitoneal injection of 250 μ Ci (9.25 MBq) D-[U-¹⁴C]-glucose per kg body weight. After 20 h rat brain postmitochondrial supernatant was isolated, prepared for experiments as described above and incubated without radioactive amino acid. In both cases proteolytic activity measurements were initiated by administration of Ca-EGTA buffers maintaining the desired Ca²⁺ concentrations, and cycloheximide (200 μ g per ml) which was shown in control experiments to inhibit completely amino acid incorporation into proteins. The incubation was continued for 20 min at 37°C, then the reaction was terminated and proteins were extracted for radioactivity measurements exactly as described above.

Materials. GTP and creatine phosphate were obtained from Reanal (Hungary). ATP, calmodulin, chlorpromazine, creatine phosphokinase,

ethylene glycol-bis- β -aminoethyl ether/ N,N' -tetraacetic acid (EGTA) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA). Sephadex G-25 was obtained from Pharmacia (Uppsala, Sweden). L-[U- 14 C]-phenylalanine, specific activity 512 mCi (18.9 GBq) per mmol, G-[U- 14 C]-glucose, 292 mCi (10.8 GBq) per mmol, and NCS tissue solubilizer from the Radiochemical Centre, Amersham, U. K. The labeled phenylalanine was diluted with unlabeled amino acid carrier to give a specific radioactivity of 44 mCi (1.63 GBq) per mol. Other reagents were AR grade. Isolation and incubation media were prepared in glass-redistilled water.

RESULTS

In initial experiments the optimal conditions for *in vitro* protein synthesis were examined. The maximum incorporation of L-[U- 14 C]-phenylalanine occurred at 10 mM Mg^{2+} . At 7.5 mM $MgCl_2$ it was somewhat lower, but in the presence of 5 mM Mg^{2+} the labeling of protein was decreased by 50%.

The effect of Ca^{2+} in concentrations of 10 μ M to 1 mM on protein synthesis in the rat brain postmitochondrial supernatant fraction (Fig. 1A,B) appeared to be dependent on the Mg^{2+} concentration in the incubation medium. In the presence of 5 mM Mg^{2+} , the incorporation of L-[14 C]-phenylalanine into newly synthesized proteins increased with rising Ca^{2+} concentrations. The maximum incorporation was observed at 500 μ M Ca^{2+} (Fig. 1 A). However, the level of protein radioactivity reached under these conditions was still lower by 40% than that obtained in the presence of 10 mM Mg^{2+} . Higher Ca^{2+} concentrations (750 μ M and 1000 μ M) had no significant effect on the amino acid incorporation.

In the presence of 10 mM Mg^{2+} (Fig. 1 B), amino acid incorporation was significantly inhibited by Ca^{2+} in a concentration-dependent manner. The inhibition of protein synthesis increased from 7% to 70% with the rise of Ca^{2+} from 10 μ M to 1 mM.

In order to test whether the observed calcium effects were calmodulin-dependent, some amino acid incorporation experiments were performed in a calmodulin-enriched system or in the presence of chlorpromazine — an inhibitor of calmodulin activity (Nelson et al. 1983).

The results of Table 1 demonstrate a lack of any further effects of calmodulin and its inhibitor on the inhibition of protein synthesis by calcium.

The possible contribution of Ca-dependent protein degradation in the observed phenomena has been evaluated. For this purpose the postmitochondrial fraction, with proteins prelabeled *in vitro* or *in vivo* was submitted to incubation under conditions identical as in amino acid incorporation experiments with corresponding Ca^{2+} concentrations (Fig. 2). To avoid reincorporation of liberated amino acids into protein, cyclo-

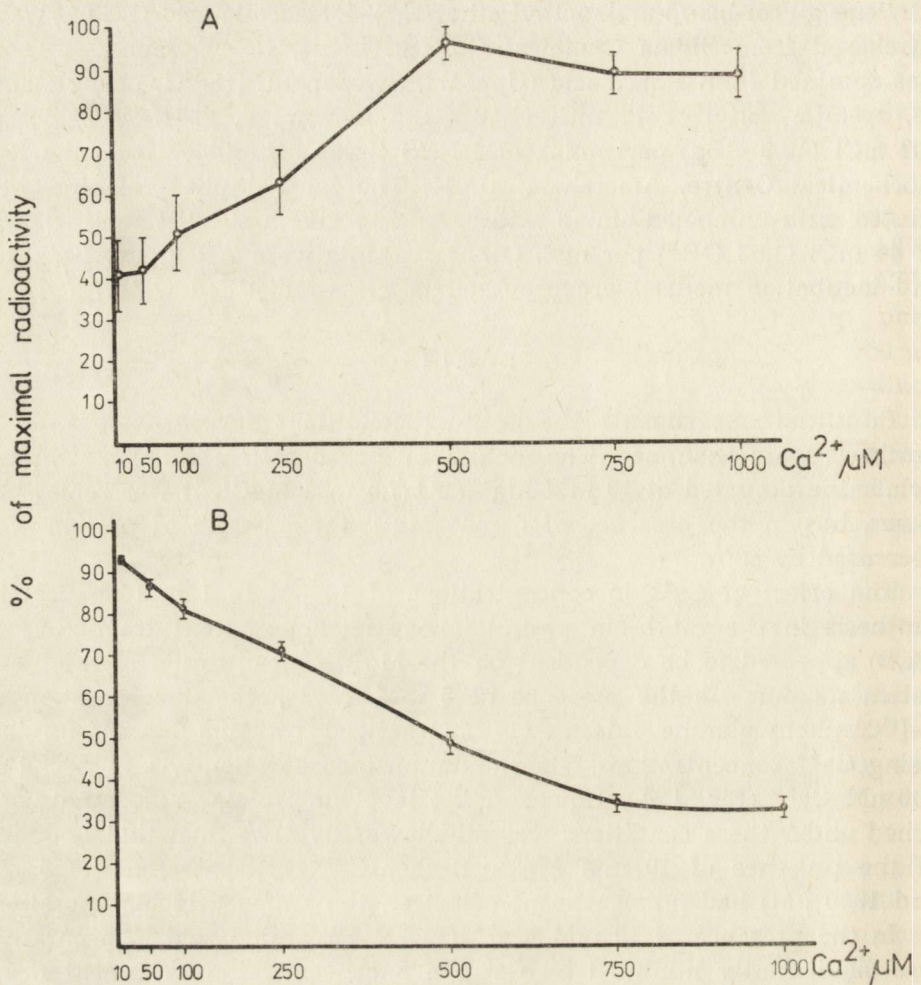


Fig. 1. Effect of calcium on *in vitro* incorporation of L-[¹⁴C]-phenylalanine into protein in the presence of 5 mM or 10 mM Mg^{2+} . Protein synthesis was measured for 20 min at 37°C with a postmitochondrial supernatant prepared and incubated in the presence of 5 mM Mg^{2+} (A) or 10 mM Mg^{2+} (B). Incubation and protein extraction conditions, as described in Material and Methods section. Results are expressed as per cent of maximal incorporation in each individual experiment. Mean of 5 independent experiments \pm SEM

Ryc. 1. Wpływ wapnia na wbudowywanie *in vitro* L-[¹⁴C] fenyloalaniny do białek w obecności 5 mM i 10 mM Mg^{2+} . Syntezę białek mierzono w czasie 20 min przy 37°C, stosując supernatant postmitochondrialny otrzymywany i inkubowany w obecności 5 mM Mg^{2+} (A) lub 10 mM Mg^{2+} (B). Warunki inkubacji i ekstrakcji białek jak opisano w Materiale i Metodach. Wyniki wyrażono w procentach maksymalnego wbudowywania w danym eksperymencie. Średnie arytmetyczne z 5 niezależnych doświadczeń \pm standardowy błąd średniej

heximide was added in concentrations completely inhibiting protein biosynthesis. The results presented in Fig. 2 clearly show that the proteolytic activity including that of the Ca-dependent proteinase remains undetectable when measured by digestion of the radioactive substrate.

Table 1. Effect of calmodulin and chlorpromazine on the calcium-evoked inhibition of L-[U 14 C]-phenylalanine incorporation by the postmitochondrial supernatant fraction

Tabela 1. Wpływ kalmodyliny i chlorpromazyny na wywołaną przez wapń inhibicję wbudowywania L-[U 14 C] fenyloalaniny do białek frakcji postmitochondrialnej

	14 C incorporation into protein % of control Wbudowywanie 14 C do białek % kontroli
Calmodulin	100.1±8.0
Chlorpromazine	98.6±7.5
10 μ M Ca $^{2+}$	75.2±6.2
10 μ M + calmodulin	72.5±8.0
1000 μ M Ca $^{2+}$	20.1±3.1
1000 μ M + calmodulin	20.5±2.6
1000 μ M + chlorpromazine	26.4±0.9

Protein synthesis was estimated at 10 mM Mg $^{2+}$ in the presence of calmodulin — 5 μ g per 0.5-ml sample, 10 $^{-5}$ M chlorpromazine and Ca $^{2+}$ — buffered by EGTA — 10 $^{-5}$ and 10 $^{-3}$ M. Results represent means \pm S.E.M. of 3 experiments. Effects of modulators tested are statistically insignificant ($p > 0.05$).

Biosyntezę białka badano przy 10 mM stężeniu Mg $^{2+}$ w mieszaninie inkubacyjnej, w obecność kalmodyliny — 5 μ g na próbę objętości 0.5 ml chlorpromazyny 10 $^{-5}$ M i jonów wapnia buforowanego przez EGTA w stężeniach 10 $^{-5}$ M i 10 $^{-3}$ M. Wyniki są średnimi \pm standardowy błąd średniej z 3 doświadczeń. Wpływ zastosowanych modulatorów nie był znamieny statystycznie ($p > 0.05$).

DISCUSSION

The role of Ca $^{2+}$ in regulation of protein biosynthesis in the central nervous system is not clear, as the published results are often contradictory and both stimulation (Gordon, Lippmann, 1967) and inhibition (Huttunen 1969, 1973; Rao et al. 1974) of protein synthesis by Ca $^{2+}$ have been reported. This discrepancy may have resulted from significant differences in experimental conditions, since both tissue slices and a cell-free system were used and the ionic composition of incubation media varied considerably. In the present experiments the effect of Ca $^{2+}$ on protein synthesis in the postmitochondrial supernatant fraction from intact rat brain was studied. The use of the ATP regenerating system and Ca $^{2+}$ /EGTA buffers in the incubation medium guaranteed constant levels of both factors.

Magnesium is an obligatory component of protein biosynthesis. Our results confirm the findings reported by Vernie et al. (1972) that the maximum incorporation of amino acids occurs in the presence of 10 mM magnesium. Since the activating effects of Mg $^{2+}$ on many enzymatic processes are often antagonized by Ca $^{2+}$ (Bianchi 1968), the supposition that a decrease of the cellular Mg $^{2+}$ -to-Ca $^{2+}$ ratio could lead to inhibi-

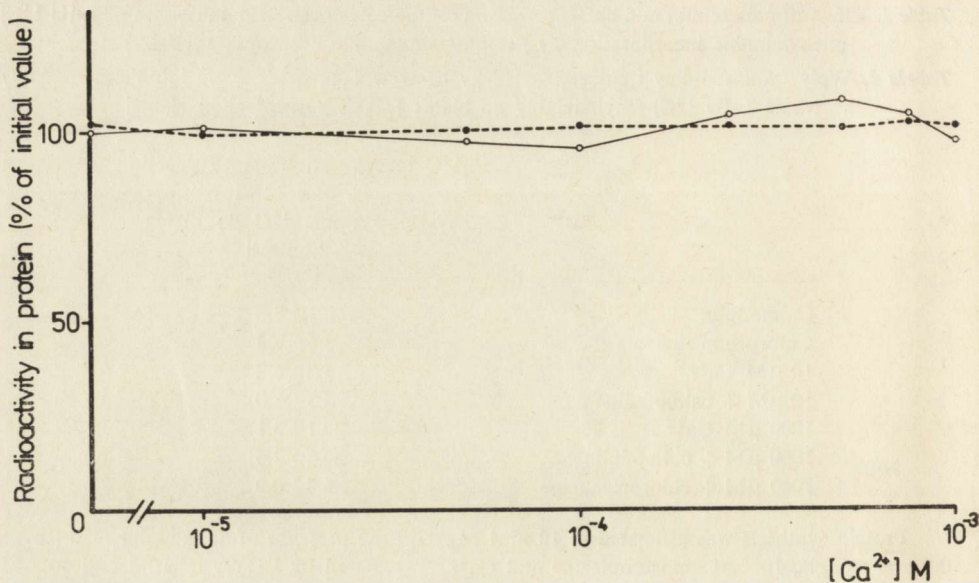


Fig. 2. Radioactivity remaining in proteins of pre-labeled rat brain post-mitochondrial fraction after incubation with different calcium concentrations. Post-mitochondrial supernatants pre-labeled *in vivo* (solid line) or *in vitro* (broken line) as described in Methods were incubated for 20 min at 37°C in the presence of cycloheximide (40 µg per 200 µl samples). The radioactivity remaining in protein is expressed in per cent of initial radioactivity of the fraction. Means of 5 individual experiments. S.E.M. did not exceed 5%

Ryc. 2. Poziom radioaktywności w wyznakowanych białkach frakcji post-mitochondrialnej mózgu szczura po inkubacji różnymi stężeniami wapnia. Białka frakcji post-mitochondrialnej znakowane *in vivo* (linia ciągła) lub *in vitro* (linia przerywana) jak opisano w Metodach, inkubowano 20 min w temp. 37°C w obecności cykloheksymidu (40 µg na próbę o objętości 200 µl). Poziom radioaktywności białek po inkubacji wyrażono w procentach radioaktywności wyjściowej. Średnie arytmetyczne z 5 doświadczeń. Standardowy błąd średniej nie przekraczał 5%

tion of protein synthesis seemed rational. Therefore, in the present studies different concentrations of Ca²⁺ buffered with EGTA were applied to the incubation system containing two different magnesium concentrations. The obtained results showed a bidirectional effect of Ca²⁺ on L-[U-¹⁴C]-phenylalanine incorporation, depending on Mg²⁺ concentration. A stimulatory effect of Ca²⁺ was observed in the presence of a suboptimal Mg²⁺ concentration, but at 10 mM Mg²⁺ a distinct inhibition by calcium developed.

Since at 5 mM Mg²⁺ there was a significant decline in the incorporation as compared with optimal conditions, the stimulatory effect of Ca²⁺ indicates that certain combinations of Mg²⁺ plus Ca²⁺ were superior to suboptimal Mg²⁺ tested alone. This conclusion is in agreement with the finding reported by Vernie et al. (1972) that the breakdown of liver free polyribosomes at Mg²⁺ concentrations lower than 7 mM was counteracted by calcium.

At optimal, 10 mM Mg^{2+} the labeling of proteins declined markedly with the increase of Ca^{2+} concentration. Lack of any effect of calmodulin or calmodulin inhibitor — chlorpromazine added to the incubation mixture may suggest that calmodulin does not mediate the calcium-evoked inhibition of protein labeling.

When discussing the mechanisms of the described calcium effect, it is important to consider the possibility that calcium ions may predominantly activate brain neutral protease (Zimmerman, Schlaepfer 1984a,b). Consequently the observed drop in protein labeling would reflect accelerated breakdown rather than inhibited protein biosynthesis. However, in the light of the presented lack of any detectable proteolytic activity in our system, the possible interference of calcium-dependent proteolysis with the observed phenomena must be ruled out. The stimulatory effect of Ca on amino acid incorporation at sub-optimal Mg^{2+} concentration also points to the lack of any contribution of Ca-dependent proteolysis to the Ca-evoked drop in specific radioactivity of proteins. Therefore, the direct influence of Ca on protein synthesis is the most likely interpretation of the observed phenomena.

The site of calcium interference with the protein biosynthesis mechanism in a cell-free system is not clear; competition with magnesium seems to be the most probable. This suggestion is supported by data showing that the inhibitory effect of Ca^{2+} on tRNA aminoacylation can be overcome by increasing Mg^{2+} concentrations (Rao et al. 1974). Aminoacylation of tRNA is not the only step of protein synthesis dependent on Mg^{2+} and, therefore, potentially susceptible to inhibition by Ca^{2+} . The possibility may be considered that Ca^{2+} influences the rate of both polypeptide chain initiation and elongation.

The present results showed the sensitivity of the protein biosynthetic system to an increased Ca^{2+} level. The physiological role of this effect is unclear, since the calcium levels required to inhibit protein biosynthesis exceed physiological concentrations of the divalent cation in cytosol by 2 to 4 orders of magnitude. However, the disturbances in brain energy metabolism involved in cerebral ischemia may lead to a rapid elevation of calcium ions concentration in the cytosol to a toxic level (Siesjö 1981; Johansen et al. 1984). Theoretically, such an increase can arise both by release of Ca^{2+} from intracellular stores (Łazarewicz et al. 1972, 1975) and by influx from the extracellular environment (Nicholson et al. 1977; Harris et al. 1981; Hansen, Zeuthen 1981). The level of free Ca^{2+} ions in the cytosol under ischemia possibly increased to $10^{-4}M$ seems to be sufficient to inhibit amino acid incorporation.

The contribution of the effect of calcium to changes in brain protein biosynthesis known to accompany ischemia is uncertain. During ischemia cerebral protein biosynthesis, which is a process completely dependent on energy supply ceases within the first minutes of depletion of

energy-rich substrates. However, in the course of recirculation dissociation in the recovery of energy metabolism and protein synthesis was observed: energy metabolism returned to the control values within a few minutes (Ljunggren et al. 1974), whereas postischemic protein synthesis remained severely impaired for an extended period of time (Kleihues et al. 1975a). Furthermore, post-ischemic inhibition of protein synthesis with disaggregation of polysomes, develops after the onset of recirculation rather than during the ischemic period (Cooper et al. 1977). These data suggest that the observed suppression of polypeptide synthesis might be attributed to some other factors than reduction of the energy state only. Calcium seems to be good candidate for such a factor involved in the inhibition of protein synthesis, since the intracellular Ca level became significantly elevated after a long recirculation period (Yanagihara, McCall 1982).

In the light of the above findings, the conclusion that Ca^{2+} can be responsible for the later alterations of polysome profiles developing during the recirculation period does not seem to be unlikely, but it requires more through experimental verification. Correlative evaluation of energy-rich compounds, electrolyte contents and protein synthesis under the same experimental conditions may be helpful.

ACKNOWLEDGEMENTS: This work was supported by the Polish Academy of Sciences within the project 10.4.

Technical assistance by Mrs T. Czechmańska and Mr M. Brzozowski is appreciated.

WPLYW WAPNIA NA BIOSYNTEZĘ BIAŁKA WE FRAKCJI POSTMITOCHONDRIALNEJ MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Przebadano wbudowywanie *in vitro* L-[U- ^{14}C]-fenyloalaniny do białek frakcji postmitochondrialnej mózgu szczura przy różnych stężeniach magnezu i wapnia.

Jony wapnia wprowadzone do medium inkubacyjnego z 10 mg Mg^{2+} (optymalne stężenie dla procesu biosyntezy) obniżały wbudowywanie aminokwasu do białek. Wykluczono udział w tym efekcie protezy aktywowanej przez wapń. Wraz ze wzrostem stężenia wapnia (buforowanego EGTA) od 10 μM do 1 mM obserwowano narastanie inhibicji biosyntezy odpowiednio od 7 do 70%. Natomiast w obecności 5 mM Mg^{2+} jony wapnia w stężeniach 10 μM do 500 μM stymulowały wbudowywanie aminokwasu.

Nie stwierdzono wpływu egzogennej kalmoduliny oraz jej inhibitora chloropromazyny na wywołaną przez wapń inhibicję biosyntezy białka. Uzyskane wyniki wskazują na bezpośredni wpływ jonów wapnia, które w zależności od zastosowanych stężeń magnezu współzawodniczą z nim lub uzupełniają pulę kationów dwuwartościowych, niezbędnych dla biosyntezy.

ВЛИЯНИЕ КАЛЬЦИЯ НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА
В ПОСТМИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ МОЗГА КРЫСЫ

Резюме

Исследована инкорпорация *in vitro* L-[U-¹⁴C] фенилаланина в белки постмитохондриальной фракции мозга крысы в различных концентрациях магния и кальция.

Ионы кальция введенные в инкубационную среду с 10 mM Mg²⁺ (оптимальная концентрация для процесса биосинтеза) уменьшали инкорпорацию аминокислоты в белки. Участие в этом эффекте активированной кальцием протеазы было исключено. Наряду с увеличением концентрации кальция (буфорированного EGTA) с 10 μM до 1 mM наблюдалось увеличение ингибции биосинтеза соответственно с 7 по 70%. Однако, в присутствии 5 mM Mg²⁺ ионы кальция в концентрациях 10 μM 500 μM стимулировали инкорпорацию аминокислоты. Не обнаружено влияния экзогенного кальмодулина и его ингибитора-хлоропромазина на вызванное кальцием замедление биосинтеза белка. Результаты указывают на непосредственное влияние ионов кальция, которые, в зависимости от употребленных концентрации магния, либо конкурируют с ним или дополняют состав двувалентных катионов, необходимых для биосинтеза.

REFERENCES

1. Bianchi C. P.: Cell Calcium, Butterworths, London, 1968, 12.
2. Cooper H. K., Zalewska T., Kawakami S., Hossmann K.-A., Kleihues P.: The effect of ischaemia and recirculation on protein synthesis in the rat brain. *J. Neurochem.*, 1977, 28, 929—934.
3. Farber J. L.: The role of calcium in cell death. *Life Sci.*, 1981, 29, 1289—1295.
4. Gordon J., Lipmann F.: Role of divalent ions on poly U-directed phenylalanine polymerization. *J. Mol. Biol.*, 1967, 23, 23—33.
5. Hansen A. J., Zeuthen T.: Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol. Scand.*, 1981, 113, 437—445.
6. Harris R. J., Symon L., Branston N. M., Bayhan M.: Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1981, 1, 203—209.
7. Hass W.: Beyond cerebral blood flow, metabolism, and ischemic threshold. Examination of the role of calcium in the initiation of cerebral infarction. In: *Cerebral Vascular Disease. Proceed. of the 10th Salzburg Conference on Cerebral Vascular Disease.* Eds. J. S. Meyer, H. Lechner, M. Reivich, O. E. Ott, A. Arabinar, Excerpta Medica, Amsterdam, 1981, vol. 3, 3—17.
8. Huttunen M. O.: Protein and ribonucleic acid metabolism in rat brain cortex slices. Thesis, Helsinki, 1969.
9. Huttunen M. O.: General model for the molecular events in synapses during learning. *Persp. Biol. Med.*, 1973, 17, 103—108.
10. Johansen F. F., Jørgensen M. B., Ekström von Lubitz D. K. J., Diemer N. H.: Selective dendrite damage in hippocampal CA, stratum radiatum with unchanged axon ultrastructure and glutamate uptake after transient cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.*, 1984, 291, 373—377.
11. Katz A. M., Repke D. J., Ushew J. E., Polascik M. A.: Characterization of dog cardiac microsomes. Use of zonal centrifugation to fractionate fragmented

- sarcoplasmic reticulum, Na⁺, K⁺ activated ATPase and mitochondrial fragments. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 205, 473—490.
12. Kleihues P., Hossman K.-A., Pegg A. E., Kobayashi K., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after one hour complete ischemia. Indications of metabolic recovery. *Brain Res.*, 1975a, 95, 61—73.
 13. Kleihues P., Margison J. M., Margison G. P.: Bimethyl-nitrosamine-induced inhibition of hepatic protein synthesis *in vitro* and the effect of pretreatment with cystamine or pregnolone-16-carbonitrile. *Cancer Res.*, 1975b, 35, 3667—3672.
 14. Łazarewicz J. W., Strosznajder J., Gromek A.: Effects of ischemia and exogenous fatty acids on the energy metabolism in brain mitochondria. *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 1972, 20, 599—606.
 15. Łazarewicz J. W., Strosznajder J., Dąbrowiecki Z.: Effects of cerebral ischemia on calcium transport in isolated brain mitochondria. *Proceed. 7th Intern. Congress Neuropath.* Eds. S. Környey, S. Tariska, G. Goszlonyi. *Excerpta Medica Amsterdam, Akademiai Kiado, Budapest*, 1975, vol. 2, 605—608.
 16. Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. In: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension.* Eds. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh, Polish Medical Publishers, Warsaw 1978a, 79—86.
 17. Łazarewicz J. W., Zalewska T., Haljamäe H., Hamberger A.: Effect of calcium on brain metabolism *in vitro*. *Neurochem. Res.*, 1978b, 3, 683—698.
 18. Ljunggren B., Ratcheson R. A., Siesjö B.: Cerebral metabolic state following complete compression ischemia. *Brain Res.*, 1974, 73, 291—307.
 19. Mase K., Takahashi Y., Ogata K.: The incorporation of ¹⁴C-glycine into the protein of guinea pig brain cortex slices. *J. Neurochem.*, 1962, 9, 281—288.
 20. Moskowitz M., Schook W., Puszkin S.: Regulation of endogenous calcium-dependent synaptic membrane phospholipase A₂. *Brain Res.*, 1984, 290, 273—280.
 21. Nelson G. A., Andrews M. L., Karnovsky M. J.: Control of erythrocyte shape by calmodulin. *J. Cell. Biol.*, 1983, 96, 730—735.
 22. Nicholson C., ten Bruggencate G., Steinberg R., Stöckle H.: Calcium modulation in brain extracellular microenvironment demonstrated with ion-sensitive micropipette. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 1977, 74, 1287—1290.
 23. Rao K. N., De Smet M., Howells J., Bygrave F. L.: Inhibition by calcium of tRNA aminoacylation in preparation from rat liver. *FEBS Lett.*, 1974, 41, 185—188.
 24. Siesjö B.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1981, 1, 155—185.
 25. Vernie L. N., Bont W. S., Emmelot P.: Differences in Mg²⁺ and Ca²⁺ dependence of amino acid incorporation by free and membrane-bound polyribosomes isolated from liver and an effect of the hepatocarcinogen dimethylnitrosamine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 281, 253—262.
 26. Yanagihara T., McCall J. T.: Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci.*, 1982, 30, 1921—1925.
 27. Zimmerman U.-J. P., Schlaepfer W. W.: Calcium-activated neutral protease (CANP) in brain and other tissues. *Progress in Neurobiol.*, 1984a, 23, 63—78.
 28. Zimmerman U.-J. P., Schlaepfer W. W.: Multiple forms of Ca-activated protease from rat brain acid muscle. *J. Biol. Chem.*, 1984b, 259, 3210—3218.

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

KRYSTYNA RENKAWEK, ELŻBIETA KIDA

ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS IN RAT STRIATUM
IN VITRO INDUCED BY SERA FROM PATIENTS
WITH HUNTINGTON'S DISEASE

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

Neuropathological observations of *post mortem* material of patients with Huntington's disease (HD) revealed damage of neurons in the striatum and functionally related structures like cortex or hypothalamus (Roizin et al. 1976; Forno, Norville 1979). The neuronal degeneration is usually followed by astrocytic proliferation, however, a morphometric study of Lange et al. (1976) showed that in the striatum of HD patients the number of the glia cells was markedly reduced. These findings allow to suppose that death of a certain type of neuronal cell and astrocyte could be linked to a common factor or mechanism acting on the cell structure or on neuroglial interaction.

One of the possible pathogenic mechanism of HD is considered to be of immunological or infectious origin. The immunological study with sera from HD patients performed by Husby et al. (1976) has documented the existence of antineuronal antibodies in a large group of HD patients. This prompted us to investigate an effect of sera from HD patients on striatum being a target structure affected in the brain of patients with Huntington's disease. As in the previous work with kainic acid (Matyja, Renkawek 1983), organotypic cultures of rat striatum were used for experiments that allowed a direct action of damaging compounds on the cell structure or their metabolism.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures were prepared from newborn Wistar rats striata. The tissue was aseptically dissected and cut in 1-2 mm sections (explants). Single explants were placed on collagen-coated glass coverslips and maintained in Maximow assemblies at 36.0-36.5°C. Nutrient

medium, renewed twice weekly, consisted of 30% human serum, 60% balanced salt solution, 10% embryo saline extract, glucose to a final concentration of 600 mg% and penicillin (100 units/ml of medium). The pH of the medium ranged from 7.0—7.2.

From the 4th day *in vitro* in the nutrient medium human serum from healthy individuals was replaced by the same quantity of serum from 2 different HD patients. The cultures growing in the experimental media, renewed twice weekly, were fixed after 3, 10 and 17 days of exposure to HD patients sera. To compare the effect of sera on the structure of striatum *in vitro*, one group of 4-day-old cultures was exposed to serum from patients with Parkinson's disease for 7 and 14 days. Control cultures were grown simultaneously in the standard medium.

The cultures were examined under the light microscope, and at the appropriate time intervals fixed in 10% formalin, stained with cresyl violet or processed for electron microscopy. Control cultures at the same age were treated likewise. For electron microscopy the cultures were briefly rinsed in Locke solution at room temperature, then fixed for 1/2 h at 4°C with 1.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2. They were rinsed for 1 h in cacodylate buffer, pH 7.2, fixed for 1 h in 2% osmium tetroxide, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and then immersed in propylene oxide. The cultures were embedded in Epon and cut on LKB ultramicrotome. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEM electron microscope.

RESULTS

Under the light microscope, in all experimental groups after a short (3 days) or longer period (17 days) exposed to HD patients sera there were any clear differences of the outgrowth and morphology as compared to the control cultures.

The ultrastructural examination of the control cultures of rat striatum revealed the presence of different types of neurons and synapses in the explanted tissue and glia cells both in the explants and in the outgrowth zone. Most of the neurons were differentiated into small, medium, and large types, although, numerous intermediate forms were also present (Fig. 1). In the explants, between the cell bodies of neurons and glia a dense network of cell processes was seen. In the cultures of 4 days *in vitro* (DIV) there were numerous immature synaptic contacts. On the following days *in vitro* in the striatum, continuing synapses maturation together with neuronal cell differentiation was present. Most of the synapses were of the symmetrical type containing clear, round vesicles, sometimes single dense core vesicles were also found. In the

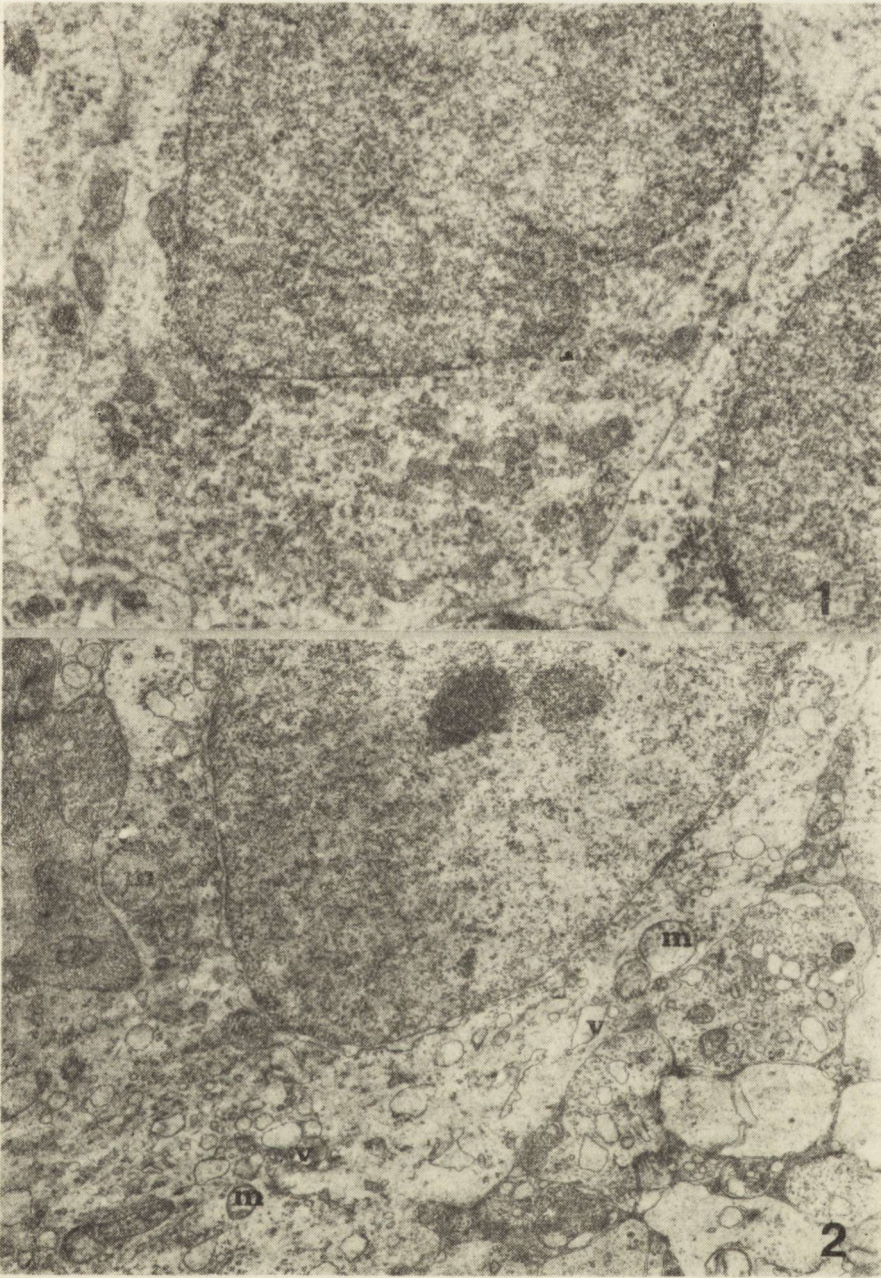


Fig. 1. Control cultures of 7 DIV striatum. Medium size neuron. $\times 18\ 000$

Ryc. 1. Hodowla siedmiodniowa prążkowiec. Kontrola. Średni neurocyt. Pow. $18\ 000 \times$

Fig. 2. Medium size neuron, 3 days after HD serum. Degenerative and edematous changes of mitochondria (M) and vacuolization of the cytoplasm (V). $\times 18\ 000$

Ryc. 2. Średni neurocyt prążkowiec, 3 dni po podaniu surowicy od chorego z chorobą Huntingtona (HD). Zmiany zwyrodnieniowe i obrzęk mitochondriów (M) oraz wodniczki w cytoplazmie (V). Pow. $18\ 000 \times$

explants the axosomatic, axodendritic and axospiny synapses were seen in a different proportion in particular cultures.

The glia cells represented astrocytes of the protoplasmic type, numerous oligodendrocytes and glial cells being at the different stage of their development.

After treatment with sera from HD patients, electron micrographs demonstrated several features of cell reaction which distinguished them from the control cultures. A characteristic morphological feature of the cell lesion was the both degenerative and edematous appearance of the cell somata, mainly developed in the glia cells, but also seen in a certain type of neurons. In the neurons, first pathological changes were observed after 3 days of HD patients sera treatment. A number of medium size neurons undergoing severe degeneration was found. In their cytoplasm there was a great amount of microvesicles, vacuoles and damaged

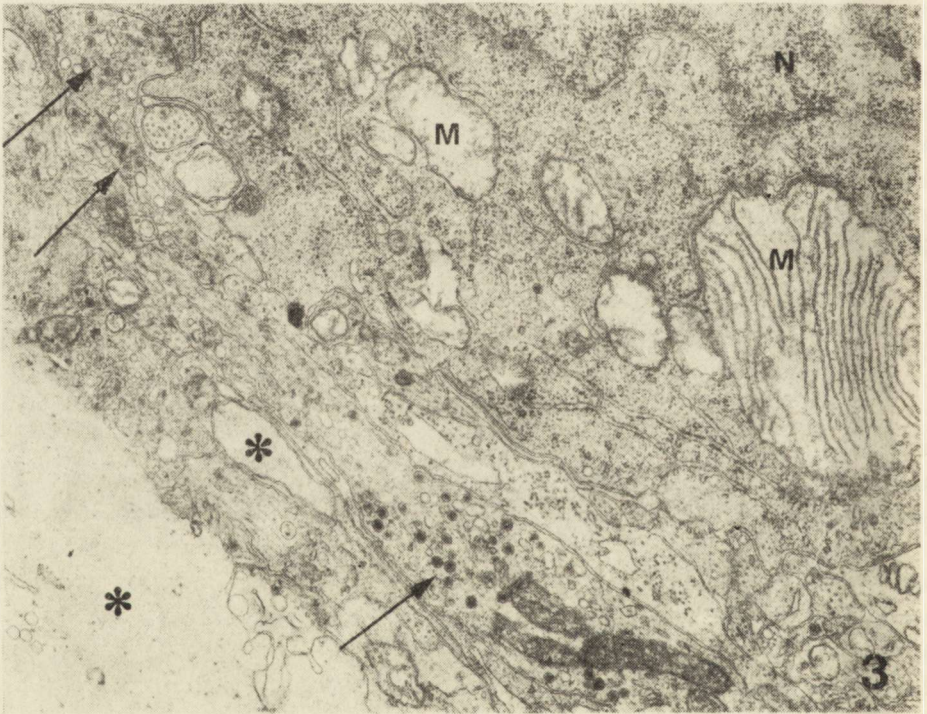


Fig. 3. Large neuron with invaginated nuclear membrane (N), small and big mitochondria with damaged cristae (M). Accumulation of dense core vesicles in the neuronal processes (arrow). Intensive edematous changes of cell cytoplasm and processes probably medium size neurons (asterisk). Seventeen days after HS serum. $\times 18\ 000$

Ryc. 3. Duży neurocyt prądkowia zawierający jądro o głęboko sfalowanej otoczce jądrowej oraz różnej wielkości mitochondria z uszkodzonymi grzebieniami (M). Nagromadzenie pęcherzyków z elektronowo-gęstym rdzeniem w wypustce neuronalnej (strzałka). Zaawansowane zmiany obrzękowe cytoplazmy i wypustek komórki nerwowej typu średniego (gwiazdka). Siedemnaście dni po podaniu surowicy HD. Pow. $18\ 000 \times$

mitochondria. Free ribosomes were often irregularly dispersed and reduced in number. Golgi apparatus, lysosomes or granular endoplasmic reticulum channels were not numerous (Fig. 2). In the same culture, the coexistence of the cells with profound degeneration and well preserved morphological structure of the nucleus and the organelles were often visible. In the same experiment, after 3 or 10 and 17 days of sera treatment, single large neurons exhibited distinct nuclear indentations and swollen mitochondria with disappearance of their cristae (Fig. 3). Some axons lying in the vicinity of the cell bodies contained a great number of dense core vesicles. The amount of dense core vesicles usually greatly exceeded that observed in the control cultures.

After 3 or more days of HD patients sera treatment, axospiny and axodendritic synapses showed no abnormalities (Fig. 4). But, in the same culture in the other area of the explant, distinct dilatation of the axonal processes could be observed. These swollen axons containing a different types of vesicles; most of them were round, empty, but some showed

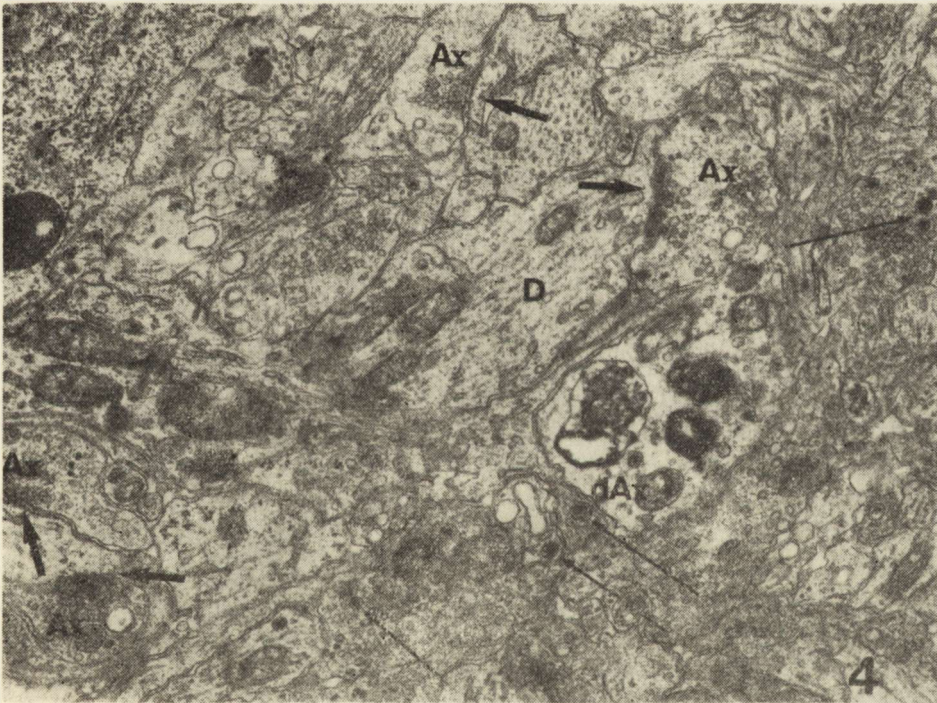


Fig. 4. Numerous unchanged synapses in the striatum (short arrows). Dense core vesicles in axon terminals (long arrows). Degenerated axon (dAx). Seventeen days after HD serum. $\times 12\ 000$. Ax — axon terminal, D — dendrite

Ryc. 4. Liczne prawidłowo zachowane połączenia synaptyczne w prążkowiu (krótkie strzałki). Pęcherzyki z elektronowo-gęstym rdzeniem w zakończeniu aksonalnym (długa strzałka). Zmiany zwyrodnieniowe aksonu (dAx). Siedemnaście dni po podaniu surowicy HD. Pow. $12\ 000 \times$. Ax — zakończenie aksonalne, D — dendryt

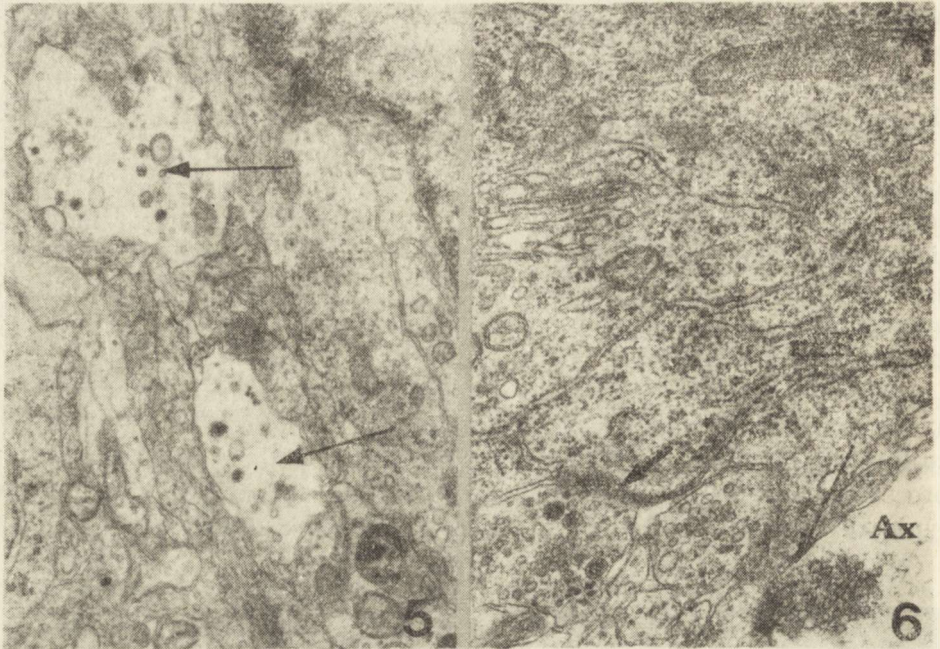


Fig. 5. Dilated axon terminals filled with small, round, empty vesicles. Between them large, dense core vesicles (arrows). Seventeen days after HD serum. $\times 18\,000$
Ryc. 5. Obrzęknięte zakończenie aksonalne zawierające małe, okrągłe, puste pęcherzyki, pomiędzy którymi widoczne są pęcherzyki z elektronowo-gęstym rdzeniem (strzałki). Siedemnaście dni po podaniu surowicy HD. Pow. $18\,000 \times$

Fig. 6. Synaptic contacts on the cell surface of large neuron. Severe edema of axon terminal and accumulation of the vesicles near presynaptic membrane (arrow). Axon terminal with numerous dense core vesicles. Seventeen days after HD serum. $\times 27\,000$. N — nucleus, rER — rough endoplasmic reticulum, Ax — axon terminal

Ryc. 6. Zakończenia synaptyczne na powierzchni cytoplazmy dużej komórki nerwowej prądkowia. Zmiany obrzękowe zakończenia aksonalnego z nagromadzeniem pęcherzyków w pobliżu błony przedsynaptycznej (strzałka). Zakończenie aksonalne z licznymi pęcherzykami z elektronowo-gęstym rdzeniem. Siedemnaście dni po podaniu surowicy HD. Pow. $27\,000 \times$. N — jądro, rER — ziarnista siateczka śródplazmatyczna, Ax — zakończenie aksonalne

the presence of big, dense cores (Fig. 5). A few axon terminals were deprived of synaptic vesicles and single dense core or empty vesicles were sporadically seen.

After 7 and more days of exposure to experimental sera, the axosomatic synapses were often damaged. They showed intensive edematous changes. Small, round vesicles, markedly reduced in number were accumulated near the presynaptic membrane (Fig. 6).

In the experiments, together with neuronal changes, the evident glial changes were always present. The glial cells demonstrated various types of morphological lesions and a varying degree of the cell damage. In the same region of the culture, both in the explant and in the outgrowth zone, degeneration of intracellular organelles or enhanced cell

edema leading to a deprivation of the organelles were seen (Fig. 7). Even in the cultures treated for 3 days with HD patients sera, glial cells demonstrating acutely swollen cell bodies and necrobiotic cellular profiles were frequently encountered. Another response of the glia cells to HD patients sera was an intensive overproduction of the glial filaments. They were mainly placed near the cell nucleus forming a dense, filamentous mesh. In those cells, mitochondria, single lipid bodies or ribosomes were removed to the peripheral part of the cytoplasm. Mitochondria exhibited severe structural damage. Two types of mitochondrial damage could be distinguished. Some had a light matrix and a reduced number of cristae, in others the matrix was moderately osmiophilic, frequently granular and generally the cristae were not present (Fig. 8). In the cells with numerous glial filaments, short channels of dilated granular endoplasmic reticulum were seen, free ribosomes were dispersed and reduced in number. In the cell cytoplasm or outside the cell body, the structures composed of membranous whorls were present.

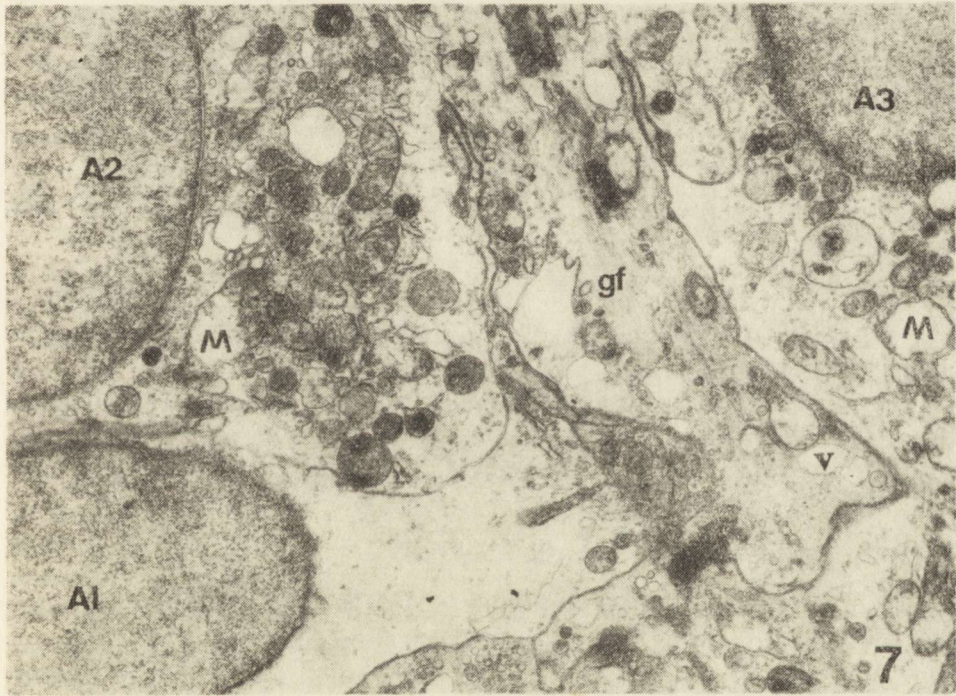


Fig. 7. Different types of astrocytic changes: severe edema (A1), degeneration of organelles, mainly mitochondria (A2), accumulation of vacuoles (V) and residual bodies (A3). In some processes dense glial filaments were found (gf). Three days after HD serum. $\times 18\ 000$

Ryc. 7. Typy zmian zwyrodnieniowych astrocytów: ciężki obrzęk (A1), uszkodzenie organelli komórkowych, głównie mitochondriów (A2), nagromadzenie wodniczek (V) i ciał resztkowych (A3). W niektórych wypustkach komórek glejowych widoczne liczne włókienka glejowe (gf). Trzy dni po podaniu surowicy HD. Pow. $18\ 000 \times$

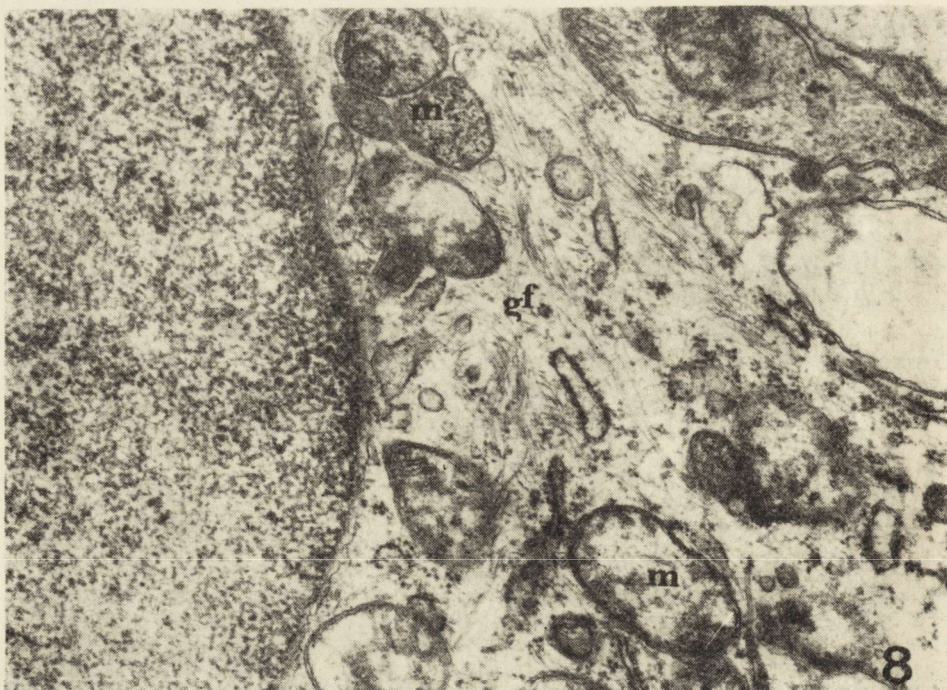


Fig. 8. Astrocyte with glial filaments condensation (gf) after 3 days of HD serum. Two different types of mitochondrial damage (M). $\times 24\ 000$

Ryc. 8. Astrocyt z nagromadzeniem włókienek glijowych (gf) w cytoplazmie. Dwa typy uszkodzeń mitochondriów (M). Trzy dni po podaniu surowicy HD. Pow. $24\ 000 \times$

The majority of oligodendrocytes did not show any structural changes, only an increased number of lysosomes was uncommonly detectable change.

The exposure of cultured striatum led to no obvious cytopathological effect regardless of the age of the cultures or the period of incubation with serum from patients with Parkinson's disease.

DISCUSSION

The neuropathological findings of HD patients are rather unspecific: neuronal loss in striatum and cerebral cortex and astroglial degeneration. There is no information about glial or neuronal changes preceding the disappearance of the neurons. In order to gain further insight into the nature of the pathological process underlying HD, tissue culture studies of a direct effect of HD patients sera on the morphological structure of cells seem to be of great importance.

The evident changes (after sera from HD patients in striatum in culture) were confined to the medium size neurons. Some of these cells showed intensive degeneration of the organelles or microvacuolization.

This morphological finding generally agrees with the picture usually demonstrated in HD patients.

There are some indications that the large striatal nerve cells may also be affected in HD patients (Bruyn et al. 1979). It was generally confirmed by our observation, but after administration of HD patients sera the morphological abnormalities in that type of neuron in tissue culture were very discrete. Swollen mitochondria and characteristic for HD patients the nuclear membrane indentations (Roos, Bots 1983) were found in a few large striatal neurons.

Another distinct structural abnormality found in culture of striatum treated with HD patients sera was the damage of the axosomatic synapses and increased number of round, dense core vesicles. A certain number of the neuronal processes were severely affected, suggesting a special affinity of a putative damaging factor from sera of HD patients to a certain type of the neuronal processes or synapses. An increased number of dense core vesicles appears to be one of the characteristic morphological features of striatum exposed to HD patients sera. The exact nature of that event can not be ascertained from the present study. However, disturbances of systemic neurotransmitters both in Alzheimer disease and other degenerative disorders of the central nervous system were recently found (Davies et al. 1980; Beal et al. 1984). The changes in somatostatin level, a marker for medium size aspiny neurons in neostriatum, appears to be one of the signs of the morphological disorders in HD patients. Somatostatin deficiency or dysfunction of nucleoprotein metabolism seem to play an important role as a causative factor in the pathophysiology of chorea (Tellez-Nagel et al. 1974; Cramer et al. 1981; Selkoe et al. 1982; Takagi et al. 1983). Our results with sera from HD patients supported the opinion of a physiopathologically disturbed function of synapses of HD patients. Moreover, both medium size neurons and astrocytes after the sera treatment exhibited abnormality in the structure of granular reticulum. Most of the affected cells showed degranulation of the membranes, diminished number of ribosomes and absence of polyribosomes. In the glial cells the enormous dilatation of endoplasmic channels together with filaments overproduction was a characteristic structural feature. Similar morphological changes were found in the previous experiments with kainic acid which demonstrated an experimental model of Huntington's disease *in vivo* (Coyle, Schwarcz 1976; McGeer, McGeer 1976) and to a certain degree in tissue culture (Renkawek et al. 1982; Matyja, Renkawek 1983). Those changes were considered to express disturbances in protein metabolism of astrocytes or neurons. The abnormality in protein synthesis important for cell function and leading to the death of the affected neurons may have an essential role in the pathogenesis of HD (Iqbal et al. 1974). Altered enzymatic values observed in HD patients (Bird, Iversen 1974; Perry

et al. 1973) may possibly be connected with a difference in the confirmation or organization of membrane proteins in the basal ganglia corresponding to the similar findings in erythrocytes from HD patients (Butterfield et al. 1980).

As shown by our experiments, first discernable changes of the neurons and glia were confined to the cell membrane. Widely distributed edematous changes had preceded protein disturbances such as degranulation of endoplasmic reticulum and fibrogliosis. Degenerative changes of the cells are probably a consequence of those protein and water disturbances. The nature of the factors initiating those changes remains unknown, nevertheless, they appear to be connected with the factors in HD patients sera since they were not observed in the cultures treated with Parkinson's disease patients sera. Further studies for evaluation of sera factor's or CSF from HD patients seem to be important in search for the pathogenetic basis of that disease.

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE W ORGANOTYPOWEJ HODOWLI PRAŻKOWIA SZCZURA POD WPLYWEM SUROWIC OD CHORYCH Z CHOROBA HUNTINGTONA

Streszczenie

Hodowle organotypowe prądkowia szczura poddano działaniu surowic od pacjentów z chorobą Huntingtona przez okres od 3 do 17 dni. Obserwacje w mikroskopie elektronowym wykazały obrzmienie i zwyrodnienie w astrocytach, w neuronach typu średniego oraz w synapsach akso-somatycznych. W astrocytach obserwowano nadmierne gromadzenie filamentów, poszerzenie kanałów siateczki śródplazmatycznej szorstkiej oraz uszkodzenie struktury mitochondriów.

Nie obserwowano powyższych zmian morfologicznych po użyciu surowic od chorych z chorobą Parkinsona, co przemawia za obecnością czynnika wybiórczo uszkadzającego prądkowie jedynie w surowicy chorych na chorobę Huntingtona.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЕ ТКАНИ ПОЛОСАТОГО ТЕЛА КРЫСЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ СЫВОРОТОК БОЛЬНЫХ С БОЛЕЗНЬЮ ГУНТИНГТОНА

Резюме

Органотипические культуры полосатого тела крысы подвергались действию сывороток крови больных с болезнью Гунтингтона в течение 3—17 дней. Электронномикроскопические исследования показали набухание и дегенерацию астроцитов; нервных клеток среднего типа и аксосоматических синапсов. В астроцитах наблюдалось увеличение содержания глиофиламентов, расширение каналов гранулярной интраплазматической сетки и нарушение строения митохондрии.

Выше описанные морфологические изменения не наблюдались при использовании сывороток крови больных с болезнью Паркинсона. Это указывает на существование фактора селективно повреждающего клетки полосатого тела исключительно в сыворотке крови больных болезнью Гунтингтона.

REFERENCES

1. Beal M. F., Bird E. D., Langlais P. J., Martin J. B.: Somatostatin is increased in the nucleus accumbens in Huntington's disease. *Neurology (Minneap.)*, 1984, 34, 663—666.
2. Bird E. D., Iversen L. L.: Huntington's chorea—post mortem measurement of glutamic acid decarboxylase, choline transferase and dopamine in basal ganglia. *Brain*, 1974, 97, 457—472.
3. Bruyn G. W., Bots G. Th. A. M., Dom R.: Huntington's chorea: current neuropathological status. In: *Advances Neurol.* Eds. T. N. Chase, N. S. Wexler and A. Barbeau, vol. 23, Raven Press, New York 1979, pp. 83—93.
4. Butterfield D. A., Doorlye P. F., Markesberry W. R.: Evidence for a membrane surface defect in erythrocytes in Huntington's disease. *Life Sci.*, 1980, 27, 609—615.
5. Coyle J. T., Schwarcz R.: Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 1976, 263, 244—246.
6. Cramer H., Kohler J., Oepen G., Schomburg G., Schröter E.: Huntington's chorea—measurements of somatostatin, substance P and cyclic nucleotides in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol.*, 1981, 225, 183—187.
7. Davies P., Katzman R., Terry R. D.: Reduced somatostatin-like immunoreactivity in cerebral cortex from cases of Alzheimer senile dementia. *Nature*, 1980, 288, 279—280.
8. Forno L. S., Norville R. L.: Ultrastructure of the neostriatum in Huntington's and Parkinson's disease. In: *Advances Neurol.* Eds. T. N. Chase, N. S. Wexler and A. Barbeau, vol. 23, Raven Press, New York 1979, pp. 123—135.
9. Husby G., Li L., Davis L. E., Wedge E., Kokmen E., Williams R. C.: Antibodies to human caudate nucleus neurons in Huntington's chorea. *J. Clin. Invest.*, 1976, 59, 922—932.
10. Iqbal K., Tellez-Nagel I., Grundke-Iqbal I.: Protein abnormalities in Huntington's chorea. *Brain Res.*, 1974, 76, 176—184.
11. Lange H., Thörner G., Hopf A., Schröder K. F.: Morphometric studies of the neuropathological changes in choreatic disease. *J. Neurol. Sci.*, 1976, 28, 401—425.
12. Matyja E., Renkawek K.: Morphological alterations of glia cells in rat striatal cultures induced by kainic acid. *Neuropat. Pol.*, 1983, 20, 329—339.
13. McGeer E. G., McGeer P. L.: Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acid. *Nature*, 1976, 263, 517—519.
14. Perry T., Hansen L. S., Kloster M.: Huntington's chorea: gamma-aminobutyric acid in brain. *N. Engl. J. Med.*, 1973, 288, 337—342.
15. Renkawek K., Matyja E., Mossakowski M. J.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of the rat cerebellum. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 321—330.
16. Roizin L., Kaufman M. A., Willson N., Stellar S., Liu J. C.: Neuropathological observations in Huntington's chorea. In: *Progress in Neuropathology*. Ed. H. M. Zimmerman, vol. III, Grune and Stratton, New York, San Francisco, London 1976, pp. 447—488.
17. Roos R. A. C., Bots G. Th. A. M.: Nuclear membrane indentations in Huntington's chorea. *J. Neurol. Sci.*, 1983, 61, 37—47.
18. Selkoe D. J., Salazar F. J., Abraham C., Kosik K. S.: Huntington's disease: changes in striatal proteins reflect astrocytic gliosis. *Brain Res.*, 1982, 245, 117—125.

19. Takagi H., Somogyi P., Somogyi J., Smith A. D.: Fine structural studies on a type of somatostatin-immunoreactive neuron and its synaptic connection in rat neostriatum: a correlated light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.*, 1983, 214, 1—16.
20. Tellez-Nagel J., Johnson A. A., Terry R. D.: Studies on brain biopsies of patients with Huntington's chorea. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1974, 33, 309—332.

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

PRZEMYSŁAW NOWACKI, JERZY KULCZYCKI,
JOLANTA CECERKO, KRYSZYNA HONCZARENKO

ROZPRZESTRZENIANIE SIĘ GLEJAKÓW MÓZGU U CHORYCH W RÓŻNYM WIEKU

Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
PAM, Szczecin

Klinika Diagnostyki i Terapii Chorób Układu Nerwowego Instytutu
Psychoneurologicznego, Warszawa

Klinika Neurochirurgii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
PAM, Szczecin

Badania nad notoworami ośrodkowego układu nerwowego od dawna dotyczą przede wszystkim zmian zachodzących w samym guzie. Mniej uwagi poświęca się natomiast ocenie zjawisk, jakie nowotwór wywołuje w tkankach leżących w jego sąsiedztwie. Poznanie zmian zachodzących w obrzeżu guza ma doniosłe znaczenie praktyczne dla neuropatologa, który zmuszony jest niejednokrotnie odpowiedzieć nie tylko na pytanie o jaki nowotwór chodzi, ale także, jaki jest jego stosunek do otoczenia i czy badany wycinek posiada utkanie nowotworowe, czy tylko tkankę glejową zmienioną procesem wypierającym? Odpowiedź na powyższe pytania jest szczególnie istotna dla neurochirurga, który na podstawie zmian zachodzących w obrzeżu guza decyduje o rozległości zabiegu operacyjnego. Możliwością praktycznego wykonywania zmian w obrazie morfologicznym obrzeży guzów mózgu do określenia rozległości zabiegów neurochirurgicznych zajmowali się Kunicki i Stefanicka-Wiechowa (1965) oraz Bromowicz i Kinderman (1966). Informacja dotycząca otoczenia guza jest też nie bez znaczenia dla radioterapeuty, ustalającego wielkość obszaru naświetlania nowotworu (Hochberg, Pruitt 1980).

W dotychczasowych badaniach morfologicznych zwracano uwagę na istotne i praktyczne różnice w obrazie obrzeża guzów w zależności od stopnia złośliwości nowotworu (Sosiński 1973; Nowacki, Kacaros 1975). Badano również związki zachodzące między sposobem rozprzestrzeniania się guza a budową podłoża, w którym się on rozwija (Scherer 1940; Matsukado i wsp. 1961; Mossakowski 1963; Bromowicz, Kinderman 1966).

Celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie, czy wiek chorego

wpływa na sposób rozrastania się glejaków mózgu i czy rozrost ten jest między innymi uwarunkowany zmianami podłoża związanymi z procesem starzenia się ośrodkowego układu nerwowego.

MATERIAŁ I METODY

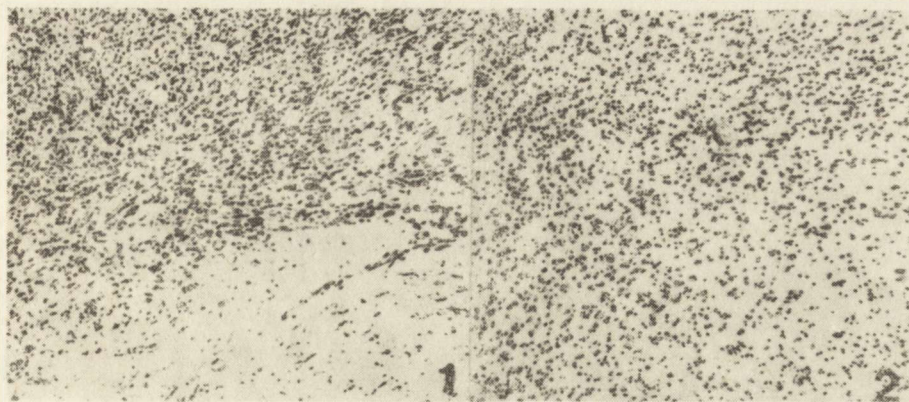
Badaniom poddano 21 glejaków mózgu wraz z obrzeżem, pobranych od osób obu płci podczas zabiegów operacyjnych wykonanych w Klinice Neurochirurgii PAM w Szczecinie, w okresie od 1970 do 1983 r. Po utrwaleniu w 8% roztworze formaliny i zatopieniu w parafinie preparaty barwiono: hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, metodami Holzera, Heidenheina i Holmesa oraz impregnowano wg Cajala (skrawki mrożone). Materiał podzielono na 2 grupy. Pierwszą grupę stanowiło 9 guzów pobranych od osób w wieku od 17 do 35 lat, drugą — 12 guzów uzyskanych od osób w wieku od 55 do 70 lat. W celu zmniejszenia wpływu na obraz morfologiczny obrzeża guza innych czynników niż wiek chorego, oceniano jedynie glejaki o podobnym stopniu złośliwości (typ III i IV wg Kernohana i Sayre 1952), czasie trwania choroby (1—2 miesiące od wystąpienia pierwszych objawów mogących świadczyć o rozwoju nowotworu) i umiejscowieniu (okolica czołowo-skroniowa). Dla lepszej oceny zmian zachodzących w otoczeniu guza, obrzeże glejaków podzielono na 3 strefy: frontu inwazyjnego, niepewną i przejściową (wg kryteriów podanych przez Kunickiego i Stefanicką-Wiechową 1965 oraz Sosińskiego 1973).

WYNIKI

Wszystkie przebadane glejaki tak w grupie pierwszej, jak i w drugiej rozrastały się w otoczeniu w sposób naciekający. Rozległość i sposób naciekania obrzeża były jednak w obu grupach różne.

Grupa pierwsza (wiek chorych od 17 do 35 lat)

We wszystkich przypadkach nowotwór zwykle odcinał się w otoczeniu dość ostro i wyraźnie (ryc. 1). Jedynie miejscami nacieki sięgały głębiej w obrzeże w postaci wąskiego języka, stopniowo przechodzącego w otoczenie. Guzy łatwo naciekały istotę białą, natomiast bardzo rzadko wnikały w korę mózgu. Przeszkodę stanowiły dla nich włókna „U”. Tylko w 1 przypadku kora do warstwy III była na dużej przestrzeni zajęta przez strefę frontu inwazyjnego. Nacieki nowotworowe były tu jednorodny, dość gęsty, komórki nowotworowe występowały luźno rozproszony w podłożu, nie wykazując tendencji do satelitozy wokół neuronów kory. Jednocześnie ze względu na zubożenie tej okolicy w komórki nerwowe, warstwowość kory była całkowicie zatarta.



Ryc. 1. Ostra granica pomiędzy guzem i otoczeniem u osoby młodej. Fiolet krezyłu. Pow. 63 ×

Fig. 1. Distinct delimitation between tumor and surrounding nerve tissue in young person. Cresyl violet. × 63

Ryc. 2. Stopniowe, nieostre przejście guza w otoczenie u osoby w starszym wieku. Fiolet krezyłu. Pow. 63 ×

Fig. 2. Diffuse spread of tumor in old patient. Cresyl violet. × 63

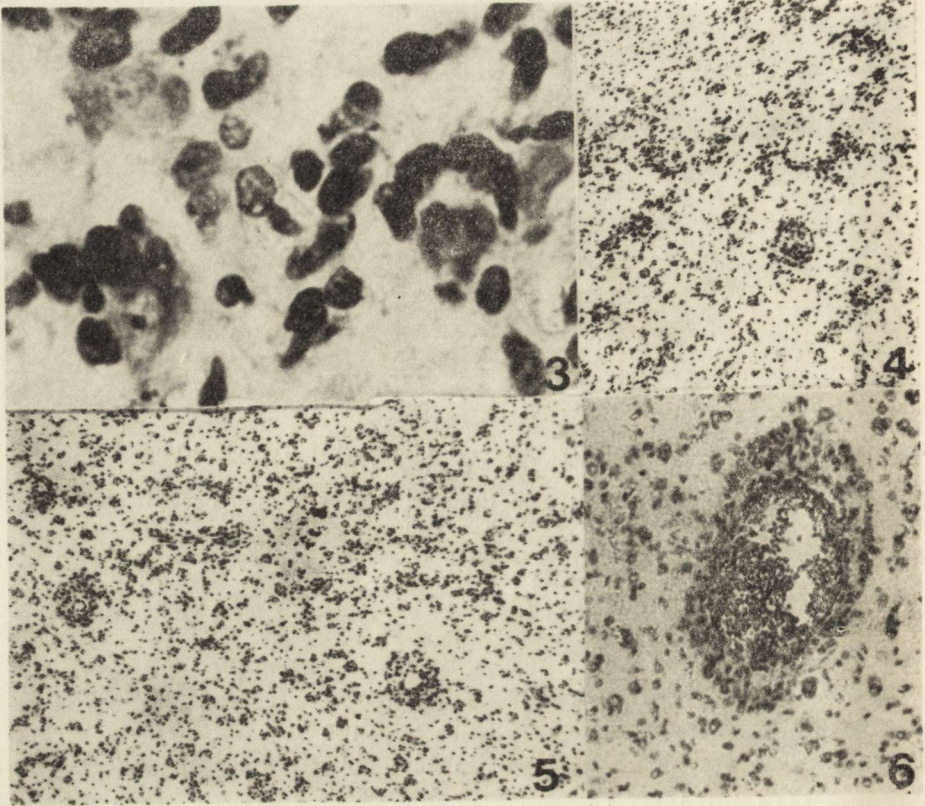
Szerokość strefy frontu inwazyjnego wynosiła w tej grupie od 600 do 750 μm , sporadycznie do 1200 μm (średnio 733 μm). Strefa niepewna miała zwykle szerokość od 1000 do 1200 μm , miejscami 1600—1800 μm (średnio 1178 μm) (ryc. 7).

Grupa druga (wiek chorych od 55 do 70 lat)

W większości przypadków naciekanie otoczenia przez nowotwór było rozleglejsze niż w grupie pierwszej. Częściej guz przechodził w otoczenie stopniowo i nieostro (ryc. 2), więcej też spotykano okolic, w których nowotwór wnikał w obrzeże szerokim klinem. Łatwiej niż w przypadkach grupy pierwszej glejaki przenikały warstwę włókien podkorowych niszcząc korę. W przeciwieństwie do grupy pierwszej satelitoza wywołana komórkami nowotworowymi oraz okołonaczyniowe nacieki nowotworowe były formą szerzenia się guza w otoczeniu (ryc. 3, 4, 5, 6). Wspomniane nacieki okołonaczyniowe obecne były we wszystkich przypadkach tej grupy, natomiast w grupie pierwszej znaleziono je tylko w 1 przypadku. Występowały zwykle w strefie frontu inwazyjnego, rzadko w niepewnej.

Szerokość strefy frontu inwazyjnego wynosiła w grupie drugiej od 1000 do 1500 μm , miejscami do 2000 μm (średnio 1454 μm). Strefa niepewna była również szersza niż w grupie poprzedniej, osiągając od 1500 do 2500 μm (średnio 2036 μm) (ryc. 7).

Ze względu na operacyjne pochodzenie materiału nie udało się prześledzić szerokości strefy przejściowej.



Ryc. 3. Satelitoza nowotworowa w strefie inwazyjnej u osoby starszej. Fiolet kre-
zylu. Pow. 240 \times

Fig. 3. Neoplastic satellitosis in the invasion zone in old patient. Cresyl violet.
 $\times 240$

Ryc. 4 i 5. Okołonacyniowe nacieki nowotworowe w strefie inwazyjnej u osoby
w starszym wieku. H—E Pow. 63 \times

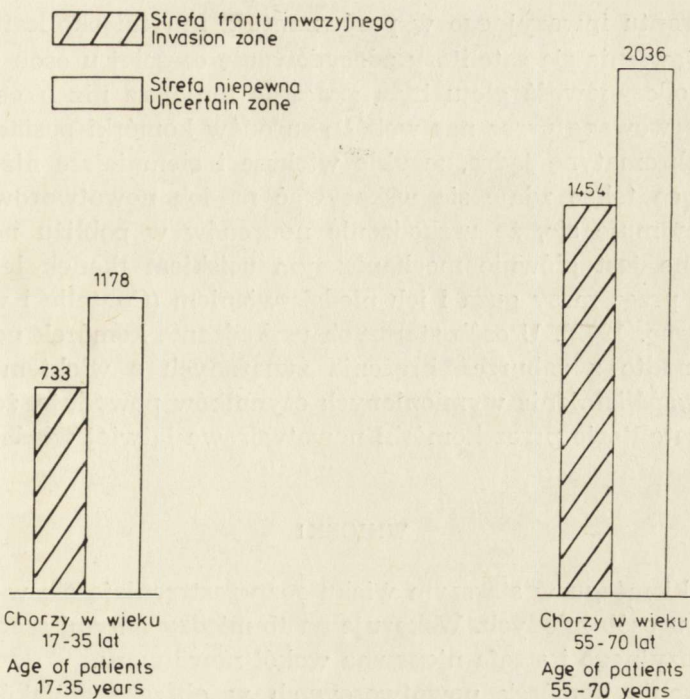
Figs 4 and 5. Perivascular neoplastic infiltrations in the invasion zone in old
patient. H—E $\times 63$

Ryc. 6. Okołonacyniowy naciek nowotworowy w strefie inwazyjnej u chorego w po-
deszłym wieku. H—E $\times 120$

Fig. 6. Perivascular neoplastic infiltration in the invasion zone in old patient.
H—E $\times 120$

OMÓWIENIE

Glejaki mózgu należą do nowotworów rozprzestrzeniających się w otoczeniu naciekająco. Panuje ogólnie przyjęty pogląd, że sposób, a także szybkość rozrostu guzów pochodzenia glejowego zależy głównie od charakteru podłoża, w którym nowotwory te się rozwijają. Jako jeden z pierwszych zagadnieniem tym zajął się Scherer (1940), wskazując na możliwość rozrostu guza wzdłuż naczyń oraz włókien i komórek nerwowych. Koncepcję tę potwierdziły dalsze badania, zwłaszcza Matsukado



Ryc. 7. Różnice w szerokości strefy inwazyjnej i strefy niepewnej u chorych w różnym wieku. Liczby oznaczają szerokość strefy w mikrometrach

Fig. 7. Width of the invasion and uncertain zones in patients of different age. Numbers indicate width of zones in micrometers

i wsp. (1961), Kunickiego i Stefanickiej-Wiechowej (1965) oraz Sosińskiego (1973). W przeprowadzonych przez nas badaniach stwierdziliśmy, że okołonaczyniowy rozrost guza był jednym z podstawowych sposobów rozprzestrzeniania się glejaków w otoczeniu, jednak — co zasługuje na szczególne podkreślenie — prawie wyłącznie w przypadkach nowotworów występujących u osób starszych. Zjawisko okołonaczyniowego rozrostu guza u osób młodszych należało w naszym materiale do rzadkości. Wydaje się nam, że zasadniczą przyczyną takiego sposobu naciekania nowotworu w starszym wieku jest postępujący stopniowo zanik mózgu u tych chorych, prowadzący do poszerzenia przestrzeni okołonaczyniowych, co z kolei ułatwia wnikanie do nich komórek nowotworowych.

Interesujący, a zarazem dyskusyjny jest problem rozrostu glejaków wokół leżących w pobliżu komórek nerwowych. Koncepcję rozrostu okołoneuronalnego reprezentował między innymi Scherer (1940). Natomiast zdaniem Bromowicza i Kinderman (1966) komórki tworzące satelitozę są pochodzenia odczynowego, a nie nowotworowego. Za udziałem komórek nowotworowych w tworzeniu satelitozy w naszym materiale przemawia z jednej strony wyraźna przewaga występowania tego zjawiska

w strefie frontu inwazyjnego w porównaniu z innymi okolicami, z drugiej zaś pojawianie się satelitozy zdecydowanie częściej u osób starszych, u których odczynowość gleju była znacznie mniejsza niż u osób młodszych. Obserwowane przez nas wokół neuronów komórki posiadały duże, bogate w chromatynę jądra, zwykle większe i ciemniejsze niż komórek glejowych, co także zdaje się wskazywać na ich nowotworowe pochodzenie. Przyjmuje się, że uszkodzenie neuronów w pobliżu nowotworu spowodowane jest głównie mechanicznym uciskiem tkanek leżących w sąsiedztwie przez masy guza i ich niedokrwieniem (Coutelle i wsp. 1969; Felicetti i wsp. 1972). U osób starszych uszkodzenie komórek nerwowych wynika ponadto z zaburzeń krążenia związanych z wiekiem chorych. Być może współistnienie wymienionych czynników powoduje, że neurony podlegają satelitozie przez komórki nowotworowe łatwiej właśnie u ludzi starszych.

WNIOSKI

1. Glejaki mózgu w starszym wieku rozprzestrzeniają się w otoczeniu łatwiej niż u osób młodych. Wskazuje na to między innymi szersza strefa frontu inwazyjnego i strefa niepewna wokół nowotworu.

2. Wnikanie komórek nowotworowych w obrzeże glejaków mózgu u osób starszych odbywa się przede wszystkim drogą poszerzonych przestrzeni okołonaczyniowych oraz przez satelitozę wokół leżących w pobliżu nowotworu komórek nerwowych.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ МОЗГОВЫХ ГЛИОМ У БОЛЬНЫХ В РАЗНОМ ВОЗРАСТЕ

Резюме

Авторы попробовали определить, влияет ли процесс старения на способ разрастания глиом мозга.

Исследования проведенные в 21 случае глиом мозга, взятых вместе с краем окружающей ткани во время операции, привели к следующим выводам:

1. Глиомы мозга в пожилом возрасте распространяются в окружающих тканях более свободно, чем у молодых. Свидетельствует об этом более широкая зона бластоматозного роста и сомнительная зона вокруг опухоли.

2. Проникновение клеток опухоли в край мозговой ткани у пожилых людей состоит, прежде всего, путем расширенных околососудистых пространств и вследствие сателитоза вокруг нервных клеток находящихся вблизи опухоли.

SPREAD OF CEREBRAL GLIOMAS IN PATIENTS OF VARIOUS AGE

Summary

The aim of the study was to establish influence of aging process on the mode of spread of cerebral gliomas. Investigations performed on 21 cerebral gliomas taken at the operations lead to the following conclusions:

1. Cerebral gliomas in aged persons spread easier than in the young individuals. Invasion zone and "zona incerta" around neoplasms were wider in old patients.

2. Spread of neoplastic cells into boundary of cerebral gliomas in old persons takes place through widened perivascular spaces and neoplastic satellitosis of nerve cells.

PIŚMIENNICTWO

1. Bromowicz J., Kinderman B.: Wzrost glejaków z chirurgicznego punktu widzenia. *Biul. WAM*, 9, 315—318.
2. Coutelle C., Bonk U., Coutelle R., Felicetti D., Rath W., Traub F.: Vergleichende histologische Untersuchungen zum invasiven Tumorwachstum. I. Histologische Untersuchung. *Arch. Geschwulstforsch.*, 1969, 34, 13—24.
3. Felicetti D., Bonk U., Coutelle C., Coutelle R., Rath W., Traub F.: Experimental investigations on invasive tumor growth. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 269—271.
4. Hochberg F., Pruitt A.: Assumptions in the radiotherapy of glioblastoma. *Neurology*, 1980, 30, 907—911.
5. Kernohan J. W., Sayre G. P.: Tumours of the central nervous system. *Armed Forces Inst. Pathol.*, Washington, 1952.
6. Kunicki A., Stafanicka-Wiechowa A.: Remarks on the mode of spread of cerebral gliomas. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 373—380.
7. Matsukado Y., Collin S., MacCarty C., Kernohan J.: The growth of glioblastoma multiforme (astrocytoma grade 3 and 4) in neurosurgical practice. *J. Neurosurg.*, 1961, 18, 636—644.
8. Mossakowski M. J.: Gwiaździki mózgu i mózdzku. *Neuropat. Pol.*, 1963, 3, 131—214.
9. Nowacki P., Kacaros K.: Charakter i zasięg zmian glejowych w bezpośrednim sąsiedztwie procesu wypierającego w mózgu. *Zeszyty Naukowe STN, PAM* 1975, Nr 6, 56—67.
10. Scherer H.: The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain*, 1940, 63, 1—35.
11. Sosiński E.: Zmiany w tkance nerwowej w otoczeniu pierwotnych i wtórnych nowotworów mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 23—40.

Adres autorów: Klinika Neurologii Pomorskiej Akademii Medycznej, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

MARIA DĄBBSKA, DANUTA MAŚLIŃSKA, JOLANTA TUBYLEWICZ

CONTROVERSIAL EFFECT OF ENDOXAN ADMINISTRATION ON MATURING RABBIT BRAIN

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

Endoxan (cyclophosphamide — CP) an alkylating compound is used as an antimetabolic drug, in transplantology, in view of achieving immunosuppression and also in several processes associated with altered immunoreactivity. It is applied not only to adult, but also largely in pediatric clinic. CP exerts influence on DNA molecule, on some enzymes involved in amino acids metabolism and on structural proteins (Calabresi, Parks 1980). Therefore the effect of this compound on the maturing nervous tissue could be unfavorable, particularly before the blood-brain barrier reaches its maturity (Gabriel 1973).

Investigations on developing rabbits were performed in view to test this hypothesis. Myelination takes place postnatally, therefore the effect of CP on this important process of nervous tissue maturation was investigated.

MATERIAL AND METHODS

Our material consisted of 18 rabbits from five litters. They were treated during ten days between 6th and 15th day of life with 50 mg/kg of body weight of cyclophosphamide daily by oral gavage. Other 12 rabbits from the same litters constituted a control group. Clinical observations comprised the verification of body weight until 2—2.5 months after treatment and comparison of motor activity of young adult animals from experimental and control groups. Observations were performed in the "free field" during five days where the precise movements of animals were registered. The animals were sacrificed on 16th, 32nd, 48th and 96th day of life (experimental rabbits survived 1, 16, 32 and 80 days after the last CP administration).

Samples were taken from the brain on the level of optic chiasm, embedded in paraffin and stained by Klüver-Barrera method. Histo-

enzymatic investigations were performed on cryostat sections taken on similar level. The activities of following enzymes were estimated: acid phosphatase (APh) according to the method of Gomori (1953), succinic dehydrogenase (SDH) according to the method of Lojda et al. (1976) and lactic dehydrogenase (LDH) according to the method of Pearse (1961). These enzymes were chosen as markers of the consecutive stages of premyelination period (Farkas-Bargeton 1968). Moreover activity of glucose-6-phosphatase (G6P) was estimated according to the method of Wachstein and Meisel (1957). Activity of this enzyme in normal brain is very low (Watanabe et al. 1983) and increases in several pathologic conditions (Bit et al. 1982).

For ultrastructural study blocks were taken from frontal and cerebellar cortex, corpus callosum and internal capsule. The material was prepared by routine electron microscopic methods, topography of structures was verified in semithin sections. Ultrathin sections were taken on LKB-ultramicrotome, then treated with lead citrate and uranyl acetate and examined under a JEM-100 electron microscope.

RESULTS

The administration of cyclophosphamide to newborn rabbits resulted in death of about 10% of animals occurring most often during second week after treatment. Clinical symptoms in surviving animals consisted in leucopenia (Maślińska et al. 1983), hairloss and the lack of regular increase of body weight during the treatment (Table 1). The deficit of body weight compared with the control group persisted until the adulthood of animals (Table 2). Behavioural observations revealed a diminished mobility of experimental rabbits. Motor activity was lower in experimental rabbits than in control group 20% on the first day of investigation and 28% on the day of maximal activity of each group (Fig. 1).

The morphological study of brain sections stained with Klüver-Barerra method revealed in 16-day-old CP-treated rabbits a nearly total lack of myelin sheaths in corpus callosum (Fig. 2) and an evidently more

Table 1. Average rabbits weight during treatment with cyclophosphamide (g)
Tabela 1. Średnia waga ciała królików w czasie podawania cyklofosfamidu (g)

1st day 1 dzień	5th day 5 dzień	10th day 10 dzień
170	222.5	189.5

Number of animals — 11

Liczba zwierząt — 11

Table 2. Average weight of adult rabbits treated with cyclophosphamide between 6th-15th day of life (g)

Tabela 2. Średnia waga ciała dorosłych królików otrzymujących cyclofosfamid między 6–15 dniem życia (g)

Age Wiek	Control group Grupa kontrolna	Experimental group Grupa experymentalna	Deficit of weight Niedobór wagi
2.5 months mies.	2146 (6)	1616.6 (4)	24.7%
3 months mies.	2375 (6)	1657.5 (4)	30.3%

In parentheses number of animals is given.

W nawiasach — liczba zwierząt

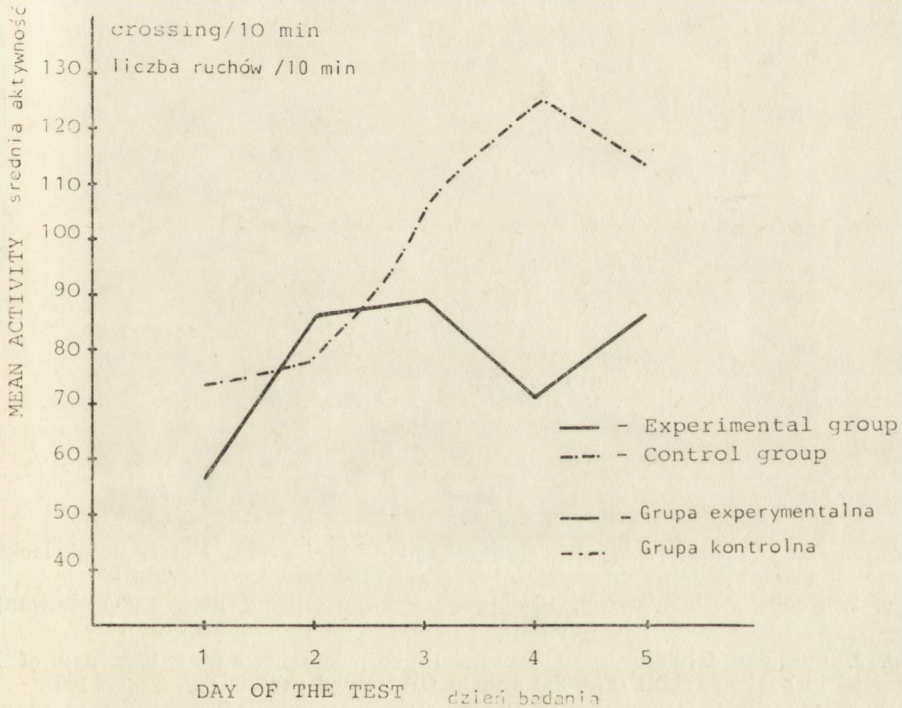


Fig. 1. Motor activity of young adult rabbits treated with cyclophosphamide between 6th—15th day of life

Ryc. 1. Aktywność ruchowa dorosłych młodych królików, którym podawano cyclofosfamid od 6 do 15 dnia życia

advanced stage of myelination in internal capsule. This picture was similar with the other one observed in control animals.

Histoenzymatic studies at the same day of life showed that APh and LDH activity in cytoplasm of glial cells were similar in experimen-

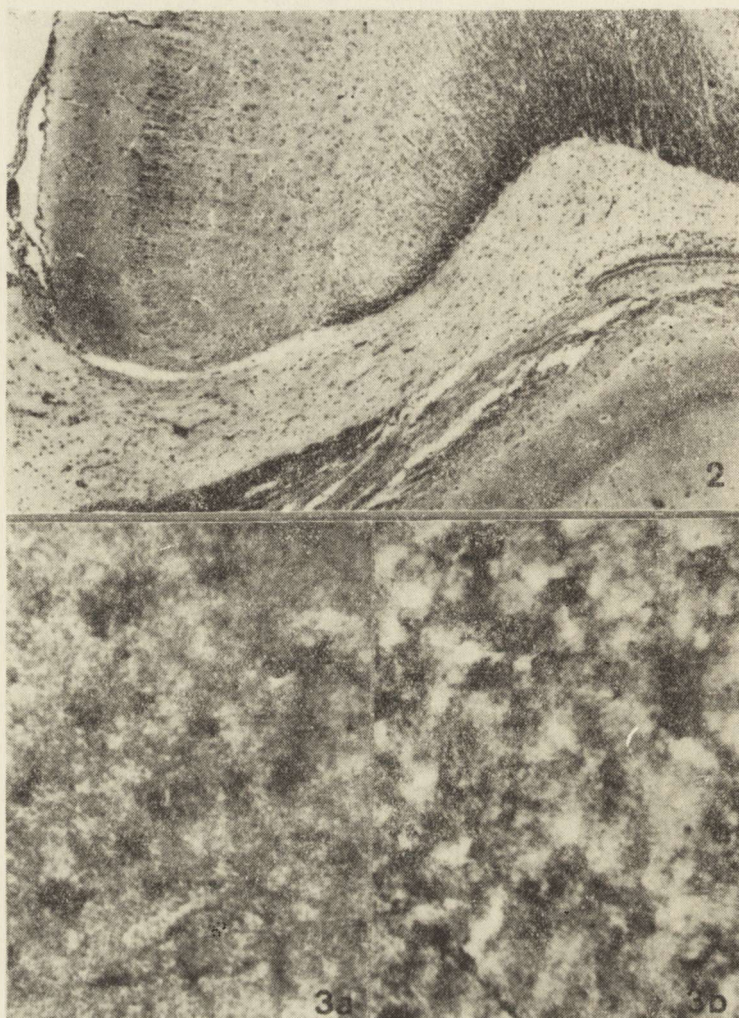


Fig. 2. Rabbit treated with cyclophosphamide, 16-day-old. Nearly total lack of myelin sheaths in corpus callosum. Klüver—Barrera. Magn. glass

Ryc. 2. Królik doświadczalny, 16-dniowy. Prawie zupełny brak zmielinizowanych włókien w spoidle wielkim. Klüver—Barrera. Pow. lupowe

Fig. 3. Succinic dehydrogenase activity in corpus callosum at 16th day of life in control rabbit (*Fig. 3a*) and in CP-treated rabbit (*Fig. 3b*). $\times 100$

Ryc. 3. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w spoidle wielkim w 16 dniu życia u królika kontrolnego (*Ryc. 3a*) i u królika doświadczalnego (*Ryc. 3b*). Pow. $100 \times$

tal and control animals, respectively to both examined structures. The formazan grains indicating succinic dehydrogenase activity in glial cells looked even more abundant in experimental than in control rabbits (*Figs 3a and 3b*).

Ultrastructural examination revealed in 16-day-old animals the very early stage of myelin formation in corpus callosum and evidently more

advanced stage of myelination in internal capsule. The pathologic changes were found in several cells of myelinating glia. Their cytoplasm was electron-lucid, because of decreased number of ribosomes. This was particularly evident in comparison with abundance of ribosomes in glial cells at this stage of development in control animals. Endoplasmic

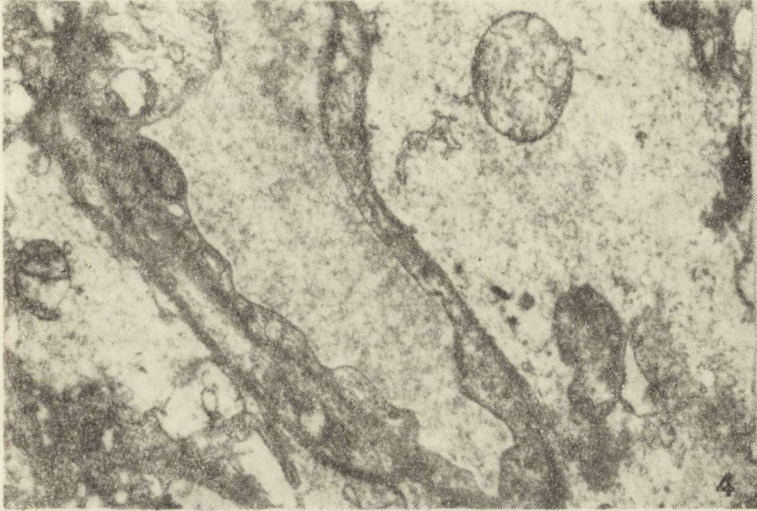


Fig. 4. CP-treated rabbit. Perivascular processes of astrocytes swollen, with only few organelles and several vacuoles. $\times 9000$

Ryc. 4. Królik doświadczalny. Okołonaczyniowe wypustki astrocytów obrzmiałe, ubogie w organelle, z licznymi wodniczkami. Pow. 9000 \times

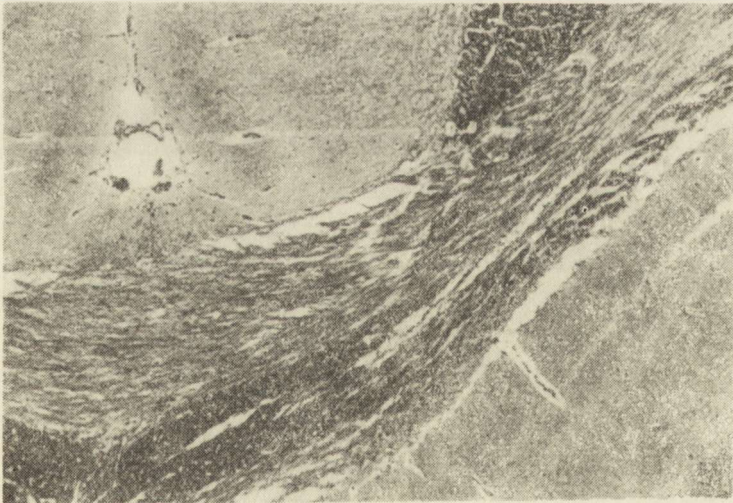


Fig. 5. Normal myelination of corpus callosum in rabbit at 32nd day of life. Klüver—Barrera. Magn. glass

Ryc. 5. Mielinizacja spoidła wielkiego u królika w 32 dniu życia. Klüver-Barrera. Pow. lupowe

reticulum was enlarged even forming vacuoles. Some mitochondria were abnormal. Similar changes were noticed in other neuroectodermal cells. Some astrocytes especially their perivascular processes were swollen (Fig. 4).

In 32-day-old rabbits (Fig. 5) and in 48- and 96-day-old animals from experimental groups myelination of both examined structures showed a normal rate parallel with the control group. On the other hand



Fig. 6. Well myelinated axons in corpus callosum in rabbit at 48th day of life.
× 5000

Ryc. 6. Dobrze zmielinizowane włókna w *corpus callosum* królika w 48 dniu życia.
Pow. 5000 ×

Fig. 7. Normal and degenerated glial cells in corpus callosum of CP-treated rabbit.
× 5000

Ryc. 7. Prawidłowa i zwyrodniała komórka glikowa w spidzie wielkim doświadczalnego królika. Pow. 5000 ×

investigation performed in 48-day-old CP treated rabbits revealed the activity of G6Pase in glial cells of myelinating structures. Activity of this enzyme was lacking in control brains. Ultrastructural pictures demonstrated despite of a normal rate of myelination (Fig. 6) the persistence of some pathologic changes in oligodendroglial cells, similar to those observed in the 16-day-old animals. In addition dark glial cells with enlarged reticulum, amorphic cytoplasm and shrunken nuclei indicative on irreversible cell damage were noticed (Fig. 7). They were more often found in 32- and 48-day-old experimental animals than in control rabbits. Degenerating axons were not numerous, but they were encountered in myelinated structures even at 96th day of life (Fig. 8).



Fig. 8. Degenerated axon in corpus callosum of CP-treated rabbit. $\times 9000$

Ryc. 8. Wyrodnający akson w spoidle wielkim doświadczalnego królika. Pow. $9000 \times$

DISCUSSION

Our observations presented above indicate that CP exerts a complicated effect on maturing rabbit brain. CP, a water soluble compound, may cross the blood-brain barrier if used in the high doses (Allen, Helson 1981). The time in which the treatment was applied is the period of blood-brain barrier maturation and the period of intensive nerve fibers myelination (Dąmbska, Danielewicz-Kotowicz 1978). The dosis of CP was chosen according to clinical symptoms in animals similar to those, observed in humans (leucopenia, hairloss, deficit of body weight). Despite of those the process of nerve fibers myelination started in normal period. SDH activity examined immediately after the last CP ad-

ministration was not decreased but even more intensive than in control animals of the same age. It could be supposed that glial cells impeded in the process of multiplication by the antimetabolic drug, started earlier into the first step of premyelination phase characterized by an increase of SDH activity (Farkas-Bargeton 1970). At any rate the myelination took part in a normal time. On the other hand the activity of G6Pase in glial cells in structures with advanced and grossly normal myelination (48th day of life) could be considered as an exponent of pathologic changes within those structures. Ultrastructural observations confirm that the glial cells involved in myelination process develop some abnormalities after CP administration. They consisted of the reduction of the number of ribosomes and formation of vacuoles. The reduction of ribosomes could depend on unfavorable influence of CP on cell proteins (Hansen et al. 1975; Hill 1975; Calabresi, Parks 1980). The vacuoles resulting from changes of the endoplasmic reticulum could be connected with stimulating effect of CP or its metabolites on the endoplasmic membranes (Mayer et al. 1980). The pathologic changes following CP administration persisted during and even after the time of intensive myelination and resulted in a considerable number of dark necrotic oligodendroglial cells in the white structures of young adult animals.

The changes observed in perivascular astrocytes allow to connect the influence of CP with its penetration through blood-brain barrier. Previous investigations seem to testify this penetration, even in adult animals (Allen, Helson 1981; Maślińska 1986). Much more the noxious effect of CP could occur in the period of blood-brain barrier maturation. Contrary to the current opinion, the results of our studies indicate the possibility of unfavorable effect of CP on the nervous tissue particularly in the period of its maturation.

WIELOZNACZNE NASTĘPSTWA ODDZIAŁYWANIA ENDOKSANU NA DOJRZEWAJĄCY MÓZG KRÓLIKA

Streszczenie

Badano wpływ endoksanu podawanego królikom od 6 do 15 dnia życia w ilości 50 mg/kg masy ciała na aktualnie mielinizujący się ośrodkowy układ nerwowy.

Stwierdzono, że aktywność badanych enzymów w okresie premielinizacji jest prawidłowa, a dehydrogenazy bursztynianowej wydaje się nawet większa niż w normie. Mielinizacja włókien przebiega prawidłowo, tym niemniej w końcowym okresie mielinizacji widoczna jest w strukturach białych aktywność glukozo-6-fosfatazy, która przemawia za ich uszkodzeniem. Badania ultrastrukturalne wskazują, że uszkodzenie dotyczy komórek gleju mielinizacyjnego i astrocytów okołonaczyniowych. Obecność licznych obumarłych komórek oligodendrogleju i nielicznych zwyrodniałych aksonów wskazuje na nieodwracalność części uszkodzeń strukturalnych.

МНОГОЗНАЧНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ ВЛИЯНИЯ ЦИКЛОФОСФАМИДА НА РАЗВИВАЮЩИЙСЯ МОЗГ КРОЛИКА

Резюме

Исследовалось влияние циклофосфамида подаваемого по 50 мг/кг веса кроликам в возрасте от 6 до 15 дня жизни на миелинизирующуюся в это время нервную систему. Было констатировано, что активность энзимов в премиелинизационном периоде правильная, активность сукцинатдегидрогеназы кажется даже больше, чем в норме. Миелинизация протекает в правильных темпах. Тем не менее, в конечном периоде миелинизации наблюдается в белом веществе активность глюкозо-6-фосфатазы. Это указывает на нарушения в белом веществе. Электронномикроскопические исследования показывают, что повреждены клетки миелинизационной глии и околососудистые звездчатые клетки. Многочисленные мертвые клетки олигодендроглии и немногочисленные переражденные аксоны в зрелых мозгах кроликов свидетельствуют о необратимости части этих повреждений.

REFERENCES

1. Allen J. C., Helson L.: High-dose cyclophosphamide chemotherapy for recurrent CNS tumors in children. *J. Neurosurg.*, 1981, 55, 749—756.
2. Bit Z., Kobor J., Ormos J.: Activity of glucoso-6-phosphatase in regenerating tubular epithelium in rat kidney and necrosis induced with mercuric chloride. *Br. J. exp. Path.*, 1982, 63, 615—624.
3. Calabresi P., Parks R. E.: Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. Eds. A. G. Gilman, L. S. Goodman, A. Gilman. MacMillan Publ. Co. Inc. New York, Toronto, London, 1980, 1256—1260.
4. Dąbbska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelination of some structures of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 203—209.
5. Farkas-Bargeton E.: Histochemical modifications of the white matter in children. *Path. Europ.*, 1968, 3, 184—193.
6. Farkas-Bargeton E.: Aspect biochimique et histochemique de la maturation du systeme nerveux. *Journées Parisiennes de Pédiatrie*, 1970, 351—366.
7. Gabriel P.: Bariera krew-mózg — struktura i funkcja. *Pat. Pol.*, 1973, 24, 217—235.
8. Gomori G.: *Microscopic histochemistry*. Univ. Press, Chicago, 1953.
9. Hansen T., Mark J., Lorenzen L.: The effect of cyclophosphamide on collagen in skin and granulation tissue in rats and the effects of cyclophosphamide on collagen in human skin. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 1975, 36, 448—461.
10. Hill D. L.: A review of cyclophosphamide. *Ch. C. Thomas Publ. Springfield Illinois*, 1975, 60—69.
11. Lojda Z., Grossrau R., Schiebler T. H.: *Enzym-histochemische Methoden*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 231.
12. Maślińska D., Skwierczyńska A., Koch I.: Cyclophosphamide effect on changes in rabbit peripheral blood in the development period. *Acta Physiol. Pol.*, 1983, 34, 85—90.
13. Maślińska D.: Effect of alkylating drugs on rat cerebellum. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1986, 24, 47—52.
14. Mayer S. E., Melman K. L., Gilman A. G.: The dynamics of drug absorption, distribution and elimination. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. Eds. A. G. Gilman, L. S. Goodman, A. Gilman. MacMillan Publ. Co. Inc. New York, Toronto, London 1980.

15. Pearse A. G. E.: Histochemistry. Theoretical and applied. J. and A. Churchill Ltd., London 1961, 912—913.
16. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. Am. J. Clin. Path., 1957, 27, 13—23.
17. Watanabe M., Goto H., Matsushima M., Shimoto R., Kihara T.: Distribution of glucoso-6-phosphatase activity in mice studied by *in vitro* whole body autoradiography. J. Histochem. Cytochem., 1983, 31, 1426—1429.

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

BARBARA GAJKOWSKA

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE
JĄDRA NADWZROKOWEGO I JĄDRA PRZYKOMOROWEGO
PODWZGÓRZA KRÓLIKA W PRZEDŁUŻAJĄCYM SIĘ STRESIE
HIPERTERMICZNYM

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

Przedstawione badania są kontynuacją uprzednio prowadzonych doświadczeń nad wpływem wysokiej temperatury otoczenia na układ podwzgórzowo-przysadkowy królika (Gajkowska i wsp. 1985; Loesch i wsp. 1985). U zwierząt poddanych jednorazowej ekspozycji na działanie wysokiej temperatury (38—39°C) wykazano stymulację podwzgórzowo-przysadkowego układu antydiuretycznego, odpowiedzialnego między innymi za termoregulację ustroju.

Interesującym wydawało się przeprowadzenie obserwacji mikroskopowo-elektronowych neurosekrecyjnych jąder podwzgorza w reakcji na przedłużający się stres hipertermiczny. Celem tej pracy było ustalenie wpływu przegrzania organizmu na wykładniki ultrastrukturalne aktywności neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgorza królika.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 10 królikach albinotycznych obu płci, wagi około 3 kg, hodowanych w zwierzętarni w temperaturze 16—18°C. Zwierzęta podzielono na dwie grupy: grupa I — trzy króliki poddano przez 3 kolejne dni działaniu 3-godzinnej wysokiej temperaturze otoczenia do 38—39°C według metody opisanej w poprzedniej pracy (Gajkowska i wsp. 1985). Wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego pobrano do badań mikroskopowo-elektronowych bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia; grupa II — trzy króliki również poddano przez 3 kolejne dni działaniu 3-godzinnej wysokiej temperatury

otoczenia (38—39°C), a materiał do badań mikroskopowo-elektronowych pobrano 24 godziny po zakończeniu hipertermii. W obu grupach doświadczalnych wykonano pomiary temperatury ciała w *rectum* królika. Bezpośrednio po doświadczeniu temperatura wynosiła 41,5°C, 24 godziny po doświadczeniu — 39,5°C. Ciepłota królików kontrolnych wahała się od 38 do 38,5°C. Wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego od zwierząt doświadczalnych pobierano zawsze łącznie z wycinkami z jądra nadwzrokowego oraz przykomorowego od zwierząt kontrolnych (4 króliki). Materiał utrwalano w 4% roztworze aldehydu glutarowego w 0,2 M buforze kakodylanowym o pH 7,4 przez 1 godz., a następnie płukano w tym samym buforze przez całą noc i dodatkowo utrwalano przez 1 godz. w 2% roztworze OsO₄ w 0,2 M buforze kakodylanowym. Po odwodnieniu w alkoholach o wzrastającym stężeniu i w tlenku propylenu materiał zatapiano w Eponie 812. Skrawki krojono na ultramikrotomie Reichert OmU2. Dobarwiano je wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu, oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

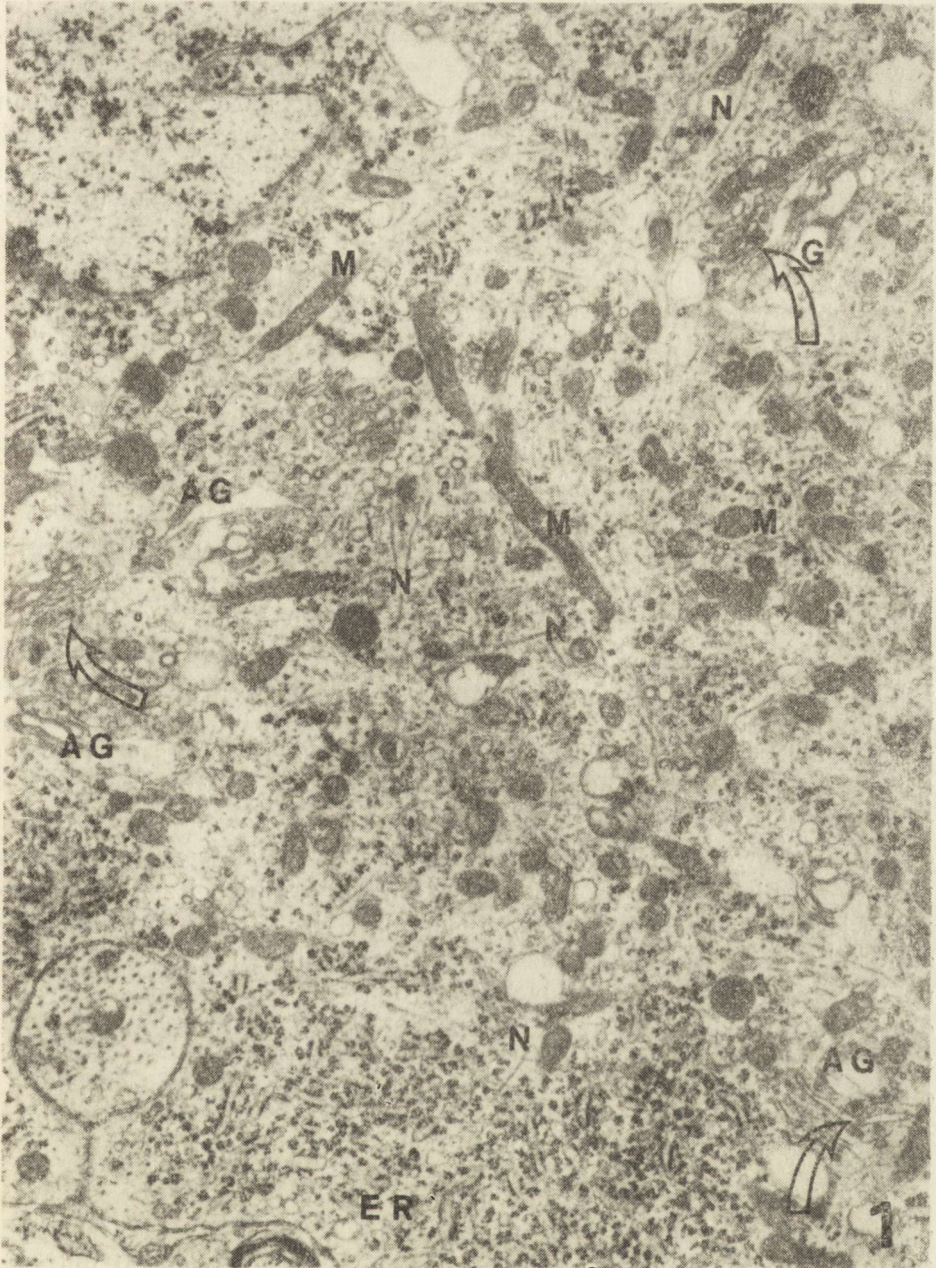
WYNIKI

Zwierzęta kontrolne, zdrowe

Badania mikroskopowo-elektronowe neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza królika nie różniły się morfologicznie od opisanych we wcześniejszych publikacjach (Gajkowska 1985; Gajkowska i wsp. 1985), dlatego pominę ich szczegółowy opis.

I grupa zwierząt doświadczalnych

Obrazy mikroskopowo-elektronowe neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego z tkanki pobranej bezpośrednio po ostatniej hipertermii wykazywały ten sam charakter zmian. W zależności od stanu czynnościowego poszczególne neurony sekrecyjne przejawiały pewną zmienność morfologiczną. Obserwowano neurony o dużych jądrach komórkowych nieregularnego kształtu, z licznymi wgłębieniami. Na terenie jądra znajdowało się zawsze elektronowo-gęste jąderko. W cytoplazmie zwracała uwagę obfitość siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ER) równomiernie gęsto pokrytej rybosomami. Tworzyła ona skupienia w obwodowych częściach neuronu. Pozostałe części cytoplazmy zajmował bardzo znacznie rozwinięty i rozczłonowany kompleks Golgiego oraz stosunkowo małe, owalne lub nieco wydłużone, mitochondria. Przeważnie miały one prawidłową budowę. Obecne były także lizosomy pierwotne i wtórne oraz znaczna ilość neurotubul o różnej długości. Szczególnie obficie gromadziły się one w centralnych obszarach cytoplazmy pomiędzy organellami, a zwłaszcza w pobliżu kompleksu Golgiego (ryc. 1). Obraz mikroskopowo-elektronowy kompleksu Golgiego w neuronach se-



Ryc. 1. Królik bezpośrednio po stresie cieplnym. Jądro nadwzrokowe. We fragmencie cytoplazmy dobrze rozwinięty kompleks Golgiego (AG), w jego kanałach obecne ziarnistości neurosekrecyjne (strzałki). Obecne są liczne neurotubule (N), drobne lub wydłużone mitochondria (M), przeważnie o prawidłowej budowie oraz dobrze rozwinięta siateczka śródplazmatyczna ziarnista (ER). Pow. 12 450 ×

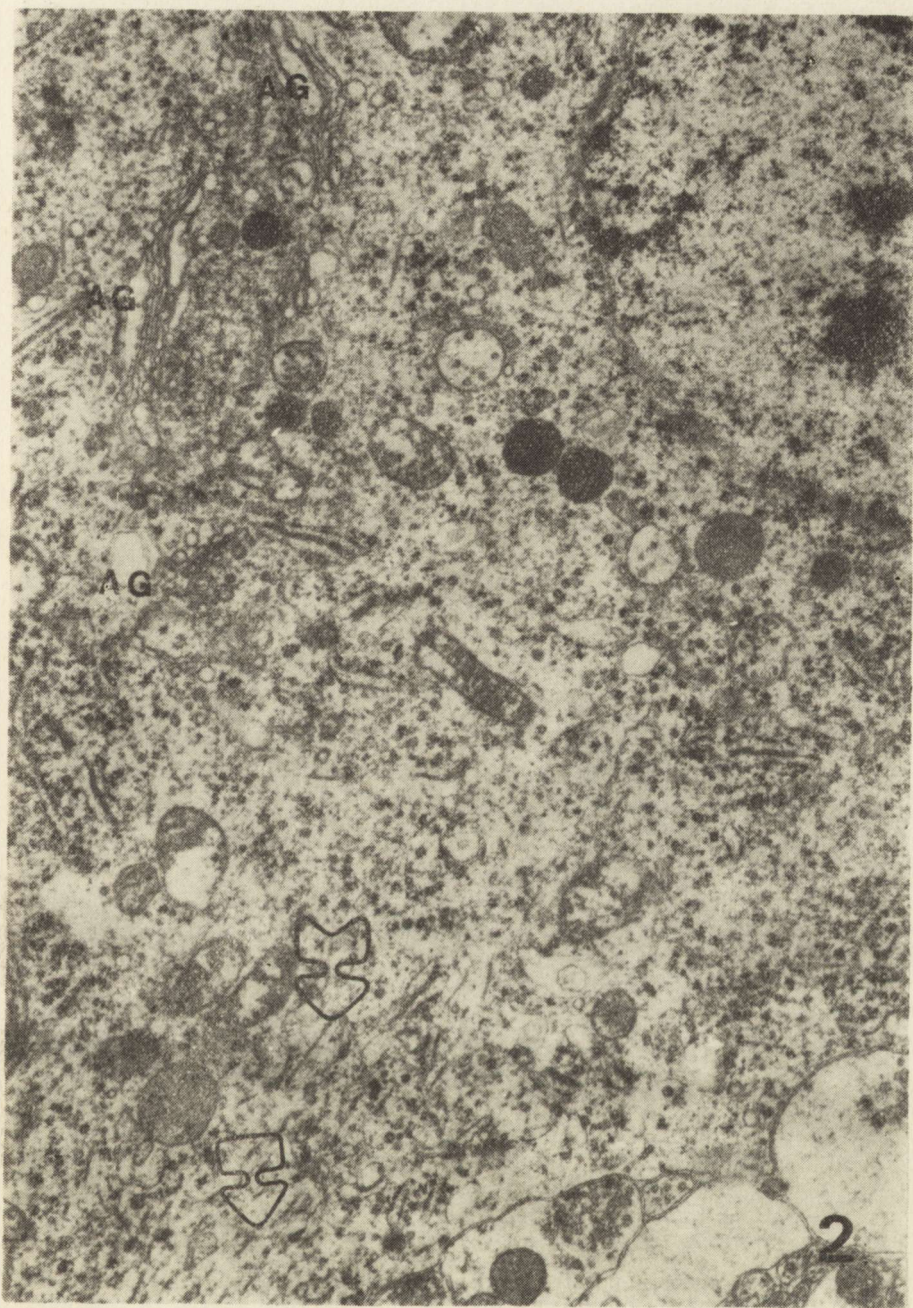
Fig. 1. Rabbit directly after heat stress. Supraoptic nucleus. Well developed Golgi complex (AG) in a fragment of the cytoplasm. Note neurosecretory granules (arrows) in channels of Golgi complex (AG). Numerous small or longer mitochondria (M), neurotubules (N) and very well developed granular endoplasmic reticulum (ER).
× 12 450

krecyjnych zwierząt doświadczalnych nie różnił się w zasadzie od obrazów widywanych w neuronach zwierząt kontrolnych. Cechą wyróżniającą w stosunku do neuronów kontrolnych było bardzo znaczne rozbudowanie kompleksu Golgiego w okolicach okołojądrowych, a nierzadko i w innych obszarach cytoplazmy oraz znaczne jego rozczłonowanie. Zachowany był jednak zawsze zasadniczy schemat jego budowy. W pobliżu końcowych zbiorników kompleksu Golgiego gromadziła się znaczna ilość pęcherzyków transportujących. Widywano również fragmenty zbiorników wypełnione materiałem o gęstości elektronowej przypominającej neurosekret oraz typowe, małe, obłonione ziarnistości neurosekrecyjne (ryc. 1). Ponadto w tej grupie doświadczalnej w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym obserwowano neurony znajdujące się zapewne w innej fazie wydzielniczej. Charakteryzowały się one cytoplazmą mniej obfitą w organelle, inną konfiguracją kompleksu Golgiego, obecne natomiast były w niej liczne lizosomy; neurotubule układały się z pewną regularnością, zwłaszcza w obwodowych częściach cytoplazmy. Niektóre mitochondria były obrzmiałe (ryc. 2).

W obu badanych jądrach neurosekrecyjnych spotykano pojedyncze ciemne neurony tzw. „dark neurons” o znacznych odchyleniach w stosunku do kontrolnych obrazów ultrastrukturalnych. Jądra tych neuronów były wrębiaste, znacznych rozmiarów, o nieregularnie rozmieszczonej heterochromatynie; jąderka często wykazywały cechy segregacji materiału jąderkowego. W otoczce jądrowej tworzyły się znaczne poszerzenia przestrzeni pomiędzy jej zewnętrzną i wewnętrzną błoną. Często otoczka jądrowa wykazywała ciągłość z kanałami siateczki śródplazmatycznej ziarnistej o elektronowo-przeziernych, krótkich i znacznie poszerzonych kanałach, skąpo pokrytych rybosomami. W tych neuronach wszystkie mitochondria były wyraźnie obrzmiałe. Obecne były również liczne lizosomy. Jeżeli w neuronach tego typu nieprawidłowości były bardziej nasilone, dochodziło do mikrowakuolizacji. Neuronom tym towarzyszyły komórki mikrogleju i wypustki astrocytarne w różnym stopniu obrzmiałe.

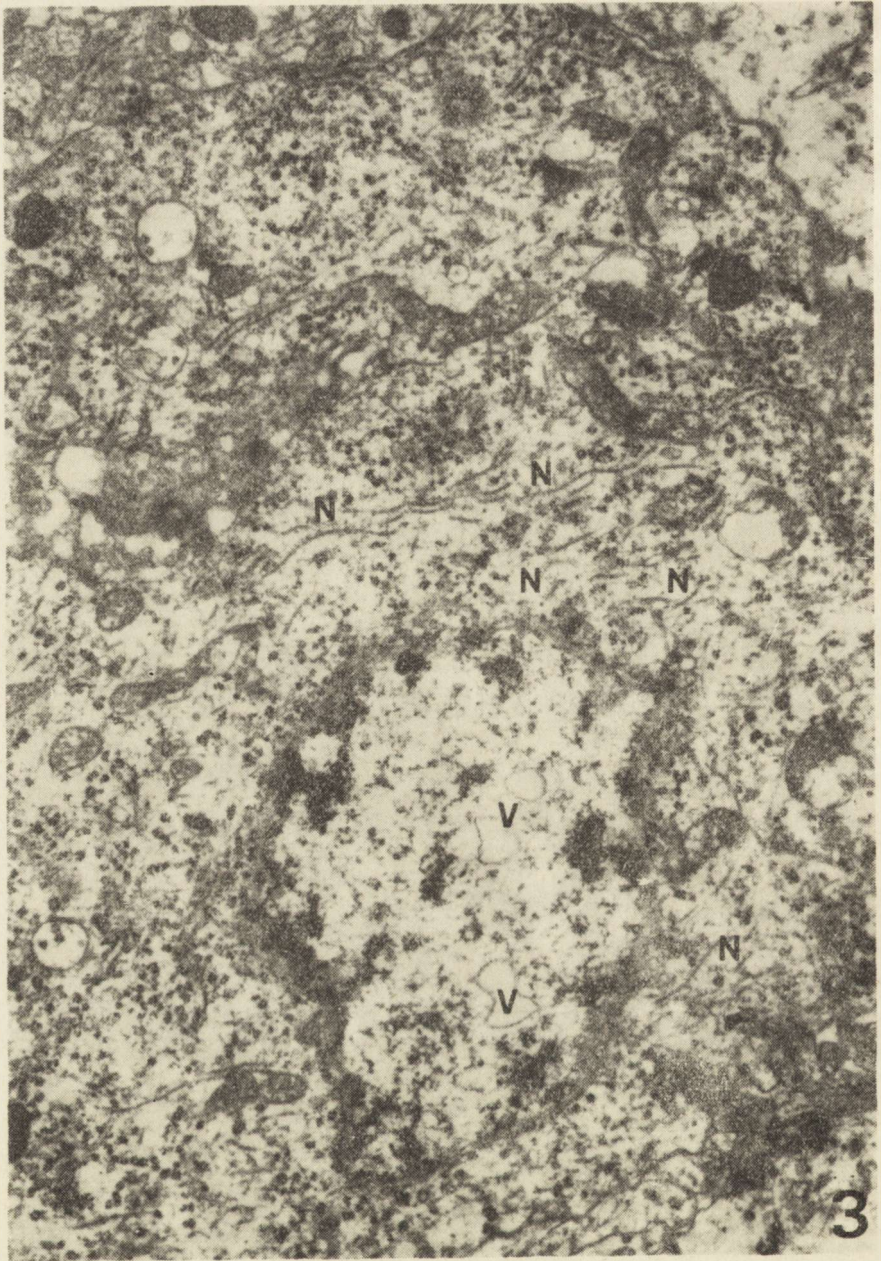
II grupa zwierząt doświadczalnych

U królików z 24-godzinnym przeżyciem po ostatniej hipertermii w obydwu badanych jądrach neurosekrecyjnych tylko sporadycznie spotykano tzw. „dark neurons” oraz neurony ulegające typowej mikrowakuolizacji. Przeważnie neurony nie wykazywały istotnych różnic w porównaniu z kontrolą. Do jedynych nieprawidłowości ultrastrukturalnych należy zaliczyć występowanie elektronowo przeziernych wakuoli na terenie jądra komórkowego w pojedynczych neuronach oraz zwiększenie elementów cytoskeletonu w postaci neurotubul oraz obecność przeważnie obrzmiałych mitochondriów i ciał wielopęcherzykowych (ryc. 3). Pozostałe neurony jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego miały



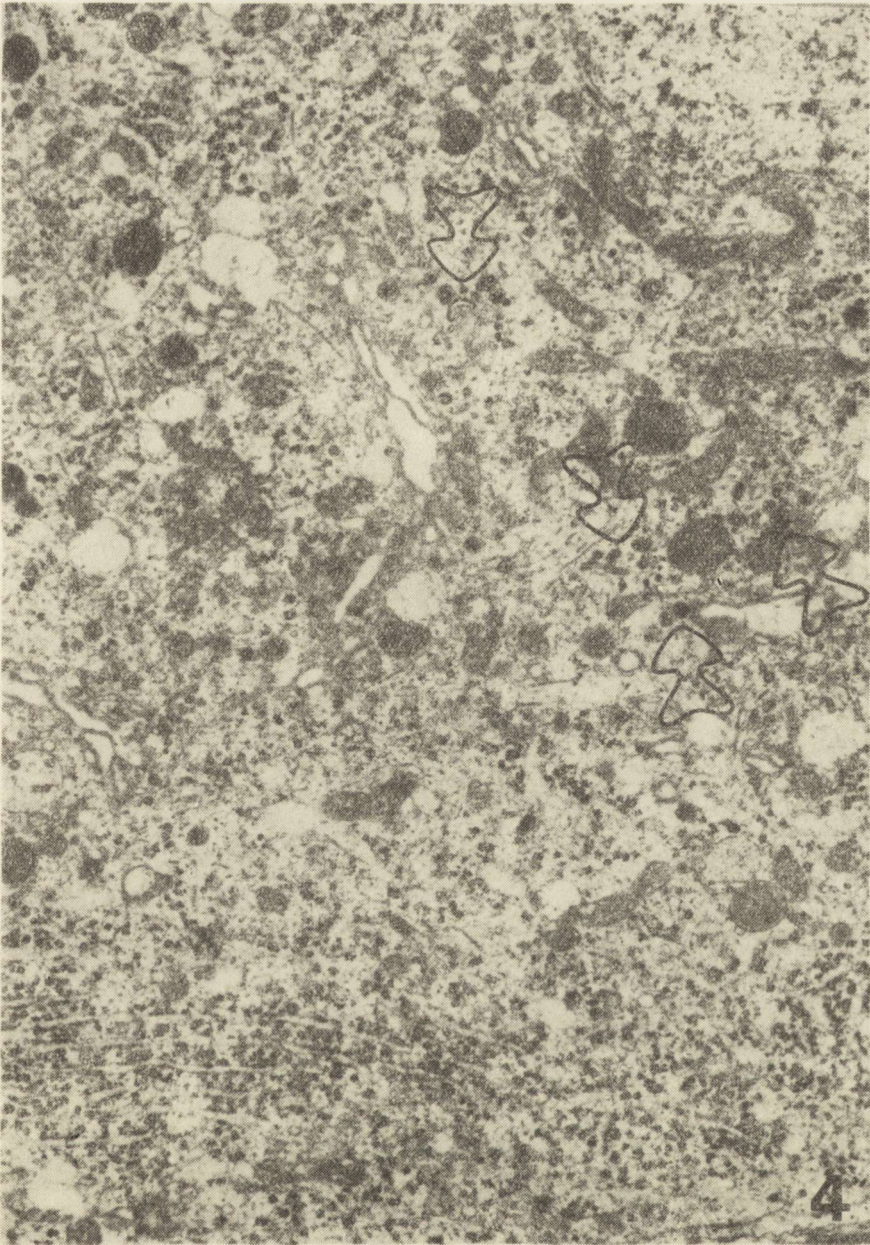
Ryc. 2. Królik bezpośrednio po stresie cieplnym. Jądro przykomorowe. We fragmencie cytoplazmy dobrze rozwinięty kompleks Golgiego (AG), typowe ziarnistości neurosekrecyjne nieliczne, widoczne lizosomy i ciała wielopęcherzykowe. W regionie aksonalnym obfite, równoległe układające się neurotubule (strzałki). Pow. 12 450 \times

Fig. 2. Rabbit directly after heat stress. Paraventricular nucleus. Very well developed Golgi complex (AG), not numerous neurosecretory granules, numerous neurotubules and multivesicular bodies in a fragment of the cytoplasm. Axon filled tightly with neurotubules (arrows). $\times 12\ 450$



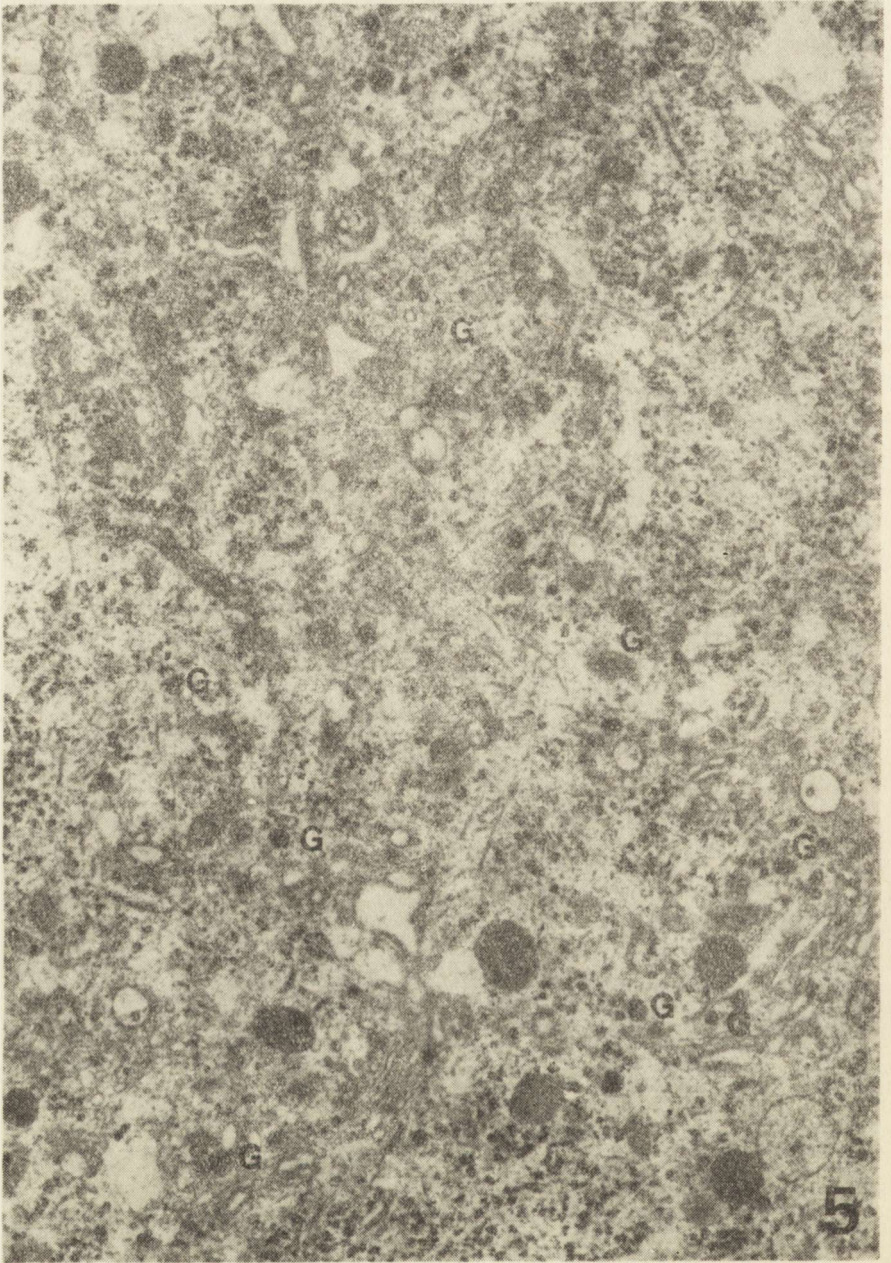
Ryc. 3. Królik 24 godziny po stresie cieplnym. Jądro nadwzrokowe. Jądro komórkowe o nieregularnych obrysach zawiera elektronowo-przeziernie wakuole (V). W cytoplazmie liczne neurotubule (N), widoczne są również ciała wielopęcherzykowe i niektóre mitochondria z cechami obrzmienia. Pow. 12 450 \times

Fig. 3. Rabbit 24 hours after heat stress. Supraoptic nucleus. Empty vacuoles (V) in the irregular nucleus. Numerous cytoskeleton elements (N) and multivesicular bodies in the cytoplasm. Some mitochondria are swollen. $\times 12\ 450$



Ryc. 4. Królik 24 godziny po stresie cieplnym. Jądro przykomorowe. W cytoplazmie neuronu dużo ziarnistości neurosekrecyjnych, lizosomów i mitochondriów. Niektóre mitochondria posiadają drobnoziarnistą, ciemną macierz. Strzałki pokazują różny rodzaj ziarnistości. Pow. 12 450 \times

Fig. 4. Rabbit 24 hours after heat stress. Paraventricular nucleus. Large number of neurosecretory granules, lysosomes and mitochondria, some of them with dark fine granular matrix. Arrows show abundant granules population. \times 12 450



Ryc. 5. Królik 24 godziny po stresie cieplnym. Jądro nadwzrokowe. Zwraca uwagę różnorodność ziarnistości neurosekrecyjnych (G). Pow. 12 450 \times

Fig. 5. Rabbit 24 hours after heat stress. Supraoptic nucleus. Accumulation of distinct neurosecretory granules (G) is visible. \times 12 450

podobne obrazy morfologiczne, pozwalając przypuszczać, że są to neurony znajdujące się w tej samej fazie cyklu sekrecyjnego i w podobnym stanie czynnościowym (ryc. 4, 5). Neurony o dużym jądrze komórkowym przeważnie z wgłębieniami posiadały obfitą cytoplazmę o dobrze rozwiniętej i bogatej w rybosomy siateczce śródplazmatycznej ziarnistej, tworzącej obfite skupienia przeważnie na obwodzie neuronów. Pozostałe obszary cytoplazmy wypełnione były obficie organellami komórkowymi przeważnie o prawidłowej budowie. Niektóre mitochondria posiadały ciemną i ziarnistą macierz. Licznie reprezentowane były neurotubule o różnej długości, nieregularnie rozrzucone, stanowiąc znaczący komponent cytoskeletonu komórki. Kompleks Golgiego był bardzo dobrze rozwinięty i rozczłonowany o ilościowej przewodzie drobnych pęcherzyków nad zbiornikami, co może być wykładnikiem aktywacji procesu sekrecyjnego w tych neuronach. W obszarze kompleksu Golgiego w populacji pęcherzyków przeważały pęcherzyki wypełnione elektronowo-gęstym materiałem, otoczone pojedynczą błoną i odpowiadające ziarnistościom neurosekrecyjnym. Spotykano je również licznie w pozostałych obszarach cytoplazmy, w której występowały także ziarnistości o mniej elektronowo-gęstej zawartości, czy też ziarnistości obłonione o elektronowo-gęstym rdzeniu i jasnym halo. Wszystkie opisane powyżej ziarnistości tylko nieznacznie różniły się wielkością, mieszcząc się w granicach od 100 do 160 nm w zależności od poziomu przekroju. Ilość, rozmieszczenie i obraz ziarnistości neurosekrecyjnych w neuronach tej grupy doświadczalnej różniły się zasadniczo od spotykanych u zwierząt kontrolnych. Licznie reprezentowane były również lizosomy.

OMÓWIENIE

Badania mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego u królików poddawanych przez 3 kolejne dni działaniu 3-godzinnej hipertermii wykazały aktywację większości obserwowanych neuronów. Opierając się na wynikach badań prowadzonych przez Yukitake i wsp. (1977) oraz na podstawie obserwacji własnych (Gajkowska 1981; Gajkowska, Borowicz 1981) można przyjąć, że są to neurony znajdujące się w fazie sekrecyjnej, o czym świadczy wzmożona synteza ziarnistości neurosekrecyjnych. Powtarzające się cechy morfologiczne neuronów obydwu badanych jąder pozwalają przypuszczać, że przeciągający się w czasie stres hipertermiczny wywołuje pewną synchronizację czynnościową neuronów. Liczne, jednoznaczne wyniki badań wykazały, że stres hipertermiczny powoduje odwodnienie organizmu. W tych warunkach dochodzić może do wzmożonej syntezy ziarnistości neurosekrecyjnych, co doprowadza do wzrostu zawartości wazopresyny w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz innych obszarach mózgu (Kirsch 1977, 1980; Choy, Watkins 1977, Negro-Vilar, Samson

1979; Piekut 1983). Według niektórych autorów wazopresyna tylko częściowo tworzy typowe ziarnistości neurosekrecyjne, pewna część hormonu jest transportowana w postaci wolnych form amorficznych (Kirsch 1980; Alonso i wsp. 1981). Zastanawiająca jest więc znaczna ilość i różnorodność ziarnistości neurosekrecyjnych obecnych w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego obserwowana w 24 godziny po przebytej hipertermii. Wiadomo, że neurony badanych jąder zawierają w pęcherzykach sekrecyjnych oprócz wazopresyny i oksytocyny, wraz z towarzyszącymi im neurofizynami, wiele innych jeszcze biologicznie czynnych białek, jak enkefalinę (Martin, Voigt 1981; Martin i wsp. 1983), dynorfinę (Waston i wsp. 1982; Whitnall i wsp. 1983), substancję P (Stoekel i wsp. 1982), reninę i angiotensynę II (Fuxe 1982) oraz cholecystokininę (Vanderhaegen i wsp. 1981; Martin i wsp. 1983). Nie można też wykluczyć, iż w tej różnorodnej populacji ziarnistości neurosekrecyjnych znajdują się również lizosomy pierwotne. Jak wiadomo, są one niezbędne do regulacji procesów neurosekrecyjnych na drodze krynofagii lub granulolizy (Boudier, Picard 1976; Alonso, Assenmacher 1983).

Przedstawione obrazy mikroskopowo-elektronowe sugerują, że przedłużający się stres hipertermiczny stymulował syntezę substancji hormonalnych, prowadząc do zwiększonej produkcji ziarnistości neurosekrecyjnych, a zapewne też do uaktywnienia regionu kompleksu Golgiego odpowiedzialnego za formowanie lizosomów. W większości obserwowanych neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego była zwiększona w porównaniu z kontrolą ilość neurotubul, stanowiących zasadniczy składnik cytoskeletonu komórki neurosekrecyjnej. Neurotubulom przypisuje się istotne znaczenie w transporcie ziarnistości neurosekrecyjnych z perykarionu komórki poprzez wypustkę osiową do znajdującego się w nerwowej części przysadki zakończenia nerwowego wchodzącego w skład tzw. narządu neurochemalnego (Alonso i wsp. 1981, 1985; Piekut 1983). Funkcja neurotubul w stosunku do ziarnistości neurosekrecyjnych uznana jest za identyczną do tej, którą spełniają one wobec pęcherzyków synaptycznych w niesekrecyjnych komórkach nerwowych (Hirokawa 1982; Westru i wsp. 1983). Neurotubule stanowią integralny składnik szkieletu cytoplazmy, stąd też ich ocenę ultrastrukturalną oraz funkcjonalną trzeba odnosić do całości cytoskeletonu (Groniowski 1981). Rozbudowa cytoskeletonu w komórkach neurosekrecyjnych jądra nadwzrokowego i przykomorowego po przedłużonej w czasie hipertermii wydaje się pozostać w ścisłym związku z jej wpływem na szybki transport aksonalny (Kim, Johnson 1982). Obecność neuronów o bogatym cytoskeletonie, nie zawierających prawie ziarnistości neurosekrecyjnych, wskazywać może na istnienie bardzo szybkiego transportu syntetyzowanych w neuronach ziarnistości neurosekrecyjnych do neuroprzysadki.

Uprzednio prowadzone badania nad wpływem krótkotrwałej wysokiej temperatury otoczenia na układ podwzgórzowo-przysadkowy królika wy-

kazały, że oprócz stymulacji neuronów i szybkiego wydzielania ziarnistości neurosekrecyjnych z neuroprzysadki, wstrząs cieplny powoduje pojawienie się nieprawidłowości w obrazach ultrastrukturalnych niektórych neuronów (obrzemie cytoplazmy i mikrowakuolizacja) (Gajkowska i wsp. 1985; Loesch i wsp. 1985). Podczas dłuższej trwającej hipertermii obserwuje się również przypadki mikrowakuolizacji neuronów w obydwu jądrach neurosekrecyjnych.

Na podstawie uzyskanych danych morfologicznych można wysunąć hipotezę, że przy przedłużającym się stresie cieplnym zwiększona zostaje synteza ziarnistości neurosekrecyjnych w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego. Ułatwia to funkcjonowanie organizmu w tych warunkach poprzez wpływ na gospodarkę wodną ustroju.

ЭЛЕКТРОННОМИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СУПРАОПТИЧЕСКОГО И ПАРАВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДРА КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОГО СТРЕССА

Резюме

В настоящей работе показана морфологическая картина супраоптического и паравентрикулярного ядра гипоталамуса кроликов, подвергаемых влиянию высокой температуры (38–39°) в течение 3 дней на 3 часа.

Полученные результаты показывают, нейроны обоих ядер активизируются и повышается синтез нейросекреторных гранул.

Исходя из результатов наших исследований можно заключить, что активация нейронов супраоптического и паравентрикулярного ядра, вызванного термическим стрессом играет важную роль в поддержании водного гомеостаза организма.

ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI IN THE HYPOTHALAMUS OF RABBIT AFTER PROLONGED HYPERTHERMIC STRESS

Summary

The study deals with the morphological picture of the supraoptic and paraventricular nuclei of hypothalamus of rabbits exposed to environmental temperature of 38–39° for 3 hours for 3 days.

The results indicate that there is a notable increase of activity of the neurons, leading to an increase of production of neurosecretory granules in both the hypothalamic nuclei. The role of the neurosecretory granules formed in the hypothalamus in a maintaining the water homeostasis in the organism is discussed.

REFERENCES

1. Alonso G., Gabrion J., Travers E., Assenmacher J.: Ultrastructural organization of action filaments in neurosecretory axons. *Cell Tiss. Res.*, 1981, 214, 323–341.

2. Alonso G., Czernichow P., Assenmacher I.: Reserpine inhibits of vasopressin from neural lobe of the pituitary in dehydrated rats. *Cell Tissue Res.*, 1985, 240, 375—380.
3. Alonso G., Assenmacher I.: Retrograde axoplasmic transport of neurosecretory material. An immunocytochemical and electronmicroscopis study of transected axons in normal and colchicine-treated rats. *Cell Tissue Res.*, 1983, 233, 183—196.
4. Boudier J., Picard D.: Granulolysis in neurosecretory neurons of the rat supraoptic posthypophysial system. *Cell Tissue Res.*, 1976, 172, 39—58.
5. Choy V., Watkins W.: Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Distribution of neurophysin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat. *Cell Tissue Res.*, 1977, 180, 467—490.
6. Fuxe K., Agnati L. F., Ganten D., Lang R. E., Poulsen K., Infantillina F.: Morphometric evaluation of the coexistence of renin-like and oxytocin-like immunoreactivity in nerve cells of the paraventricular hypothalamic nucleus of the rat. *Neurosci. Lett.*, 1982, 33, 19—24.
7. Gajkowska B.: Badania ultrastrukturalne układu podwzgórzowo-przysadkowego mózgu szczura w stresie hipotermicznym. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 21—31.
8. Gajkowska B., Borowicz J.: Wpływ egzogennej wazopresyny na układ podwzgórzowo-przysadkowy mózgu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 473—485.
9. Gajkowska B., Loesch A., Pluta R.: The effect of high ambient temperatures on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 55—69.
10. Groniowski J.: Ultrastrukturalne elementy ładu wewnątrzkomórkowego. *Patol. Pol.*, 1981, 32, 449—460.
11. Hirokawa N.: Cross-linker system between neurofilaments, microtubules and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell Biol.*, 1982, 94, 129—142.
12. Kim J. H., Johnson J. L.: The effects of hyperthermia on fast axoplasmic transport in rat sensory fibers. *Brain Res.*, 1982, 237, 215—221.
13. Kirsch B.: Electronmicroscopic immunocytochemical study on the vasopressin-containing neurons of the thirsting rat. *Cell Tissue Res.*, 1977, 184, 237—247.
14. Kirsch B.: Nongranular vasopressin synthesis and transport in early stages of rehydration. *Cell Tissue Res.*, 1980, 207, 89—107.
15. Loesch A., Gajkowska B., Pluta R.: The effect of high ambient temperatures in the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 70—81.
16. Martin R., Voigt K. V.: Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature*, 1981, 289, 502—504.
17. Martin R., Geis R., Holl R., Schafer M., Voigt K. V.: Co-existence of unrelated peptides in oxytocin and vasopressin terminals of rat neurohypophyses: Immunoreactive methionine⁵-enkephalin-, leucine⁵-enkephalin- and cholecystokinin-like substances. *Neuroscience*, 1983, 8, 213—227.
18. Negro-Vilar A., Samson W.: Dehydration induced changes in immunoreactive vasopressin levels in specific hypothalamic nuclei. *Brain Res.*, 1979, 169, 585—589.
19. Piekut D.: Ultrastructural characteristics of vasopressin-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Cell Tissue Res.*, 1983, 234, 125—134.
20. Stoekel M. E., Porte E., Klein M. J., Cuello A. C.: Immunocytochemical localization of substance P in the neurohypophysis and hypothalamus of the mouse

compared with the distribution of other neuropeptides. *Cell Tissue Res.*, 1982, 223, 533—544.

21. Vanderhaegen J. J., Lotstra F., Vandesande F., Dierickx K.: Coexistence of cholecystokinin and oxytocin-neurophysin in some magnocellular hypothalamo-hypophyseal neurons. *Cell Tissue Res.*, 1981, 221, 227—231.
22. Waston S. J., Akil H., Foschli W., Goldstein A., Zimmerman E., Nilaver G., Van Wiersma Greidanus T. B.: Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurons. *Science*, 1982, 216, 85—87.
23. Westrum L. E., Gray E. G., Burgoyne R. D., Barron J.: Synaptic development and microtubule organization. *Cell Tissue Res.*, 1983, 231, 93—102.
24. Whitnall M. H., Gainer H., Cox B. M., Molineaux C. J.: Dynorphin-A-(1—8) is contained within vasopressin neurosecretory vesicles in rat pituitary. *Science*, 1983, 222, 1137—1139.
25. Yukitake Y., Taniguchi Y., Kurosuni K.: Ultrastructural studies on the secretory cycle of the neurosecretory cells and formation on Herring bodies, in the paraventricular nucleus of the rat. *Cell Tissue Res.*, 1977, 177, 1—8.

Adres autorki: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Dworkowa 3, 00-784 Warszawa

Przemysław Nowacki, Jerzy Kulczycki, Jolanta Cecerko, Krystyna Honczarenko: Spread of cerebral gliomas in patients of various age	399
Maria Dąbbska, Danuta Maślińska, Jolanta Tubylewicz: Controversial effect of endoxan administration on maturing rabbit brain	407
Barbara Gajkowska: Electron microscopic study of supraoptic and paraventricular nuclei in the hypothalamus of rabbit after prolonged hyperthermic stress	417

СОДЕРЖАНИЕ

Лех Ивановски: Ультраструктура сосудистого сплетения	291
Томаш Борковски, Ирмина Б. Зельман, Барбара Бич: Аминоациляция тРНК в мозге кролика пт I. Активность синтетаз аминокислито-тРНК	305
Данута Есенек, Болеслав Флорянич, Дарюш Сава, Ирена Борковска: Аминоациляция тРНК в мозге кролика пт II. Уровень аминокислито-тРНК в мозге кролика <i>in vivo</i>	315
Миленка Лалре-Каменовска, Мария Домбска: Миелинизация некоторых путей височной доли в норме и в хронических заболеваниях раннего детского периода	323
Мечислав Вендер, Зофия Адамчевска-Гонцажевич, Эугенюш Срочински, Анджей Журавски: Влияние интоксикации на свободные жирные кислоты мозга развивающихся крыс, получающих диету с различным содержанием липидов	341
Ирена Небруй-Добош, Мария Барциковска-Литвин, Янина Рафаловска: Миелин белого вещества в размягчении мозга в старческом возрасте	351
Мирослав Я. Моссаковский, Халина Вэйнраудер: Кислый фибриллярный белок глии и белок S100 в патологических формах астроцитов в болезни Вильсона	365
Тереса Залевска, Ежи В. Лазаревич: Влияние кальция на биосинтез белка в постмитохондриальной фракции мозга крысы	377
Кристина Ренкавек, Эльжбета Кида: Ультраструктурные изменения в органотипической культуре ткани полосатого тела крысы под влиянием сывороток больных с болезнью Гунтингтона	387
Пржемыслав Новацки, Ежи Кульчицки, Иоланта Цецерко, Кристина Хончаренко: Распространение мозговых глиом у больных в разном возрасте	399
Мария Домбска, Данута Маслинска, Иоланта Тубылевич: Многозначные последствия влияния циклофосфамида на развивающийся мозг кролика	407
Барбара Гайковска: Электронно-микроскопические исследования супраоптического паравентрикулярного ядра гипоталамической области кролика в протягивающемся гипертермическом стрессе	417

SPIS TRESCI

Lech Iwanowski: Ultrastruktura spłotu naczyńiówkowego	291
Tomasz Borkowski, Irmina B. Zelman, Barbara Bicz: Aminoacylacja tRNA w mózgu królika pt. I. Aktywność aminoacylo-tRNA syntetaz	305
Danuta Jesionek, Bolesław Floriańczyk, Dariusz Sawa, Irena Borkowska: Aminoacylacja tRNA w mózgu królika pt. II. Poziom aminoacylo-tRNA w mózgu królika <i>in vivo</i>	315
Milena Laure-Kamionowska, Maria Dąbska: Mielinizacja wybranych dróg płata skroniowego w normie i w przewlekłych schorzeniach okresu wczesnodziecięcego	323
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Eugeniusz Sroczyński, Andrzej Zórawski: Wpływ zatrucia cyjankami na obraz wolnych kwasów tłuszczowych mózgu szczura rozwijającego się na diecie z różną zawartością lipidów	341
Irena Niebrój-Dobosz, Janina Rafałowska, Maria Barcikowska-Litwin: Mieli- lina w mózgu z zawałem u pacjentów w podeszłym wieku	351
Mirosław J. Mossakowski, Halina Weinrauder: Kwaśne włókienkowe białko glejowe oraz białko S100 w patologicznych postaciach astrocytów w cho- robie Wilsona	365
Teresa Zalewska, Jerzy W. Łazarewicz: Wpływ wapnia na biosyntezę białka we frakcji postmitochondrialnej mózgu szczura	377
Krystyna Renkawek, Elżbieta Kida: Zmiany ultrastrukturalne w organo- typowej hodowli prądkowia szczura pod wpływem surowic od chorych z chorobą Huntingtona	387
Przemysław Nowacki, Jerzy Kulczycki, Jolanta Cecerko, Krystyna Honcza- renko: Rozprzestrzenianie się glejaków mózgu u chorych w różnym wieku Maria Dąbska, Danuta Maślińska, Jolanta Tubylewicz: Wieloznaczne skutki oddziaływania endoksanu na dojrzewający mózg królika	399
Barbara Gajkowska: Badania mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzroko- wego i jądra przykomorowego podwzgórza królika w przedłużającym się stresie hipertermicznym	417

CONTENTS

Lech Iwanowski: Ultrastructure of choroid plexus	291
Tomasz Borkowski, Irmina B. Zelman, Barbara Bicz: Aminoacylation of tRNA in pt rabbit brain. I. Aminoacyl-tRNA synthetases activity	305
Danuta Jesionek, Bolesław Floriańczyk, Dariusz Sawa, Irena Borkowska: Aminoacylation of tRNA in pt rabbit brain. II. Aminoacyl-tRNA level in rabbit brain <i>in vivo</i>	315
Milena Laure-Kamionowska, Maria Dąbska: Myelination of some selected tracts of temporal lobe in normal subjects and in chronic diseases of children	323
Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Eugeniusz Sroczyński, Andrzej Zórawski: Effect of cyanide intoxication on free fatty acid pat- tern in the brain of rats developing on a diet with various amounts of lipids	341
Irena Niebrój-Dobosz, Janina Rafałowska, Maria Barcikowska-Litwin: Brain myelin in senile patients with brain infarction	351
Mirosław J. Mossakowski, Halina Weinrauder: Glial fibrillary acidic protein and S100 protein in abnormal astrocytes in Wilson's disease	365
Teresa Zalewska, Jerzy W. Łazarewicz: Effect of calcium on protein synthe- sis in rat brain postmitochondrial fraction	377
Krystyna Renkawek, Elżbieta Kida: Ultrastructural alterations in rat stri- atum <i>in vitro</i> induced by sera from patients with Huntington's disease	387

Index 36668