

2092 Kopycki

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 25

1987

ZESZYT 1

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 25

1987

ZESZYT 1

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänish (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. 49-82-79, 49-70-18

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1987.
Nakład: 600 egz. Objętość: ark. wyd. 8,20, ark. druk. 6,63, ark.
A₁-9. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do skła-
dania 1986.12.16. Podpisano do druku 1987.05.28. Druk ukończono
w czerwcu 1987. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 1610/86.

C-7. Cena zł 180.—

ADAM KUNICKI

PHENOMENON OF TUMOR REGRESSION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa

In 1974, a conference devoted to the problem of spontaneous regression of cancer was held in Baltimore. Tumor regression was defined as its partial or complete disappearance in the absence of any treatment or in the presence of therapy considered by modern standards as greatly inadequate. It is not required that regression be permanent, because it appeared that the explanation of temporary regression would be just as important as the cause of a permanent one. It was considered that retardation or inhibition of growth belong perhaps to the same category of phenomena.

In the opening address Cole (1976) presented 176 examples of spontaneous regression of cancer published in the world medical literature from 1900—1960 and added to these numerous cases from his own collection and those of his colleagues. The four most common classes of tumors in which regression was observed, were *carcinoma* of the kidney (31), *neuroblastoma* (29), malignant melanoma (19), and *choriocarcinoma* (19). In the collection presented by Cole carcinomas of 18 organs were represented. The only tumors of neuroectodermal origin were neuroblastomas of the sympathetic nervous system, that is tumors originating and growing outside the central nervous system. No proven specific cause of tumor regression was presented but it was postulated that the following mechanisms could be taken into consideration: immunologic reaction, elimination of carcinogens, trauma (altering the antigen-antibody relationship), hormones, irradiation, fever, drugs or chemicals. Immunologic reactions seem to offer the best explanation of the phenomenon and the role of humoral immunity seems to be more impressive than that of cellular immunity.

In this report I will try to show that the behaviour of some tumors of the central nervous system can be also interpreted as a phenomenon of spontaneous regression of neoplasms.

Brain stem gliomas

In many reported groups of patients treated either by irradiation alone or combined with surgical decompression there are some patients who recover from their illness and regain the ability to lead a useful life for many years. Pierce (1950) reported that 5 out of 15 patients survived as long as 13 years after irradiation. Patrick and al. (1958) in a collection of 24 cases observed a mean survival time of 9 months, but the survival of three patients was 3, 5 and 13 years. Redmond (1961) stated that out of 30 patients irradiated 7 were alive in very good condition for 5 years or longer. Olivecrona (1967) mentioned that among 26 cases of gliomas of the medulla oblongata treated by decompression and not subjected to irradiation there were 7 patients who lived 10—20 years. Out of 71 patients reported by Buchard (1966) 3 lived and were self-dependent for over 20 years. Three patients described by Hoffman (1980) survived for 7, 8, 15 years after partial removal of the tumor combined with postoperative irradiation. Five patients who were not subjected to postoperative irradiation have been under CT observation for 1—5 years and in no case was expansion of the tumor noted. To these cases I have added the description of three other cases verified surgically and histopathologically (1983). In two patients a clinical cure was achieved by partial removal of the tumor and subsequent irradiation. One of these patients is still employed in a public library, 32 years after the operation and the second is also professionally active 25 years after the operation. She is married and has a 5-year-old son. In the third case a biopsy specimen was taken for examination, surgical decompression was performed and no radiation therapy was applied. Twenty three years after the operation the patient died suddenly of heart infarction. It may be concluded from the quoted reports that a small number of patients treated for brain stem tumor by irradiation alone or combined with surgical decompression, or by surgical decompression and no irradiation regain the ability to lead a useful life for many years although the therapy is considered greatly inadequate by modern standards.

Supra- and infratentorial gliomas

Late recurrence of supratentorial and infratentorial gliomas can be also regarded as the result of temporary inhibition of tumor growth. Olivecrona (1950) reported that in his material recurrence of oligodendrogliomas usually appeared 2—3 years after the operation, but in one case the second operation was performed 11 years after the removal of the primary tumor. In one case treated by Horrax (1950) operation for recurrence was carried out 27 years after the first surgical interven-

tion. Bucy (1968) presented a follow-up of cerebellar tumors operated on by P. Bailey. In some cases useful survival lasted more than 30 years although the tumor had not been completely removed. Bernel (1972) reported two cases of late recurrence in a child of cerebellar astrocytoma 28 years after the operation. Budka (1979) described malignant evolution of a child's cerebellar astrocytoma 28 years after the operation. In a series of 292 cerebellar astrocytomas reviewed by Kunicki and Czerwiński (1980) late recurrence of the tumor in two cases took place 11 and 24 years after the operation.

It is difficult to present a univocal explanation of the above quoted facts. One can speculate that after the primary tumor had been eradicated the second tumor may be a new growth without any connection with the tumor which had been removed many years before. The second conception admits that there really is recurrence of the primary tumor. It is impossible to prove which alternative is true, but it is easier to accept the existence in the brain tissue of dormant neoplastic cells the ability of which to multiply was inhibited by immunological or other factors. In the majority of tumors infiltrating the brain, presumably total removal is never or very rarely microscopically total. The situation can be similar to that in general oncology in which, according to Weiss (1976), dissemination of tumor cells and their long persistence in the tissues of patients with surgically cured cancer are perhaps more the rule than the exception. It can be also true in regard to the tumors of glial origin.

Neurinoma of the acoustic nerve

Cushing used to remove acoustic tumors "intracapsularly" what means that what is called the capsule of the tumor, which in reality is its part, was left *in situ*. Similarly, the stalk of the tumor in the *porus acusticus internus* may have been left behind and was the possible cause of recurrence. In spite of this, about 25% of 176 cases of his series were alive without serious disability 5 to 25 years after the operation. German (1961) in the follow-up study of Cushing's patients points out that 24 patients from this series were still alive 30 years after the operation. If we subtract from this number 11 patients with "nearly total" extirpation the remaining 13 patients were alive 30 years after an incomplete operation. Kunicki and Wicentowicz (1971) reported follow-up of 125 patients operated on for acoustic tumor. In 28 cases the tumor was only partially removed. Nine patients of this group were alive and well 5, 6, 8, 11, 12, 13, 15, and 28 years after the operation. One patient, belonging to this group presented a history of arterial hypertension and heart failure before operation. At the time of neuro-

surgical intervention, it was necessary to shorten the operation because of cardiovascular insufficiency, so only part of the tumor was removed. The patient recovered well, regained his working capacity as director of an important Medical Institution and held this post for 28 years until his death of heart infarction. Olivecrona (1950) reported 59 survivors after incomplete removal of the tumor. The average survival of 25 patients of this group was 13 years and 12 patients considered themselves to be completely well with full earning capacity. Four patients have been followed-up for an average of 19.5 years. The author came to the conclusion that "some acoustic tumors grow imperceptibly or cease to grow after incomplete removal". Pennybacker and Cairns (1950) reported that 40 of 85 patients after an intracapsular operation were known to be at full work or leading normal life up to 10 years after operation.

Meningiomas

In our own material of meningiomas temporary growth inhibition or retardation has been manifested by late recurrence 10, 20 years and even more after the operation of the primary tumor. It is true that we must take into consideration the origin of the second tumor from a new nest unnoticed during the first operation, but it is also difficult to reject the possibility that the tumor originates from microscopic clusters of neoplastic cells left in the wall of a venous sinus, in the bed of the tumor or at its attachment. The fate of these cells is dependent on many factors: their proliferation ability, local conditions favourable or not for cell proliferation (blood supply) and on immunological activity of the host. It is assumed that immunological factors are most important for regression of tumor remnants. Regrowth of the tumor from microscopical clusters of cells would in such conditions indicate weakness of the immune response.

It is proved by the above quoted data that among tumors of the central nervous system, belonging to the benign group, the phenomenon of regression or temporary growth inhibition does exist. The immunological reaction of the host is regarded as being the most important factor responsible for permanent or temporary growth inhibition of the tumor. On the grounds of this conclusion it seems justified to formulate the following recommendation: After removal of a tumor which recurs according to clinical experience, stimulation of the immune reaction by means of various vaccines (BCG) or other methods used in oncology should be applied. It is particularly indicated when, in the operators opinion, the tumor had been completely removed, because in such a situation the possibility of destroying the small, microscopical tumor remnants by immunological factors is especially high.

ZJAWISKO REGRESJI GUZÓW OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Streszczenie

Rozpatrzenie odległych wyników leczenia łagodnych guzów ośrodkowego układu nerwowego skłania do przekonania, że niektóre z nich ulegają regresji, zwolnieniu lub zahamowaniu wzrostu przy leczeniu, które u większości pacjentów bywa nieskuteczne. Zjawisko to stwierdzono w przypadku guzów pnia mózgu, glejaków nad- i podnamiotowych, guzów nerwu VIII i oponiaków. Przyczyny tego zjawiska mogą być zapewne różne, lecz wśród nich odporność przeciwnowotworowa, jeśli nawet nie jest jedyną przyczyną, jest tą właśnie, na którą możemy czynnie zadzia-
 łać przez stosowanie środków pobudzających w postaci BCG lub innych zalecanych przez onkologię. Wydaje się słuszne zalecenie takiego postępowania po tzw. doszczętnym usunięciu guza, z myślą o zniszczeniu takiego postępowania po tzw. doszczętnym usunięciu guza, z myślą o zniszczeniu mikroskopowych pozostałości guza w przyczepie, łożysku lub w tkance narządu.

ЯВЛЕНИЕ РЕГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Рассмотрение отдалённых результатов лечения незлокачественных опухолей центральной нервной системы приводит к убеждению, что некоторые из них подвергаются регрессии, замедлению или затормаживанию роста в результате лечения, которое у большинства пациентов было неэффективным. Явление это обнаружено в случаях опухолей ствола мозга, глиом над- и подпалаточных, опухолей VIII нерва и менингиом. Вероятно, причины этого явления могут быть различными, однако, среди них противоопухолевой иммунитет, если и не является единственной причиной, есть именно той, на которую можно активно подействовать, используя возбуждающие средства в форме BCG или других, рекомендуемых онкологией. Представляется правильной рекомендация такого действия после т. н. полного удаления опухоли в целях уничтожения микроскопических остатков опухоли в месте ее прикрепления, ложе или ткани органа.

REFERENCES

1. Bernel W.: Two cases of late recurrence of a childhood cerebellar astrocytoma. *J. Neurosurg.*, 1972, 37, 470—474.
2. Buchard J.: Radiation therapy of tumors and diseases of the nervous system. Kimpton, London, 1966.
3. Bucy P.: Astrocytoma of the cerebellum. *Arch. Neurol. Chic.*, 1968, 8, 14—19.
4. Budka H.: Malignant evolution of a childhood cerebellar astrocytoma. *Acta Neurol.*, 1979, 32, 139—146.
5. Cole H. W.: Spontaneous regression of cancer and the importance of finding its cause. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 1976, 44, 5—9.
6. German W.: *Clinic Neurosurg.*, 1961, 7, 21. Cit. after Northfield. W.: The surgery of the nervous system. Blackwell, London, 1973.
7. Hoffman H. et al.: A clinical and pathological distinct group of benign brain stem gliomas. *J. Neurosurg.*, 1980, 7, 243—248.
8. Horrax G.: cit after Olivecrona: *Handbuch der Neurochirurgie*. Bd. 4/4, 1950.
9. Kunicki A.: Some remarks on the mode of spread of primary benign brain stem tumors. *Zbl. Neurochir.*, 1983, 44, 185—192.

10. Kunicki A., Czerwiński L.: Bezpośrednie i odległe wyniki leczenia gwiazdków mózdzku. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1980, 14, 515—522.
11. Kunicki A., Wicentowicz Z.: Early and late results of operative treatment of tumors of the acoustic nerve. *Acta Med. Pol.*, 1971, 12, 47—53.
12. Patrick F. et al.: Brain stem tumors in children. *Neurology*, 1958, 8, 1—7.
13. Pierce C. B.: Role of the radiation therapy in the control of malignant neoplasms of brain stem. *Radiology*, 1950, 55, 335—337.
14. Pennybacker J. B., Cairns H.: Results in 130 cases of acoustic neurinoma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1950, 13, 272—277.
15. Redmond J. et al.: Roentgen therapy of pontine gliomas. *Am. J. Roentgenol. Radium Therapy Nucl. Med.*, 1961, 86, 644—648.
16. Weiss D.: Neoplastic diseases and tumor immunology from the perspective of host-parasite relationships. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 1976, 44, 115—122.

Author's address: Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

PRZEMYSŁAW NOWACKI

POCHODZENIE I LOKALIZACJA KOMÓREK BIAŁACZKOWYCH W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM W BIAŁACZKACH NIELIMFOBLASTYCZNYCH U DOROSŁYCH

Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów
Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

Ze wzrostem zachorowalności na białaczki zwiększyła się częstość występowania nacieków białaczkowych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) (Nies i wsp. 1965; Cyklis i wsp. 1971). Zadaniem Litterala i Malmuda (1955) nacieki białaczkowe w OUN są skutkiem miejscowego powstawania i rozmnażania się komórek białaczkowych w tkankach pochodzących ze środkowego listka zarodkowego. Inni autorzy sądzą, że komórki białaczkowe docierają do mózgu i rdzenia przez ciągłość ze szpiku kości czaszki oraz kręgow (Dibley i wsp. 1975; Azzarelli, Roesman 1977). Istnieje wreszcie teoria, według której nacieki w OUN pochodzą z komórek białaczkowych krążących we krwi i przedostających się z naczyń do tkanki nerwowej (Freireich i wsp. 1960; Shaw i wsp. 1960; Nowacki i wsp. 1982). Na takie pochodzenie komórek białaczkowych w OUN może wskazywać większa ilość nacieków w przestrzeniach okołonaczyniowych i tkance nerwowej w przypadkach z wysoką leukocytozą we krwi.

Nie jest wyjaśnione również zjawisko rozprzestrzeniania się komórek białaczkowych w OUN. Niektórzy autorzy sądzą, że komórki te wykazują zdolność wędrówki wzdłuż przydanki naczyń z ognisk hematopoezy (Price 1979) lub przechodzenia poprzez ścianę naczynia z jego światła (Hoagland, Perry 1979). West i wsp. (1972) oraz Rokicka-Milewska (1974) sądzą, że komórki białaczkowe wydostają się poza naczynia wyłącznie w przypadku skazy krwotocznej.

Nie ma też zgodnej opinii co do okresu choroby, w którym komórki białaczkowe gromadzą się w OUN. West i wsp. (1972) sądzą, że przenikają one do układu nerwowego w początkowym okresie choroby. Tartaglia (1973) wskazuje na możliwość gromadzenia się ich w różnych jej fazach, a Nadel i Nelson uważają, że występują one tu dopiero w koń-

cowym okresie w wyniku załamania się mechanizmów obronnych układu nerwowego.

Celem przeprowadzonych badań była próba lepszego poznania mechanizmów gromadzenia się i zachowania komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich oraz związku tych zjawisk z określonym stadium choroby.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano u 100 osób obojga płci w wieku 17—74 lata (\bar{x} = 40,7 lat) zmarłych w Klinice Hematologii PAM z powodu białaczki w latach 1976—1984. U 63 osób rozpoznano ostrą białaczkę mieloblastyczną, a u 13 — ostrą białaczkę mielomonocytową, a u 24 — przełom blastyczny przewlekłej białaczki szpikowej (PBPBS). Podział białaczek według FAB (France-American-British Group) (Bennett i wsp. 1976) został wprowadzony w Klinice w 1984 r., a prawie cały materiał został zebrany w okresie wcześniejszym, tak więc w obecnym opracowaniu podziału tego nie zastosowano.

Przyjęto podział na grupy przypadków w zależności od tego, w którym okresie choroby leukocytoza we krwi osiągała lub przekraczała 50 G/L: grupa A — wzrost leukocytozy w początkowym okresie choroby (13 chorych), grupa B — w środkowym okresie choroby (10 chorych), grupa C — w końcowym okresie choroby łącznie z dniem zgonu chorego (25 chorych), grupa D — przez cały czas trwania choroby (22 chorych). W grupie E zawarto przypadki (30), w których leukocytoza nie przekraczała 20 G/L.

Materiał utrwalono w 8% roztworze formaliny. Preparaty z bloczków parafinowych barwiono hematoksyliną-eozyną (H—E), fioletem krezyłu (FK) oraz według metod Heidenhaina i Holzera. W celu uzyskania porównywalnych wyników badania neuropatologicznego wprowadzono następujące oznaczenia: Leukostaza — +++ leukostaza we wszystkich naczyniach powodująca całkowite zamknięcie ich światła, ++ leukostaza w większości naczyń powodująca całkowite lub częściowe zamknięcie ich światła, + leukostaza w pojedynczych naczyniach, powodująca częściowe zamknięcie ich światła. Okołonaczyniowe nacieki białaczkowe — +++ nacieki wypełniające przynajmniej połowę przestrzeni okołonaczyniowej w wielu okolicach OUN, ++ nacieki zajmujące mniej niż połowę przestrzeni okołonaczyniowej, występujące w kilku okolicach OUN, + nacieki składające się z kilku do kilkunastu komórek wokół pojedynczych naczyń. Nacieki białaczkowe przekraczające okołonaczyniową barierę glejową — ++ ponad 3 nacieki w jednym przypadku, + 1—3 nacieków w jednym przypadku. Nacieki białaczkowe w oponach

miękkich — +++ gęste nacieki występujące równomiernie w oponach i jamie podpajęczynówkowej, ++ wyraźne nacieki, zagęszczające się lub występujące wyłącznie wokół naczyń oponowych, + drobne nacieki wokół pojedynczych naczyń oponowych.

Weryfikację statystyczną przeprowadzono za pomocą testu porównującego częstości — dla dwu prób niezależnych (Góralski 1976).

WYNIKI

I. Typ białaczki a obecność komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich

Stwierdzono częstsze, jednak statystycznie nieistotne, występowanie nacieków białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich chorych zmarłych z powodu PBPBS, niż u chorych zmarłych z powodu ostrej białaczki mieloblastycznej i ostrej białaczki mielomonocytozowej.

II. Wysokość leukocytozy we krwi pod koniec życia chorego a nasilenie leukostazy w mózgowiu i oponach miękkich

Leukostaza w mózgowiu i oponach miękkich była tym wyraźniejsza, im wyższa była leukocytoza we krwi pod koniec życia chorego, przy czym w przypadkach z leukocytozą do 15 G/L leukostazy nie obserwowano. Najwyraźniej leukostaza występowała w jądrach podstawy i w istocie białej kresomózgowia, najrzadziej w opuszce. Leukostazą były objęte głównie naczynia włosowate i drobne naczynia żyłne. W tętnicach leukostaza pojawiała się dopiero przy bardzo wysokiej leukocytozie (tab. 1).

III. Czas utrzymywania się wysokiej leukocytozy w okresie bezpośrednio poprzedzającym zgon chorego a nasilenie leukostazy w mózgowiu i oponach miękkich

Nasilenie leukostazy w mózgowiu i oponach miękkich było nie tylko tym wyższe im wyższa była leukocytoza, ale także wykazywało zależność od czasu jej utrzymywania się (tab. 2).

IV. Nasilenie leukostazy, a rodzaj i nasilenie nacieków białaczkowych w mózgowiu

Najczęstszym zjawiskiem w mózgowiu była leukostaza (ryc. 1). Okołonaczyniowe nacieki białaczkowe (ryc. 2, 3, 4) spotykano rzadziej, a nacieki przekraczające okołonaczyniową barierę glejową (ryc. 5) zaledwie w 4 przypadkach. Nacieki były ściśle związane z nasileniem leukostazy, w żadnym z przypadków nie występowały bez jej obecności (tab. 3).

Tabela 1. Wysokość leukocytozy we krwi pod koniec życia chorego, a nasilenie leukostazy w mózgowiu i oponach miękkich
 Table 1. Leukocytosis in peripheral blood at the end of patient's life in relation to intensity of leukostasis in brain and leptomeninges

Leukocytoza Leukocytosis G/L	nasilenie ¹⁾ intensity ¹⁾	Leukostaza w naczyniach Leukostasis in blood vessels						typ naczyń type of vessels	średnica najczęściej zaję- tych naczyń diameter of most frequently occupied vessels (μ m)
		Rozmieszczenie ²⁾ Distribution ²⁾							
		kresomóz- gowie telencephalon	j. podstawy basal ganglia	most pons	opuszka medulla	mózdzek cerebellum	opony meninges		
16.-50.	0 +	II	I	II	III	IV	III	włosowate capillary	10-30
51.-100.	++ +	II	I	III	IV	II	II	włosowate capillary żylny venous włosowate capillary	10-30 do 50 8-30
101.-200.	++ +++ +	II	I	III	IV	II	I	żylny venous tętnicze arterial	do 70 do 50
Ponad 200. Above 200.	+++	równomierna we wszystkich strukturach uniform in all structures						wszystkie naczynia all vessels	

- 1) + - leukostaza w pojedynczych naczyniach
leukostasis in single blood vessels
 ++ - leukostaza w większości naczyń z całkowitym lub częściowym zamknięciem ich światła
leukostasis in majority of blood vessels with whole or partially closed lumen
 +++ - leukostaza we wszystkich naczyniach z całkowitym zamknięciem ich światła
leukostasis in all blood vessels with totally closed lumen

2) Cyfry rzymskie oznaczają kolejność okolic pod względem nasilenia w nich leukostazy. Jednakowe cyfry w rzędach oznaczają, że w danych okolicach leukostaza występowała w podobnym nasileniu

Roman numerals indicate sequence of regions in respect to intensity of leukostasis. Identical numerals in rows indicate that in those regions leukostasis was of similar intensity

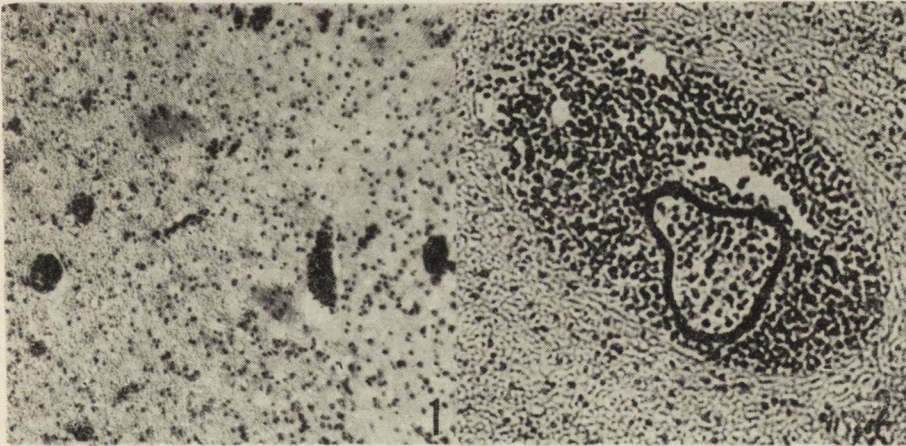
Tabela 2. Czas utrzymywania się wysokiej leukocytozy w okresie bezpośrednio poprzedzającym zgon chorego, a leukocytoza w mózgowiu i oponach miękkich
Table 2. Duration period of high leukocytosis directly preceding patient's death in relation to leukocytosis in the brain and leptomeninges

Leukocytoza Leukocytosis G/L	Czas utrzymywania się podwyższonej leukocytozy Duration of high leukocytosis	Nasilenie leukostazy ¹⁾ Intensity of leukostasis ¹⁾
51.—100.	krótszy niż 5 dni	0; +
101.—200.	shorter than 5 days	+; ++
51.—100.	dłuższy niż 5 dni	+; ++
101.—200.	longer than 5 days	+++
Ponad 200. Above 200.		+++

¹⁾ Objaśnienia w tab. 1
 Explanations in Tab. 1

V. Leukostaza w naczyniach opon miękkich mózgowia, a oponowe nacieki białaczkowe

Komórki białaczkowe w oponach miękkich występowały w 52 przypadkach. W 13 z nich (25%) obserwowano tylko leukostazę. W 27 przypadkach (51,9%) stwierdzono nacieki białaczkowe i leukostazę, przy czym w 8 przypadkach (15,4%) nasilenie nacieków było większe niż

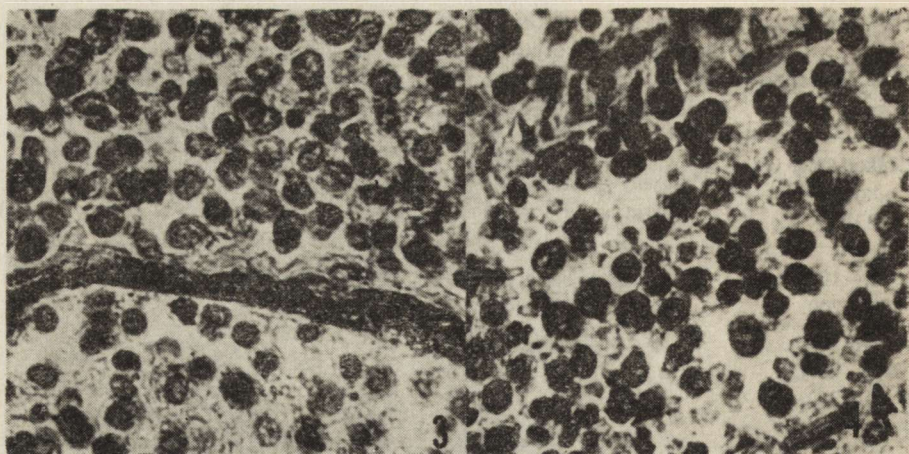


Ryc. 1. Leukostaza powodująca zamknięcie wszystkich widocznych naczyń. Fiolet krezylu. Pow. 63 ×

Fig. 1. Leukostasis leading to lumen obliteration of all visible vessels. Cresyl violet. × 63

Ryc. 2. Gęsty nacieki białaczkowy wypełniający ściśle poszerzoną przestrzeń okołonaczyniową, ostro odgraniczony od tkanki nerwowej. W naczyniu leukostaza. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 2. Thick leukemic infiltration filling up perivascular space, sharply delineated from nerve tissue. Leukostasis in blood vessel. H—E. × 100



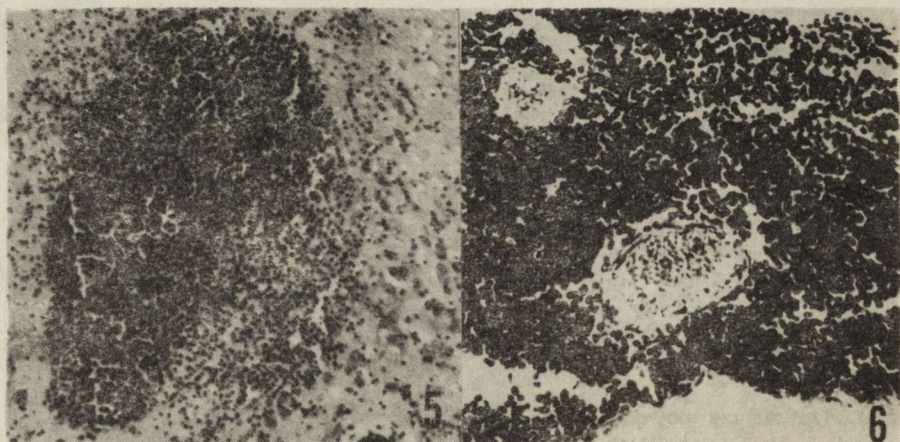
Ryc. 3. Podobny obraz morfologiczny komórek białaczkowych w naczyniu (dolna część ryciny) i w nacieku okołonaczyniowym. Fiolet krezyłu. Pow. 240 ×

Fig. 3. Similar morphological picture of leukemic cells in blood vessel (bottom of the Figure) and in perivascular infiltration. Cresyl violet. × 240

Ryc. 4. Komórki białaczkowe przenikające przez ścianę naczynia (strzałki) do przestrzeni okołonaczyniowej, gdzie tworzą naciek. H—E. Pow. 240 ×

Fig. 4. Leukemic cells penetrating through vascular wall (arrows) into perivascular space forming there infiltration. H—E. × 240.

leukostazy. Nacieki białaczkowe bez towarzyszącej im leukostazy obserwowano w 8 przypadkach (15,4%), w 2 spośród nich nasilenie nacieków oceniono na +++ (ryc. 6). Stwierdzono, że w każdym przypadku z naciekami białaczkowymi bez leukostazy występował przynajmniej przejściowy wyraźny wzrost leukocytozy w różnych okresach choroby.



Ryc. 5. Naciek białaczkowy przekraczający glejową barierę okołonaczyniową. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 5. Leukemic infiltration exceeding perivascular glial membrane. H—E. × 100

Ryc. 6. Gęsty naciek białaczkowy w oponach miękkich bez współistniejącej leukostazy. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 6. Thick leukemic infiltration in leptomeninges without concomitant leukostasis. Cresyl violet. × 100

Tabela 3. Nasilenie leukostazy, a rodzaj i nasilenie nacieków białaczkowych w mózgowiu
 Table 3. Intensity of leukostasis in relation to the character and intensity of leukemic infiltrations in the brain

Nasilenie leukostazy Intensity of leukostasis	Nacieki białaczkowe Leukemic infiltrations			skupiska komórek białaczkowych w krwotokach agglomerations of leukemic cells in hemorrhages
	okołonaczyniowe perivascular	przekraczające okołonaczyniową barierę glejową exceeding perivascular glial barrier	w krwotokach i ich bezpośrednim sąsiedztwie in hemorrhages and their close vicinity	
0	nieobecne lack	nieobecne lack	nieobecne lack	nieobecne lack
+	nieobecne lub + lack or +	nieobecne lack	nieobecne lack	obecne present
++	nieobecne lub + lack or +	nieobecne lack	nieobecne lack	obecne present
+++	+; ++; +++	+; ++	obecne present	nieobecne lack

Nacieki okołonaczyniowe: + – wokół pojedynczych naczyń, składające się z kilkunastu komórek; ++ – w licznych strukturach, wypełniające mniej niż połowę przestrzeni okołonaczyniowej; +++ – wypełniające przynajmniej połowę przestrzeni okołonaczyniowej w wielu okolicach OUN

Perivascular infiltrations: + – composed of several cells; ++ – in numerous structures filling less than a half of perivascular space; +++ – filling at least a half of perivascular space in many areas of CNS

Nacieki przekraczające okołonaczyniową barierę glejową: + – 1–3 nacieki w jednym przypadku; ++ – więcej niż 3 nacieki w jednym przypadku

Infiltrations exceeding of perivascular glial barrier: + – 1–3 infiltrations in one case; ++ – more than 3 infiltrations in one case

Nacieki w oponach miękkich: + drobne nacieki wokół pojedynczych naczyń, ++ – wyraźne nacieki wokół pojedynczych naczyń; +++ – gęste nacieki w oponach i przestrzeni podoponowej

Infiltrations in leptomeninges: + – small, around singular vessels; ++ – distinct, around singular vessels; +++ – dense infiltrations in leptomeninges and submeningeal space

VI. Zależność między wzrostem leukocytozy we krwi w różnych okresach choroby a występowaniem komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich

Z zestawienia zawartego w tabeli 4 wynika, że komórki białaczkowe w mózgowiu stwierdzano zawsze u osób, które zmarły w okresie leukocytozy wynoszącej przynajmniej 50 G/L (grupy C, D). W mózgowiu osób, które zmarły w okresie niskiej leukocytozy bądź leukopenii, nie stwierdzono komórek białaczkowych, mimo że w przebiegu choroby u wielu z nich obserwowano różnie długo utrzymujący się wzrost leukocytozy (grupy: A, B). Nacieki białaczkowe w oponach miękkich wystę-

Tabela 4. Wyraźny wzrost leukocytozy we krwi w różnych okresach choroby, a obecność komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich
Table 4. Distinct increase of peripheral blood leukocytosis in various periods of disease in relation to the presence of leukemic cells in brain and leptomeninges

Grupy Groups	Komórki białaczkowe w OUN Leukemic cells in CNS														
	leukostaza leukostasis				nacieki okołonaczyniowe perivascular infiltrations				nacieki przekraczające okołonaczyniową barierę głągową infiltrations exceeding perivascular glial barrier			nacieki w oponach miękkich infiltrations in leptomeninges			
	0	+	++	+++	0	+	++	+++	0	+	++	0	+	++	+++
A	10	2	1		13				13			13			
B	7	3			10				10			10		3	
C	6	4	1	14	11	1	7	5	22	2		17	4	3	
D	1	3	3	15	5	4	6	7	20		2	8	6	5	3
E	26	4			30				30			30			

Objaśnienia w tab. 1 i 3.

Explanations in Tab. 1 and 3.

powwały nie tylko u osób, które zmarły w okresie wysokiej leukocytozy, ale również w przypadkach, w których przejściowy wzrost leukocytozy miał miejsce na długo przed zgonem chorego (grupa B).

OMÓWIENIE

Skupiska komórek białaczkowych w mózgowiu występowały w 4 postaciach: leukostazy, okołonaczyniowych nacieków białaczkowych, nacieków białaczkowych przekraczających okołonaczyniową barierę glejową i nacieków białaczkowych w ogniskach krwotocznych. Najczęściej obserwowano leukostazę, jej nasilenie w większości przypadków było proporcjonalne do wysokości leukocytozy we krwi w okresie bezpośrednio poprzedzającym zgon chorego. Podobne spostrzeżenia opisali Phair i wsp. (1964) oraz Iwanowski i wsp. (1985). W kilku przypadkach, pomimo wysokiej leukocytozy przed zgonem, nasilenie leukostazy było niewielkie. Wzrost leukocytozy w tych przypadkach utrzymywał się krócej niż 5 dni przed zgonem chorego. Należy przypuszczać, że rozwinięcie się leukostazy wymaga około 2—3 dni od wzrostu leukocytozy. Komórki białaczkowe wykazywały tendencję do gromadzenia się przy wewnętrznej powierzchni ściany naczyń, głównie włosowatych oraz drobnych żył. Całkowite wypełnienie dużych żył i tętnic obserwowano rzadziej. Jak z tego wynika, istotne znaczenie dla narastania leukostazy ma szybkość przepływu krwi w różnych typach naczyń. Wcześniej na taki mechanizm powstawania leukostazy zwrócił uwagę Mossakowski i wsp. (1962). Na udział miejscowych warunków hemodynamicznych w tworzeniu się leukostazy wskazują również obserwowane przez Nadela i Nelsona (1976) oraz w naszym materiale różnice w nasileniu leukostazy w poszczególnych okolicach mózgowia.

Obserwacje nasze pozwalają na wysunięcie przypuszczenia, że nacieki białaczkowe w mózgowiu powstają jedynie z komórek krążących we krwi. Nacieki te występowały tylko w przypadkach z leukostazą, a ponadto, nacieki okołonaczyniowe były jedyną postacią skupisk komórek białaczkowych poza naczyniami. Tak zwane „grudki białaczkowe” (Phair i wsp. 1964) są najprawdopodobniej także naciekami okołonaczyniowymi, jednak ze względu na ich znaczne rozmiary płaszczyzna preparatu ominęła naczynie. Na współistnienie leukostazy z naciekami białaczkowymi zwrócili również uwagę Reske-Nielsen i wsp. (1974).

Odnosi się wrażenie, że komórki białaczkowe mają zdolność aktywnego przenikania przez ścianę naczynia. Skupiska komórek białaczkowych występują między innymi wokół naczyń z niewielką leukostazą, która nie jest w stanie doprowadzić do niedokrwienia ściany naczyniowej i „wypchnięcia” komórek poza naczynie. Okołonaczyniowe nacieki białaczkowe nie zawierają też zwykle krwinek czerwonych (Phair i wsp. 1964).

Komórki białaczkowe znaleziono u wszystkich chorych, którzy zmarli w okresie wysokiej leukocytozy. Należy więc przypuszczać, że nacieki białaczkowe pojawiają się w mózgowiu w każdym okresie wysokiej leukocytozy, niezależnie od stadium choroby. Law i Blom (1979) sądzą, że wysoka leukocytoza wyraźnie zwiększa ryzyko zajęcia OUN przez komórki białaczkowe. Według naszych obserwacji, wysokość leukocytozy, której niewątpliwie towarzyszy leukostaza w mózgowiu, wynosi przynajmniej 50 G/L, zdaniem Moore'a i wsp. (1960) — 100 G/L, a Nadela i Nelsona (1976) — 250 G/L. Brak komórek białaczkowych w mózgowiu osób, które zmarły w okresie niskiej leukocytozy, mimo że w przebiegu choroby występował przejściowy, wyraźny wzrost leukocytozy, wskazuje na niewielką aktywność komórek białaczkowych w przestrzeniach okołonaczyniowych mózgowia i szybką ich eliminację w okresie spadku leukocytozy. Należy podejrzewać, że komórki białaczkowe nie mają zdolności do rozmnażania się w przestrzeniach okołonaczyniowych. Struktura morfologiczna komórek białaczkowych była jednakowa w naczyniach i poza nimi, a w ogniskach krwotocznych komórki białaczkowe podlegały zmianom zwyrodnieniowym. Wydaje się, że gdyby skupiska komórek białaczkowych podlegały rozmnażaniu w przestrzeniach okołonaczyniowych, powinny zachować pewną niezależność od wahań leukocytozy i leukostazy, czego nie stwierdziliśmy w naszych przypadkach. Zdaniem Cronkite'a (1968) komórki białaczkowe przenikające do krwi są pozbawione zdolności mitotycznej. Deutsch i wsp. (1971) zwracają uwagę na mniejszy metabolizm komórek białaczkowych, podejrzewając jednocześnie, że białaczki są chorobami akumulacyjnymi a nie proliferacyjnymi. Dodatkową przeszkodą w osadzaniu się komórek białaczkowych w mózgowiu stanowi glejowa bariera okołonaczyniowa, trudna do przebycia dla nacieku białaczkowego.

Odmienne niż w mózgowiu zachowują się komórki białaczkowe w oponach miękkich. W wielu obserwowanych przypadkach nasilenie nacieków białaczkowych było w oponach większe niż leukostazy, a w kilku z nich stwierdziliśmy wyraźne nacieczenie opon, bez leukostazy. Należy przypuszczać, że zjawiska te występują z powodu odmiennych warunków, na jakie natrafiają komórki białaczkowe w oponach w porównaniu z mózgowiem. Naczynia oponowe nie są otoczone przestrzeniami okołonaczyniowymi, a ponadto opony, podobnie jak elementy morfotyczne krwi, są pochodzenia łącznotkankowego. Ułatwia to przenikanie komórek białaczkowych poza naczynia i umożliwia zagnieżdżenie się tych komórek w sprzyjającym podłożu.

WNIOSKI

1. W przebadanym materiale nacieki białaczkowe występowały w mózgowiu tylko w sąsiedztwie naczyń. Przemawia to za krwiopochodnym charakterem komórek białaczkowych. Komórki te gromadzą się w móz-

gowiu i oponach miękkich w tym okresie choroby, w którym dochodzi do wzrostu leukocytozy wystarczającego do wytworzenia się leukostazy.

2. Komórki białaczkowe podlegają eliminacji z mózgowia w okresie spadku leukocytozy.

3. W oponach miękkich komórki białaczkowe mogą występować także w okresie niskiej leukocytozy. Wynika to być może z braku bariery okołonaczyniowej w oponach, a także ich łącznotkankowego utkania.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ В НЕЛИМФОБЛАСТИЧЕСКИХ ЛЕЙКЕМИЯХ У ВЗРОСЛЫХ

Резюме

Целью исследования была попытка более близкого ознакомления с механизмами накопления и сохранения лейкемических клеток в мозге и мягких оболочках а также связи этих явлений с определенной стадией болезни.

Исследования проведены на 110 умерших в возрасте 17—74 лет от острой миелобластической лейкемии, острой миеломоноцитарной лейкемии и бластического криза хронической миелобластической лейкемии. Лейкемические клетки в мозге наблюдались в тесной связи с сосудистой системой, количество лейкемических инфильтратов зависело от уровня лейкоцитоза крови и величины лейкостаза мозга. Лейкемические клетки обнаружено в мозге всех обследованных, умерших в период, когда лейкоцитоз был по крайней мере 50 G/L. В мозге больных, умерших в период низкого лейкоцитоза, не обнаружено лейкемических клеток, хотя в процессе течения болезни имело место переходящее возрастание лейкоцитоза. В мягких оболочках в более 30% случаев лейкемические инфильтрации превышали лейкостаз, присутствовали без него и встречались у больных, у которых временное увеличение уровня лейкоцитоза имело место задолго перед смертью.

Из проведенных наблюдений следует, что лейкемические клетки попадают в ЦНС из кровеносной системы и накапливаются в мозге и мягких мозговых оболочках в каждом периоде болезни, в котором имеет место возрастание лейкоцитоза до уровня, достаточного для образования лейкоцитоза. Лейкемические клетки в мозге характеризуются слабой биологической активностью и подвергаются удалению в период обнижения лейкоцитоза, тогда как в мягких оболочках они могут появляться также в период низкого лейкоцитоза.

ORIGIN AND LOKALIZATION OF LEUKEMIC CELLS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF ADULT PATIENTS WITH NON-LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Summary

The studies were performed on 100 patients in the age of 17—72 years, who died of acute myeloblastic leukemia, acute myelomonocytic leukemia and blastic crisis of chronic myeloblastic leukemia. Leukemic cells in the brain were found in striking connection with vascular system and an amount of leukemic infiltrations was dependent on the intensity of leukocytosis in the peripheral blood and intensity of leukostasis in the brain. Leukemic cells were discovered in the brains of all patients, who died in the period, in which leukocytosis was at least 50 G/L.

In the brains of patients, who died in the period of low leukocytosis, leukemic cells were not found despite that in the course of disease temporary distinct increase of blood leukocytosis had been observed. In the leptomeninges, in more than 30% of patients the leukemic infiltrations prevailed over leukostasis, were present without it, and they were present also in patients, in which transient increase of blood leukocytosis took place in the quite long time before death.

From the studies performed it is clear, that leukemic cells are transported to the central nervous system from the vascular system and are accumulated in the brain and in the leptomeninges in each period of illness, in which an increase of leukocytosis occurs sufficient to cause leukostasis. Leukemic cells in the brain are characterized by weak biological activity and are eliminated in the period of decreased leukocytosis. However, in the leptomeninges they may appear also in the period of low blood leukocytosis.

PISMIENNICTWO

1. Azzarelli B., Roesman U.: Pathogenesis of central nervous system infiltration in acute leukemia. *Arch. Path. Lab. Med.*, 1977, 101, 203—205.
2. Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M.-T., Flandrin G., Galton D. A., Gralnick H. R., Sultan C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. *Brit. J. Haemat.*, 1976, 33, 451—458.
3. Cronkite E. P.: Perspectives in leukemia. *Red. J. Grunne, M. Stratton*, New York 1968, 173—194.
4. Cyklis R., Armata J., Wyszowski J.: Objawy ze strony podwzgórza w remisji szpikowej ostrej białaczki trwającej ponad 2 lata. *Acta Haemat. Pol.*, 1971, 2, 342—345.
5. Deutsch A. — cyt. za: Ławkowiczowie W. i L.: Kliniczna diagnostyka różnicowa w hematologii. PZWL, Warszawa 1973, 366—377.
6. Dibley M., Dorsch S., Roser B.: The cell leukaemia in the rat: The pathophysiology, 1975, 7, 219—235.
7. Freireich J. E., Thomas L. B., Frei E., Fritz D., Forkner C. E.: A distinctive type of intracerebral hemorrhage associatee with „blastic crisis” in patients with leukemia. *Cancer*, 1960, 13, 146—154.
8. Góralski A.: Metody opisu i wnioskowania statystycznego w psychologii. PWN, Warszawa 1976.
9. Hoagland H. C., Perry M. C.: Blast cell crisis in acute or chronic leukemia. *JAMA* 1976, 235, 1888—1889.
10. Iwanowski L., Czechowska Z., Sielczak M.: Analysis of neuropathological changes in the central nervous system of 51 patients who died from proliferative hematological diseases. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 531—543.
11. Law I. P., Blom J.: Adult central nervous system leukemia incidence and clinicopathologic features. *South. Med. J.*, 1976, 69, 1054—1072.
12. Litteral E., Malmud N.: Leukemia with neurologic manifestations. *Neurology*, 1955, 5, 740—764.
13. Moore E., Thomas L. B., Shaw R., Freireich E.: The central nervous system in acute leukemia. *Arch. Intern. Med.*, (Chic.) 1960, 105, 451—468.
14. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Iwanowski L.: Zespoły neuropatologiczne w białaczkach. *Rozp. Wydz. Nauk Med.*, PAN, 1962, 7, 157—184.
15. Nadel E. M., Nelson J. S.: The pathologic characteristics of leukostasis and leukemic nodules occurring in the central nervous system of guinea pigs with L2C/NB leukemia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 1976, 35—89.

16. Nies B., Thomas L., Freireich E.: Meningeal leukemia. *Cancer*, 1965, 18, 546—553.
17. Nowacki P., Honczarenko K., Kulczycki J., Wichert K., Brandowska M.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu ostrej białaczki. *Neuropat. Pol.*, 1982, 20, 483—494.
18. Phair J. P., Anderson R. E., Namiki H.: The central nervous system in leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1964, 61, 863—875.
19. Price R. A.: Histopathogenesis of meningeal leukemia and complications of therapy. W: *CNS complications of malignant diseases*. Red. J. M. A. Whitehouse, H. E. Tay, University Park Press, Baltimore, 1979, 3—15.
20. Reske-Nielsen E., Jensen K. B., Petersen J. H., Scgaard H.: Leukaemia of the central nervous system. *Lancet*, 1974, 1, 211—212.
21. Rokicka-Milewska R.: Nacieki białaczkowe ośrodkowego układu nerwowego u dzieci. *Akademia Med.*, Warszawa 1974 (praca habil.).
22. Shaw K. R., Moore E., Freireich E., Thomas L.: Meningeal leukaemia. *Neurology*, 1960, 10, 823—833.
23. Tartaglia A.: Neurologic aspects of hematologic disorders. *N. Y. J. State Med.*, 1973, 73, 964—971.
24. West R. J., Graham-Pole J., Hardistry R. M., Rike M. C.: Factors in pathogenesis of central nervous system leukaemia. *Brit. Med. J.*, 1972, 3, 311—314.

Adres autora: Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

KOMUNIKATY

27 czerwca 1987 r. odbędzie się pod auspicjami European Association of Neurosurgical Societies Sympozjum Naukowo-Szkoleniowe „Calcium Antagonists in Prevention and Treatment of Cerebral Ischemia”. Głównym tematem Sympozjum będzie zastosowanie blokerów kanału wapniowego w leczeniu skurczu naczyniowego po krwotoku podpajęczynówkowym. Sympozjum organizowane jest przez Klinikę Neurochirurgii AM we Wrocławiu w ramach European Course in Neurosurgery.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Doc. dr hab. med. Jerzy Wroński, Katedra i Klinika Neurochirurgii AM, ul. Traugutta 118, 50-420 Wrocław

*

1—3 grudnia 1987 r. odbędzie się w Lipsku wspólny Zjazd Towarzystwa Neurologii i Nauk Neurologicznych NRD.

Głównym tematem zjazdu będą „Nowoczesne metody w naukach neurologicznych”.

Termin zgłaszania prac upływa 1 maja 1987 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Doc. dr sc. med. J. Lehmann, Abteilung für Neuropathologie, Institut für Pathologische Anatomie der Karl-Marx-Universität Liebigstr. 26, 7010 Leipzig, DDR

*

W okresie od 11 do 14 maja 1988 r. odbędzie się w Zgorzelcu wspólny Zjazd Stowarzyszenia Neuropatologów NRD oraz Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich.

Głównym tematem Zjazdu będzie „Bariera krew—mózg”. Przewidziane są też tematy wolne.

Termin zgłaszania prac upływa 30 listopada 1987 r., termin nadsyłania streszczeń (do 300 słów) — 5 stycznia 1988 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Doc. dr Roland Goertchen, Institute of Pathology, District Hospital, Girbigsdorfer str. 1—3, 8900 Görlitz, DDR

Jerzy Dymecki

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ROMAN GADAMSKI

WPLYW PROSTACYKLINY PGI₂ I INDOMETACYN NA NIEDOKRWIENNE USZKODZENIE SEKTORA CA₁ ROGU AMONA U CHOMIKÓW MONGOLSKICH

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Obustronne krótkotrwałe (5—7,5 min) podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych prowadzi u chomików mongolskich do wybiórczego uszkodzenia neuronów piramidowych rogu Amona, ujawniającego się z kilkudniowym opóźnieniem w stosunku do incydentu niedokrwienego (Suzuki i wsp. 1983a). W poprzednich badaniach wykazano, że zjawisku temu zapobiega lub je skutecznie ogranicza podanie indometacyny, stanowiącej znany inhibitor cyklooksygenazy, enzymu katalizującego syntezę prostaglandyn różnych klas (Mossakowski, Gadamski 1985). Prostaglandynom, a przynajmniej niektórym ich grupom, gromadzącym się w ośrodkowym układzie nerwowym, w następstwie jego niedokrwienia (Gaudet i wsp. 1980; Moskowicz, Coughlin 1981; Iannotti i wsp. 1981; Bhakoo i wsp. 1982) przypisuje się działanie uszkodzające tkankę nerwową na drodze ich wpływu na układ naczyniowy mózgu oraz bezpośredniego efektu destabilizującego błony komórkowe, a także sprzyjania powstawaniu zakrzepów naczyniowych. W tych warunkach zastosowanie indometacyny ograniczającej syntezę prostaglandyn może wywierać skuteczny wpływ osłaniający tkankę nerwową. Na istnienie takiego jej oddziaływania wskazują liczne doświadczenia w przypadku niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego (Furlow, Hallenbeck 1978; Moskowicz, Coughlin 1981; Bhakoo i wsp. 1982; Kärögström i wsp. 1983; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984).

Z drugiej strony wykazano, że podobny efekt osłaniający wywiera prostacyklina PGI₂ zastosowana w zespołach niedokrwienych mózgu zarówno u ludzi (Gryglewski i wsp. 1983), jak i u zwierząt doświadczalnych (Gaudet, Levin 1979; Hallenbeck, Furlow 1979; Hallenbeck i wsp. 1980; Iannotti i wsp. 1981; Nokolov i wsp. 1982; Awad i wsp. 1983;

Pluta 1986). Źródłem korzystnego działania prostacykliny w tych warunkach doszukuje się w jej wpływie wazodylatacyjnym (Dusting i wsp. 1979; Boullin i wsp. 1979; Jarman i wsp. 1979; Abdel-Halim i wsp. 1980) oraz antyagregacyjnym (Moncada i wsp. 1976; Gryglewski i wsp. 1978). Równocześnie szereg autorów zwraca uwagę na jej bezpośredni wpływ cytoprotekcyjny zarówno w stosunku do tkanki nerwowej, jak i szeregu innych narządów i tkanek (Ogletree i wsp. 1979; Lefer i wsp. 1979; Araki, Lefer 1980; Stachura, Kałuża 1982; Renkawek i wsp. 1986a). Awad i wsp. (1983) z kolei podkreślają jej korzystne oddziaływanie na mechanizmy bariery krew—mózg.

Skloniło to do podjęcia próby oceny wpływu prostacykliny PGI_2 na rozwój niedokrwiennych uszkodzeń neuronów sektora CA_1 rogu Amona, rozwijających się w następstwie krótkotrwałego podwiązania tętnic szyjnych u chomika mongolskiego. Krótki okres półtrwania prostacykliny sugerował równoległe zastosowanie jej syntetycznego analogu, pozbawionego tej niekorzystnej właściwości. Spostrzeżenia dotyczące zależności działania indometacyny od sposobu jej podawania podyktowały dodatkową serię doświadczeń z jej zastosowaniem.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na chomikach mongolskich (*Meriones unguiculatus*), dorosłych samicach, o masie ciała około 75 g. Niedokrwienie mózgu wywoływano w narkozie wziewnej (2% narkotan w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70% azotu i 30% tlenu) przez obustronne zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych przy użyciu klipsów Heifetza na okres 7,5 min. Po zabiegu zwierzęta pozostawiano w warunkach hodowlanych na okres 5 dni.

Badania obejmowały 3 grupy doświadczalne różniące się między sobą zastosowanym środkiem osłaniającym.

Grupę I stanowiło 14 zwierząt, którym podawano prostacyklinę PGI_2 (Welcome Research Laboratories, UK) w dawce 2 mg/kg/min w postaci ciąglego wlewu do żyły dostopowej przy użyciu pompy infuzyjnej f-my ZAD „Medipan”. Zróżnicowanie czasu stosowania wlewu w stosunku do niedokrwienia mózgu, przy stałej dawce i łącznym czasie trwania wlewu, było podstawą do wydzielenia dwóch podgrup doświadczalnych. W podgrupie A, obejmującej 8 zwierząt, stosowanie leku rozpoczynano w 3 min przed zaciśnięciem tętnic szyjnych prowadząc je przez okres niedokrwienia i przez 30 min po jego zakończeniu. W podgrupie B (6 zwierząt) dożylny wlew leku zaczynano po upływie 1 godz. od uwolnienia tętnic szyjnych, a okres jego trwania podobnie jak poprzednio wynosił 40 min. Pełna podana dawka leku przypadająca na 1 zwierzę wynosiła 6 μg . Zawarta ona była w 1,9 ml buforu TRIS o pH 9,0. Dla zapewnienia trwałości PGI_2 , jej roztwór końcowy przygotowywany z roztworu wyjścio-

wego przetrzymywany był na lodzie, podobnie lodem obłożona była strzykawka pompy infuzyjnej przez cały czas trwania wlewu. W celu przeciwdziałania efektowi hipotensyjnemu prostacykliny, stwierdzone-
mu w badaniach Pluty (1985), jej wlew poprzedzano na 5 min dootrzew-
nową iniekcją Isuprelu w dawce 0,1 mg na zwierzę. Postępowanie to nie
uchroniło jednak przed wysoką śmiertelnością zwierząt. W podgrupie A
padły 4 zwierzęta z ogólnej liczby 8. Padały one zazwyczaj w 3—4 min
niedokrwienia. W podgrupie B na 6 zwierząt padło tylko jedno, co mieści
się w granicach przeciętnej doświadczenia.

Grupę II stanowiło 15 zwierząt, którym zamiast prostacykliny PGI₂
podawano jej syntetyczny analog — Iloprost (Schering AG West Ger-
many), wyróżniający się przedłużonym okresem połowicznego rozpadu.
W zależności od czasu podania leku w stosunku do niedokrwienia móz-
gu wyróżniono 3 podgrupy doświadczalne po 5 zwierząt każda.

W podgrupie A Iloprost podawano bezpośrednio przed zaciśnięciem
tętnic szyjnych wspólnych, w podgrupie B w 15 min po uwolnieniu za-
cisku, a w podgrupie C po upływie 1 godz. od zakończenia niedokrwie-
nia. W każdej podgrupie dawka leku, podawanego w iniekcji do żyły
dostopowej, wynosiła 200 µg/kg masy ciała. Spośród 15 zwierząt tej
grupy 1 padło w okresie niedokrwienia.

Grupa III obejmowała 8 zwierząt, które w różnym czasie po niedo-
krwieniu otrzymywały dootrzewnowo iniekcję indometacyny (Merck-
-Sharp and Dohme Res. Lab., USA) w dawce 8,0 mg/kg masy ciała.
Sposób przygotowania leku opisano w poprzedniej pracy (Mossakowski,
Gadamski 1985). W grupie tej również wydzielono 2 podgrupy, po 4 zwie-
rzęta w każdej. W podgrupie A lek podawano jednorazowo po upływie
1 godz. od zdjęcia zacisku z naczyń tętniczych, podczas gdy w podgru-
pię B zastosowano jego uzupełniające podanie po 5 godz. od zakończenia
niedokrwienia.

Grupę kontrolną stanowiło 7 chomików mongolskich, u których w spo-
sób identyczny jak w grupach doświadczalnych wywoływano 7,5 min
niedokrwienie mózgu bez żadnej osłony lekowej. Otrzymywały one na-
tomiasz podobnie jak zwierzęta grupy I i III, odpowiednio dootrzewnową
iniekcję płynu Krebsa-Ringera lub dożylny wlew buforu TRIS o pH 0,9,
wychłodzonego na lodzie. Jedno zwierzę z grupy kontrolnej padło w cza-
sie niedokrwienia mózgu.

Grupę odniesienia stanowiły 3 zwierzęta nie poddane żadnym zabie-
gom doświadczalnym.

Zwierzęta grup doświadczalnych i kontrolnej usypiano po upływie
5 dni od niedokrwienia przy zastosowaniu przezsercowej perfuzji 10%
roztworem zbuforowanej formaliny. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszki
pozostawiano na okres 5 dni w roztworze perfuzyjnym. Następnie kro-
jono je w płaszczyźnie czołowej na bloki grubości 5 mm. Blok tkankowy
zawierający w pełni rozwinięty hipokamp grzbietowy przeprowadzano

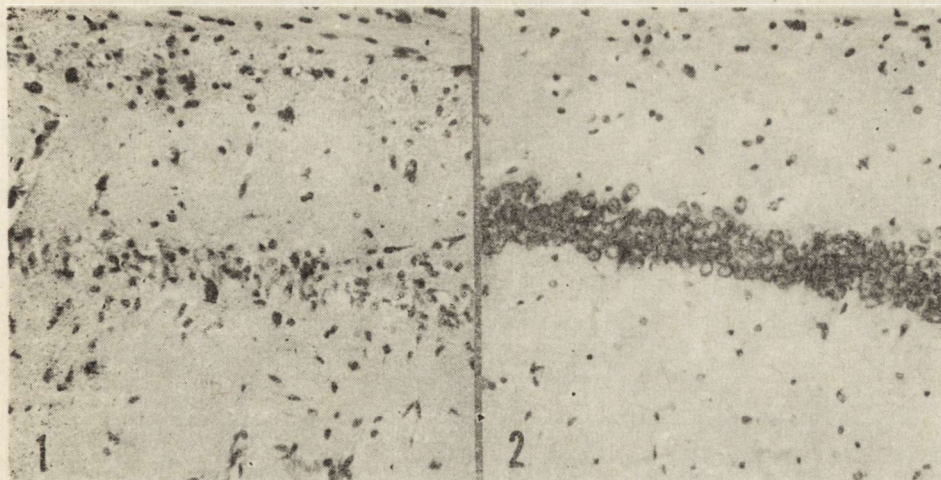
w sposób rutynowy do parafiny. Skrawki parafinowe o wystandaryzowanej grubości 10 μm barwiono według metody Klüvera-Barrery.

Dla ilościowej charakterystyki zmian w sektorze CA₁ rogu Amona wykonano analogicznie jak w poprzedniej pracy (Mossakowski, Gadamski 1985) badania morfometryczne. Przeprowadzono je za pomocą rutynowej siatki morfometrycznej w oparciu o obliczenie liczby komórek piramidowych w powtarzalnych 0,3 mm odcinkach sektora CA₁ na 5 kolejnych skrawkach. Uśrednioną liczbę neuronów przypadającą na pojedynczy 0,3 mm odcinek sektora CA₁ u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, wynoszącą $44,7 \pm 2,5$ uznano za 100%. Do niej odnoszono zmiany ilościowe stwierdzone u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych. Znamienność statystyczną obliczano przy użyciu testu T dla średnich niezależnych. W oparciu o powyższe obliczenia wyodrębniono 3 kategorie obrazu morfologicznego sektora CA₁ u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych: niezmienny oraz całkowity lub częściowy ubytek komórek piramidowych. W przypadku pierwszym — liczba neuronów odpowiadała ich liczbie u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, w drugim — komórki piramidowe nie występowały w ogóle lub ich liczba nie przekraczała 2—5 na całym obszarze sektora CA₁. Zróżnicowanie stopnia zmniejszenia liczby neuronów w grupie określonej jako „ubytek częściowy” wymagało dalszych uściśleń liczbowych. Wyodrębniono trzy stopnie ubytków: nieznaczny (I°), gdy uśredniona liczba komórek zachowanych w 0,3 mm odcinku sektora CA₁ wynosiła $33,0 \pm 4,7$ (83,8%), umiarkowany (II°) i znaczny (III°), gdy zachowane neurony mieściły się odpowiednio w granicach $23,6 \pm 4,1$ (52,7%) oraz $15,7 \pm 4,3$ (35,2%). Różnice pomiędzy poszczególnymi stopniami wykazywały wysoką znamienność statystyczną.

WYNIKI

Zwierzęta kontrolne

Spośród 7 zwierząt kontrolnych, poddanych 7,5 min niedokrwieniu mózgu, przeżyło 6. W połowie przypadków, tj. u 3 zwierząt po 5 dniowym przeżyciu, stwierdzono całkowity zanik komórek piramidowych sektora CA₁. Jego blaszka wypełniona była proliferującymi komórkami gleju gwiaździstego, wśród których widoczne były pojedyncze obkurczone, ciemne neurony (ryc. 1). W 1 przypadku obraz morfologiczny sektora CA₁ był całkowicie niezmienny (ryc. 2). Z dwóch przypadków zakwalifikowanych do grupy z ubytkami częściowymi, w 1 odpowiadały one pierwszemu, a w drugim — trzeciemu stopniowi zmian. Podsumowując 7,5 min niedokrwienie mózgu prowadziło w dwu trzecich przypadków do ciężkich uszkodzeń neuronów sektora CA₁, w jednej trzeciej zmiany nie występowały lub miały nieznaczne nasilenie.



Ryc. 1. Zwierzę kontrolne. Całkowity zanik neuronów sektora CA₁, z warstwowym rozplemem gleju gwiaździstego. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 1. Control animal. Total neuronal loss of sector CA₁ neurons, with laminary glial proliferation. Cresyl violet. ×100

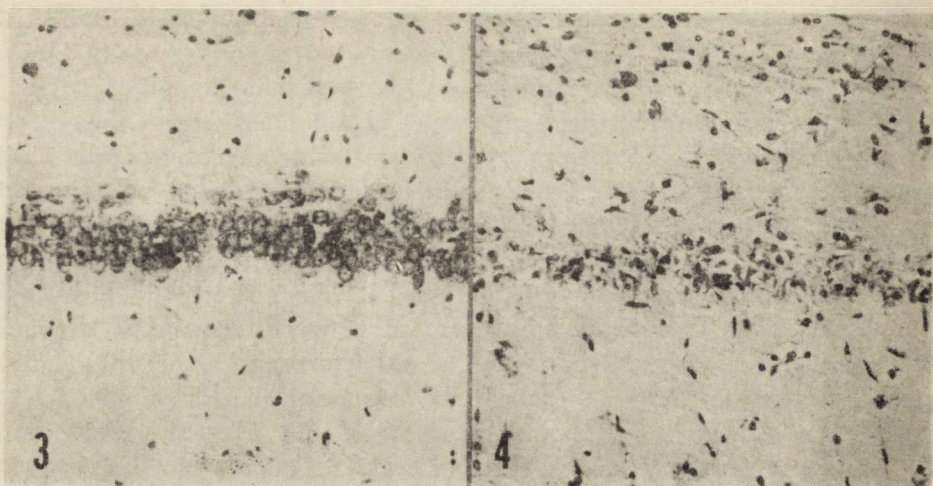
Ryc. 2. Zwierzę kontrolne. Niezmieniona populacja komórek nerwowych sektora CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 2. Control animal. Unchanged neuronal population of sector CA₁. Cresyl violet. ×100

Zwierzęta doświadczalne

Grupa doświadczalna I. Z ogólnej liczby 9 zwierząt, które przeżyły 7,5 min niedokrwienie skojarzone z podawaniem prostacykliny PGI₂, brak uszkodzeń neuronów sektora CA₁ stwierdzono w 5 przypadkach, a ich całkowity zanik w 4. Występowały tu jednak zasadnicze różnice między obydwoma podgrupami. W podgrupie A, w której podawanie prostacykliny rozpoczynano przed podwiązaniem tętnic szyjnych, z ogólnej liczby 8 zwierząt 4 padły w czasie niedokrwienia mózgu. Na tę właśnie podgrupę przypada również większość przypadków (3 na 4 zwierzęta) z całkowitym zanikiem komórek piramidowych sektora CA₁ rogu Amona. W podgrupie B, w której dożylny wlew prostacykliny rozpoczynano po upływie 1 godz. od niedokrwienia, w czasie doświadczenia padło 1 zwierzę, a obraz neuropatologiczny sektora CA₁ przedstawiał całkowicie odwrotne proporcje zmian niż w podgrupie A. U 4 spośród 5 zwierząt nie stwierdzono w ogóle jego nieprawidłowości (ryc. 3), a tylko u 1 występował całkowity ubytek neuronów (ryc. 4).

Grupa doświadczalna II. Z ogólnej liczby 15 zwierząt w czasie doświadczenia padło 1. Spośród 14 zachowanych przy życiu tylko u 2 nie stwierdzono ubytków komórek piramidowych. Wśród pozostałych u 8 zmiany miały charakter ubytku całkowitego, a u 4 częściowego, mieszczącego się w grupie zmian umiarkowanych i znacznych. Jedynie



Ryc. 3. Zwierzę doświadczalne, grupa I. Nieuszkodzone komórki piramidowe sektora CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 3. Experimental animal, group I. Normally preserved sector CA₁ neurons. Cresyl violet. ×100

Ryc. 4. Zwierzę doświadczalne, grupa I. Całkowity zanik komórek piramidowych sektora CA₁. Fiolet krezyłu. Pow. 100×

Fig. 4. Experimental animal, group I. Neuronal loss in sector CA₁ of Ammon's horn. Cresyl violet. ×100

w podgrupie A, przy podaniu analogu prostacykliny w momencie zakończenia niedokrwienia, u 2 zwierząt stwierdzono pełne utrzymanie populacji komórek nerwowych sektora CA₁. U pozostałych 3 występowały ubytki bądź całkowite, bądź częściowe, o znacznym nasileniu. W podgrupie B, w której lek stosowano w 15 min po zdjęciu zacisków z tętnic szyjnych, w żadnym przypadku nie występowały niezmiennione komórki piramidowe. U 2 zwierząt występował ich pełny zanik, a u 2 znacznego stopnia ubytki. W podgrupie C, przy podaniu Iloprostsu po upływie 1 godz. od niedokrwienia, aż u 4 zwierząt wystąpił całkowity zanik neuronów sektora CA₁, a u 1 ubytki komórkowe umiarkowanego stopnia.

Grupa doświadczalna III. Z ogólnej liczby 8 zwierząt wszystkie przeżyły doświadczenie. Tylko w 1 przypadku stwierdzono całkowity zanik komórek nerwowych sektora CA₁, a w 4 jego obraz morfologiczny nie różnił się od obserwowanego u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym. W 3 przypadkach z częściowym zanikiem komórek nerwowych, w 1 miał on charakter nieznaczny, a w 2 umiarkowany. Stwierdzono przy tym wyraźne różnice obrazu morfologicznego w zależności od sposobu podawania indometacyny. W podgrupie A przy jednorazowej dawce leku mieściło się jedno zwierzę z całkowitym zanikiem komórek piramidowych oraz 2 z częściowym uszkodzeniem sektora CA₁. Przy powtórny podaniu leku zastosowanym w podgrupie B u 3 zwierząt populacja nerwowa sektora CA₁ była całkowicie zachowa-

na, a u jednego chomika stwierdzone częściowe ubytki komórek miały charakter nieznaczny.

Zestawienie liczbowe uzyskanych wyników przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Zestawienie liczbowe wyników uzyskanych w grupie kontrolnej i w grupach doświadczalnych

Table 1. Quantitative data of morphological results in untreated and treated animals

Grupa zwierząt Group of animals	Liczba zwierząt Number of animals	Brak zmian morfologicznych No morphological changes	Częściowy zanik neuronów Partial neuronal loss			Całkowity zanik neuronów Total neuronal loss
			I°	II°	III°	
Grupa kontrolna Control group	6	1	1	—	1	3
Grupa doświadczalna I Experimental group I	9	5	—	—	—	4
Podgrupa A Subgroup A	4	1	—	—	—	3
Podgrupa B Subgroup B	5	4	—	—	—	1
Grupa doświadczalna II Experimental group II	14	2	—	2	2	8
Podgrupa A Subgroup A	5	2	—	—	1	2
Podgrupa B Subgroup B	4	—	—	1	1	2
Podgrupa C Subgroup C	5	—	—	1	—	4
Grupa doświadczalna III Experimental group III	8	4	1	2	—	1
Podgrupa A Subgroup A	4	1	—	2	—	1
Podgrupa B Subgroup B	4	3	1	—	—	—

OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowany wpływ zastosowanych środków osłaniających na zjawisko dojrzewania procesu patologicznego po krótkotrwałym niedokrwieniu mózgu, wyrażające się opóźnionym wybiórczym uszkodzeniem neuronów piramidowych sektora CA₁ rogu Amona. Zwraca przy tym uwagę fakt, że zróżnicowanie to dotyczy nie tylko rodzaju leku, lecz również schematu jego podawania.

Najkorzystniejszy efekt uzyskano przy zastosowaniu indometacyny stanowiącej silny inhibitor cyklooksygenazy, uruchamiającej proces syntezy różnych klas prostaglandyn z gromadzącego się w tkance kwasu

arachidonowego (Abdel-Halim i wsp. 1978). W grupie tej na 8 zwierząt tylko u 1 wystąpił całkowity zanik komórek nerwowych sektora CA₁, a zmiany obserwowane w 3 dalszych przypadkach mieściły się w kategoriach uszkodzeń nieznacznych i umiarkowanych. Zaznaczyła się tu również zależność efektu osłaniającego indometacyny od sposobu jej podawania. Najskuteczniejsze okazało się dwukrotne zastosowanie leku w odstępach pięciogodzinnych. Przy tym schemacie doświadczenia nieznaczne nieprawidłowości komórkowe wystąpiły tylko u 1 zwierzęcia z całej grupy. Fakt ten wydaje się zrozumiały w świetle 6-godzinnego okresu półtrwania leku. Podobną zależność stwierdzono w badaniach nad wpływem indometacyny na zaburzenia mikrokrążenia i dynamikę strukturalnych uszkodzeń tkanki nerwowej w następstwie niedokrwienia mózgu (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984). Porównanie obecnie przedstawionych wyników z danymi poprzednich badań (Mossakowski, Gadamski 1985) wskazuje, że w zastosowanym modelu doświadczalnym osłaniający wpływ indometacyny był skuteczniejszy przy jej opóźnionym podaniu po niedokrwieniu. Zastosowanie leku w pierwszej godzinie po przywróceniu krążenia mózgowego dawało bowiem efekt gorszy niż przy jego użyciu w trzeciej godzinie. Spostrzeżenie to, jakkolwiek bardziej obiecujące z punktu widzenia możliwych implikacji klinicznych, jest sprzeczne z obserwacjami innych autorów, którzy podkreślają konieczność podawania indometacyny w okresie poprzedzającym zatrzymanie krążenia mózgowego (Furlow, Hallenbeck 1978; Hallenbeck, Furlow 1979; Iannotti i wsp. 1981; Kärgröm i wsp. 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984). Wydaje się, że różnica ta może wynikać przede wszystkim z odmienności modeli doświadczalnych. Badania wymienionych wyżej autorów prowadzono w warunkach ciężkiego, długotrwałego niedokrwienia mózgu, charakteryzującego się szybko postępującymi uszkodzeniami tkankowymi rozwijającymi się w krótkim czasie po przywróceniu krążenia krwi. Dla uzyskania efektu osłaniającego leku niezbędne było osiągnięcie jego terapeutycznego stężenia już w momencie restytucji mózgowego przepływu krwi. W zastosowanym przez nas doświadczalnym niedokrwieniu mózgu, mieszczącym się w granicach odwracalności zmian tkankowych, wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA₁ jest procesem powolnym, ujawniającym się po upływie 5 dni i poprzedzonym ich wzmożoną aktywnością bioelektryczną, która przypada w pierwszej dobie po niedokrwieniu (Suzuki i wsp. 1983b). W tych warunkach dla osiągnięcia efektu osłaniającego niezbędne wydaje się wydłużenie czasu działania podawanego leku. Mechanizm osłaniającego wpływu indometacyny w niedokrwieniu mózgu nie jest jednoznacznie wyjaśniony. Znaczna liczba autorów (Crochard i wsp. 1980; Iannotti i wsp. 1981; Bhakoo i wsp. 1982; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984) postuluje jej działanie cytoprotekcyjne, związane z zapobieganiem

destabilizacji błon komórkowych, być może poprzez antagonistyczne oddziaływanie w stosunku do fosfolipazy A₂, aktywizującej się w czasie niedokrwienia (Jesse, Franson 1979), lub ograniczenie przepuszczalności błon komórkowych dla jonów wapnia (Volpi i wsp. 1980). W szczególności ta ostatnia hipoteza zasługuje na uwagę w świetle nowych poglądów na mechanizm niedokrwiennych uszkodzeń komórek nerwowych. Według Klatzo (1985) w stosowanym przez nas modelu doświadczalnym uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA₁ może być w większym stopniu następstwem ich poischemicznej hiperaktywności niż samego niedokrwienia. Koncepcja ta znajduje potwierdzenie w doświadczeniach wskazujących na osłaniającą rolę antagonistów A₁ receptorów glutaminianowych w stosunku do hipoksyjnych i niedokrwiennych uszkodzeń rogu Amona (Rothman 1984; Simon i wsp. 1984). Wiadomo zaś, że komórki hipokampa posiadają bogatą pobudzającą inercję glutaminergiczną, pochodzącą między innymi z kolaterali Schaffera. Wzmoczone wyładowania komórek nerwowych rogu Amona, obserwowane po restytucji krążenia mózgowego (Suzuki i wsp. 1983b), wiążą się ze wzmożonym napływem jonów wapnia (Meldrum 1981), prowadzącym do ich ciężkiego uszkodzenia. Przeciwdziałanie temu zjawisku przez indometacynę może być jednym z czynników ochraniających neurony.

Wyniki podawania prostacykliny PGI₂ okazały się mniej jednoznaczne. W grupie, w której jej infuzję rozpoczynano przed zatrzymaniem krążenia mózgowego, były one mniej korzystne niż w materiale kontrolnym. Wyrażało się to z jednej strony wysokim odsetkiem zwierząt, które padały w czasie doświadczenia, z drugiej zaś znaczną proporcją ciężkich uszkodzeń neuronów sektora CA₁ (w 3 przypadkach na ogólną liczbę 4 zwierząt — całkowity zanik komórek nerwowych). Przypominało to obserwacje Pluty (1986) w warunkach całkowitego niedokrwienia mózgu u królików, który niekorzystny efekt kliniczny wiązał ze znacznym hipotensyjnym działaniem prostacykliny PGI₂ (Armstrong i wsp. 1978; Fitzpatric i wsp. 1978). Za hipotezą tą przemawia fakt, iż dla zapewnienia przeżywalności zwierząt okazało się niezbędne i skuteczne podawanie środków podtrzymujących układowe ciśnienie krwi. Niekorzystny efekt stwierdzony w badaniach morfologicznych mógl w tych warunkach być wyrazem sumowania się wpływu hipoksji hipowolemicznej i miejscowego niedokrwienia, podobnie jak ma to miejsce w hipoksyjno-niedokrwienym modelu Levine'a (1960).

Przesunięcie infuzji prostacykliny na okres bezpośrednio po przywróceniu krążenia mózgowego pozwoliło na uzyskanie jej skutecznego efektu osłaniającego. Tylko u 1 zwierzęcia na 5 badanych stwierdzono całkowity zanik neuronów sektora CA₁, u pozostałych był on w ogóle nie uszkodzony.

Mechanizm korzystnego działania prostacykliny PGI₂ w warunkach zastosowanego doświadczalnego modelu niedokrwienia mózgu, podobnie

jak w przypadku indometacyny, jest nie wyjaśniony. W rachubę wchodzić mogą wszystkie, wspomniane we wstępie, drogi jej oddziaływania. Wobec nie stwierdzenia w analogicznych warunkach doświadczalnych, a nawet w przypadku bardziej długotrwałego niedokrwienia mózgu, zmian zakrzepowych w naczyniach (Mossakowski, Gajkowska 1984), najmniej istotny wydaje się mechanizm jej działania antyagregacyjnego. Nie można natomiast pominąć jej funkcji wazoaktywnej. Podanie prostacykliny bezpośrednio po udrożnieniu tętnic szyjnych wewnętrznych, w okresie gwałtownie zwiększonego przepływu mózgowego (Kapuściński, Mossakowski 1983), mogło skutecznie chronić przed jego niekorzystnym wpływem na stan bariery krew—mózg, dzięki jej działaniu hipotensyjnemu. Nagły wzrost przepływu mózgowego po niedokrwieniu jest według Klatzo (1985) jednym z czynników odpowiedzialnych za uszkodzenia tkankowe mózgu. W przeciwdziałaniu mu można zapewne szukać korzystnego wpływu prostacykliny na mechanizmy barierowe (Awad i wsp. 1983). Należy również pamiętać, iż zaburzenia mikrokrążenia mózgowego w następstwie niedokrwienia są zjawiskiem utrzymującym się przez okres co najmniej kilkunastu godzin (Mossakowski 1978).

Powolny rozwój uszkodzeń strukturalnych oraz ich wybiórczy i topograficznie ograniczony charakter skłaniają do przypuszczenia, iż osłabiający efekt prostacykliny w stosowanych warunkach miał w pierwszej kolejności mechanizm cytoprotekcyjny, być może, podobnie jak w przypadku indometacyny, związany z jej przeciwdziałaniem transportowi wapnia przez błony cytoplazmatyczne (Volpi i wsp. 1980). Warto odnotować również fakt, iż Herbaczyńska-Cedro i Gordon-Majszak (1985) wykazały hamowanie procesów peroksydacyjnych w niedokrwieniu mięśnia sercowego. Udziału tego czynnika nie można również wykluczyć w niedokrwionym mózgu.

Całkowicie nieskuteczne natomiast okazało się stosowanie Ploprostu — syntetycznego analogu prostacykliny. Potwierdza to wcześniejsze spostrzeżenia dotyczące braku jego wpływu na hipoksyjne uszkodzenia tkanki nerwowej w hodowli pozaustrojowej (Renkawek i wsp. 1986b), a także negatywne obserwacje kliniczne Pohla i wsp. (1985).

ВЛИЯНИЕ ПРОСТАЦИКЛИНА PGI₂ И ИНДОМЕТАЦИНА НА ИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ СЕКТОРА СА₁ РОГА АМОНА У МОНГОЛЬСКИХ ХОМЯКОВ

Резюме

Оценено обволакивающее действие простациклина и индометацина на развитие выбранных селективных повреждений нейронов сектора СА₁ рога Амона, возникающих в результате кратковременной ишемии у монгольских хомяков.

Опытные животные в разное время по отношению к 7,5 минутной ишемии получали постоянную одиночную или двойную, в случае индометацина, дозу лекарства. У контроль-

ных животных вызывали идентичную ишемию мозга без употребления лекарств. Животных убивали в 5 дней после ишемии с помощью транскардиальной перфузии 10% формалина. Парафиновые срезы мозга стандартной толщины 10 мкм окрашивались мет. Клювер-Барреры. Степень повреждения нейронов сектора CA₁ оценилась морфометрическим путем, сравнивая полученные результаты с данными полученными у животных не поданных никаким экспериментальным процедурам.

Установлено, что как простаглицлин, так и индометацин оказывали обволакивающее действие. Зависело оно, однако, от времени подачи лекарства по отношению к ишемии мозга. Был он гораздо более выраженным при подаче простаглицлина в период поишемической реперфузии, а в случае индометацина — при его двукратной подаче после восстановления мозгового кровообращения. Синтетический аналог простаглицлина не оказывал цитопротекционного действия.

Выдвинуто предположение, что обволакивающий эффект как простаглицлина так и индометацина связан с их непосредственным цитопротекционным действием, зависящим от ограничения доклеточного транспорта ионов кальция или же от противодействия свободно-радикальным реакциям.

INFLUENCE OF PROSTACYCLIN PGI₂ AND INDOMETHACIN ON ISCHEMIC DAMAGE OF CA₁ SECTOR OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBILS.

Summary

Protective effect of prostacyclin PGI₂, its synthetic analogue — Iloprost and indomethacin, a well known inhibitor of cyclooxygenase on the development of selective damage of Ammon's horn CA₁, neurons, resulting from short-term forbrain ischemia in Mongolian gerbils was evaluated.

Animals were given constant, single or double in case of indomethacin dose of the drug in different periods of pre- and postischemic stage of the experiments. Control animals were subjected to identical brain ischemia without medication. Treated and nontreated animals were sacrificed 5 days after brain ischemia by transcardiac perfusion with 10% neutral formalin. Paraffin brain sections, 10 μm thick were stained according to Klüver's method. CA₁ sector lesions were evaluated morphometrically in reference to those obtained in animals not subjected to any experimental procedure.

It was stated that both prostacyclin PGI₂ and indomethacin exert protective effect strongly dependent upon the time of drug application in relation to the ischemic incident. The protective effect was stronger when prostacyclin was applied during early reperfusion stage, and indomethacin was given in double dose after release of carotid arteries. Synthetic prostacyclin analogue did not show any protective effect.

It is supposed that preventic effects of both prostacyclin and indomethacin may be connected with their direct cytoprotective action related either to inhibition of intracellular calcium transport or to counteraction of free radicals reactions.

PIŚMIENICTWO

1. Abdel-Halim M. S., Lunden G., Ånggard E.: Prostaglandin profiles in nervous tissue and blood vessels of the brain of various animals. *Prostaglandins*, 1980, 10, 249—258.

2. Abdel-Halim M. S., Sjoquist B., Ånggard E.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis in rat brain. *Pharmacol. Toxicol.*, 1978, 43, 266—272.
3. Araki H., Lefer A. M.: Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am. J. Physiol.*, 1980, 238, H176—181.
4. Armstrong J. M., Lattimer N., Moncada S., Vane J. R.: Comparison of the vasodepressor effects of prostacyclin and 6-oxo-prostaglandin F₁ with those of prostaglandin E₂ in rats and rabbits. *Br. J. Pharmacol.*, 1978, 62, 125—130.
5. Awad I., Little J. R., Skrinska V., Slugg R., Lesser R. P.: Modification of focal cerebral ischemia by prostacyclin and indomethacin. *J. Neurosurg.*, 1983, 58, 714—719.
6. Bhakoo K. K., Lascelles P. T., Crockard H. A., Avery S. F.: Brain prostaglandins and cerebral edema following temporary vascular occlusion in gerbils. *V. Intern. Conf. Prostaglandins. Florence, May 18—21.1982. Abstracts p. 706.*
7. Boullin D. J., Bunting S., Blaso W. P., Hunt T. M., Moncada S.: Response of human and baboon arteries to prostaglandin endoperoxides and biologically generated and synthetic prostacyclin; their relevance to arterial cerebral spasm in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 1979, 7, 139—147.
8. Crockard H. A., Iannotti F., Hunstock A. H., Smith R. D., Harris R. J., Symon L.: Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in gerbil. *Stroke*, 1980, 11, 494—498.
9. Dusting G. J., Moncada S., Vane J. R.: Prostaglandins, their intermediates and precursors: Cardiovascular actions and regulatory roles in normal and abnormal circulatory systems. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 1979, 21, 405—430.
10. Fitzpatrick T. M., Alter I., Corey E. J., Ramwell P. W., Rose J. C., Kob P. A.: Cardiovascular responses to PGI₂ (prostacyclin) in the dog. *Circul. Res.*, 1978, 42, 192—194.
11. Furlow T. W., Hallenbeck J. M.: Indomethacin prevents impaired perfusion of the dog brain after global ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 591—594.
12. Gaudet R. J., Alam I., Levine L.: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 653—658.
13. Gaudet R. J., Levine L.: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 86, 393—401.
14. Gryglewski R. J., Nowak S., Kostka-Trąbka E., Kuśmiderski J., Dembińska-Kieć A., Bieroń K., Basista M., Błaszczyk B.: Treatment of ischemic stroke with prostacyclin. *Stroke*, 1983, 14, 197—202.
15. Gryglewski R. J., Szczeklik A., Nizankowski R.: Antiplatelet action of intravenous infusion of prostacyclin in man. *Thromb. Res.*, 1978, 13, 153—163.
16. Hallenbeck J. M., Furlow T. W. Jr.: Prostaglandin I₂ and indomethacin prevent impairment of postischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke*, 1979, 10, 629—637.
17. Hallenbeck J. M., Lestch D. R., Dutka A. J., Greenbaum L. J., McKee A. E.: Prostaglandin I₂, indomethacin and heparin promote postischemic neuronal recovery in dogs. *Ann. Neurol.*, 1980, 12, 145—156.
18. Herbaczyńska-Cedro K., Gordon-Majszak W.: Attenuation by prostacyclin of adrenaline-stimulated lipid peroxidation in the myocardium. 1985 (in press).
19. Iannotti F., Crockard A., Ladds S., Symon L.: Are prostaglandins involved in experimental cerebral ischemia in gerbils. *Stroke*, 1981, 12, 301—306.
20. Jarman D. A., Du Boulay G. H., Kendall B., Boullin D. J.: Response of baboon cerebral and extracerebral arteries to prostacyclin and prostaglandin endoperoxide *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1979, 42, 677—686.

21. Jesse R. L., Franson R. C.: Modulation of purified phospholipase A₂ activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1979, 375, 467-470.
22. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observations after 30 min bilateral ligation of the common carotid artery. *Advances in the Biosciences*, 43. *Stroke: Animal Models*. Red. V. Stefanovich. Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt 1983, pp. 63-82.
23. Kärgröm E., Smith M. L., Wallstedt L., Siesjö B.: Cyclo-oxygenase inhibition by indomethacin and recirculation following cerebral ischemia. *Acta physiol. Scand.*, 1983, 118, 193-201.
24. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17-19 October 1985. Abstr. p. 16.
25. Lefer A. M., Sollott S. L., Galvin M. J.: Beneficial action of prostacyclin in traumatic shock. *Prostaglandins*, 1979, 17, 761-767.
26. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Path.*, 1960, 36, 1-17.
27. Meldrum B. S.: *Metabolic Disorders of the Nervous System*. Red. F. C. Rose. Pitman, London 1981, pp. 175-187.
28. Moncada S., Gryglewski R. J., Bunting S., Vane J. R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 1976, 263, 663-665.
29. Moskowitz M. A., Coughlin S. R.: Clinical application of prostaglandins and their inhibitors. *Stroke*, 1981, 12, 882-886.
30. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. *W: Advances in Neurology* Red. J. Cervos-Navarro. Raven Press, New York 1978, 20, 161-171.
31. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ indometacyny na niedokrwienie uszkodzenia sektora CA₁ rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 493-506.
32. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347-365.
33. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287-301.
34. Nokolov R., Nocolova M., Miyares C., Milanova A.: Antihypoxic effect of prostacyclin. *Math. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 1982, 4, 211-219.
35. Ogletree M. L., Lefer A. M., Smith J. B., Nicolau K. C.: Studies on the protective effect of prostacyclin in acute myocardial ischemia. *Europ. J. Pharmacol.*, 1979, 56, 95-103.
36. Pluta R.: Influence of prostacyclin on the recovery of bioelectric cerebral activity after complete cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986, 73, 44-54.
37. Pohl P., Vogl G., Gerstenbrand F., Aichner F.: Therapieerfahrungen mit Prostacyclin bei akuten ischämischen Insulten. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17-19 October 1985, Abstr. p. 17.
38. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of prostacyclin on morphological and enzymatic properties of CNS cultures exposed to anoxia. *Acta Neurol. Scand.*, 1986a, 73, 111-118.
39. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of a synthetic prostacyclin-analogue on morphological properties of CNS-cultures exposed to anoxia. *Neuropat. Pol.*, 1986b (in press).

40. Rothman S. M.: In hippocampal cell cultures blockade of synaptic activity by raising extracellular Mg⁺⁺ prevents cell death from hypoxia. *J. Neurol. Sci.*, 1984, 4, 1884—1891.
41. Simon R. P., Swan J. H., Griffiths T., Meldrum B. S.: Blockade of N-Methyl-d-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science*, 1984, 226, 850—852.
42. Stachura J., Kaluza J.: Influence of prostaglandin E₂ on actinomycin C-induced degeneration of embryonal neuroectodermal tissue. *Prostaglandins*, 1982, 24, 433—439.
43. Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi F., Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1983a, 60, 217—222.
44. Suzuki R., Yamaguchi T., Chou-Luh Li, Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in spontaneous activity in cerebral cortex and CA₁ sector of hippocampus. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1983b, 60, 217—222.
45. Volpi M., Naccache P. H., Shaafi R. J.: Arachidonate metabolite(s) increase permeability of plasma membrane of the neutrophil to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, 92, 1221—1231.

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

PAWEŁ P. LIBERSKI

THE BRAIN FINE STRUCTURE IN EXPERIMENTAL SCRAPIE.
THE 263K STRAIN IN GOLDEN SYRIAN HAMSTERS *

Department of Neurology, Medical Academy, Łódź

Scrapie, a natural neurological disorder of sheep and goats (Dickinson 1976) is a prototype of kuru (Gajdusek et al. 1966). Creutzfeldt-Jakob disease (Gibbs et al. 1968) and Gerstmann-Streussler syndrome (Masters et al. 1981) in man, transmissible mink encephalopathy (Marsh, Manson 1979), and chronic wasting disease in mule deer and elks (Williams, Young 1982). All these disorders, classified as infectious degenerative encephalopathies, are caused by a transmissible agent of unknown physicochemical nature (Kimberlin 1984).

The complex biological phenomena forming the background of the neuropathology and neuropathogenesis of these disorders are partly reflected by lesion pattern, in turn characterizing the strains of the agent (Dickinson, Fraser 1979). In contrast to the light microscopic studies little is known about the diversity of lesions at the fine structural level.

In previous papers (Liberski, Alwasiak 1983; Liberski 1986a, b) the neuropathology of the 263K strain of the agent passed in golden syrian hamsters was described at both light and electron microscopic levels. In this paper the fine structure of the spongiform changes, noted before by us, has been shown and further observations on the astrocytic reaction and dystrophic neurites have been continued as well.

MATERIAL AND METHODS

The 263K strain of scrapie (kindly provided by Dr. Richard H. Kimberlin, ARFC and MRC Neuropathogenesis Unit, Edinburgh, U.K.) was used. This strain was isolated by passage in hamsters of the Chandler

* This paper was partly supported from grant provided by the Polish Academy of Sciences (771/VIII). The author is the recipient of a gift from AGVA-GAEVERT (Brussel, Belgium).

isolate of murine scrapie (Kimberlin, Walker 1977) which, in turn, was primarily isolated in mice from drowsy goats (Chandler 1963).

Six-week-old hamsters of both sexes from an outbred local colony (Department of Oncology, Medical Academy, Łódź) were used. The animals were injected with 0.05 ml of the supernatant into the right hemisphere under light ether anesthesia. The supernatant was obtained by centrifuging (1600 g, 10—15 min) a 10% brain homogenate in 0.9% sodium chloride. The animals were inspected daily for signs of scrapie — tremor and ataxia. The incubation period (76—83 days) was measured from the time of inoculation to the appearance of the first unequivocal signs of scrapie.

Electron microscopic technique. The animals were anesthetised with chloral hydrate and perfused through the heart with 50 ml of 1.25% glutaraldehyde in cacodylate buffer at pH 7.2 followed by 100 ml of 5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in cacodylate buffer at pH 7.2. The brains were removed immediately after perfusion and 1—2 mm³ samples were dissected from the frontal and parietal cortex, the cerebellum, thalamus and the brain stem. The samples were postfixed in 1% tetroxide and embedded in Epon 812. Sections were cut with an LKB Ultratome III. Semithin sections were stained with methyl blue Ultrathin sections stained with lead citrate and uranyl acetate were examined with JEM IOOC, JEOL and Zeiss EM 109 electron microscopes.

RESULTS

Electron microscopy enabled detailed description of spongiform changes as seen under the light microscope. Probably the changes described hereinafter are responsible for neuropil vaculization as given elsewhere (Liberski, Alwasiak 1983).

The vacuoles were enclosed in single unit membrane (Figs 1—3). The formation of vacuoles has been also noted in nervous processes recognized as dendrites, axonal preterminals or terminals with synaptic vesicles (Fig. 1) and in glial processes with numerous glycogen granules in pale cytoplasm. The vacuoles were observed in neuropil (Figs 1—2) or in close contact with the outermost layer of the myelin sheath; it seems occasionally that the membrane wrapping the vacuole splits from the myelin sheath (Fig. 2). Vacuoles of larger dimensions were probably formed from confluent processes. Characteristic feature of the vacuoles were the presence of distorted membrane fragments (Figs 1—4) and splitting off the membranes wrapping the vacuole (secondary vacuoles).

Besides intracellular vacuoles being the ultrastructural basis of spongiform changes observed in the neuropil under the light microscope, vacuoles were also seen in several axonal processes. Primary vacuoles

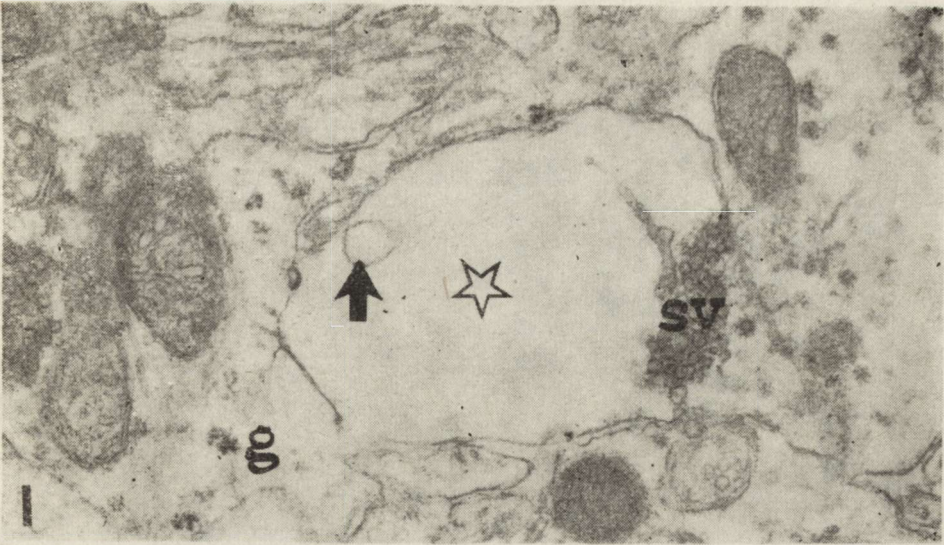


Fig. 1. Vacuole (asterisk) inside axon; sv — synaptic vesicles, g — glycogen particles, arrow — secondary vesicle. $\times 30\ 000$

Ryc. 1. Wakuola (gwiazdka) wewnątrz aksonu; sv — pęcherzyki synaptyczne, g — ziarnistości glikogenu, strzałka — pęcherzyk wtórny. Pow. $30\ 000\times$



Fig. 2. Vacuole (asterisk) in close connection with the outer lamellae of the myelin sheath. Note the formation of the secondary vesicle (arrow). $\times 30\ 000$

Ryc. 2. Wakuola (gwiazdka) w kontakcie z zewnętrzną blaszką osłonki mielinowej. W obrębie wakuoli pęcherzyk wtórny (strzałka). Pow. $30\ 000\times$

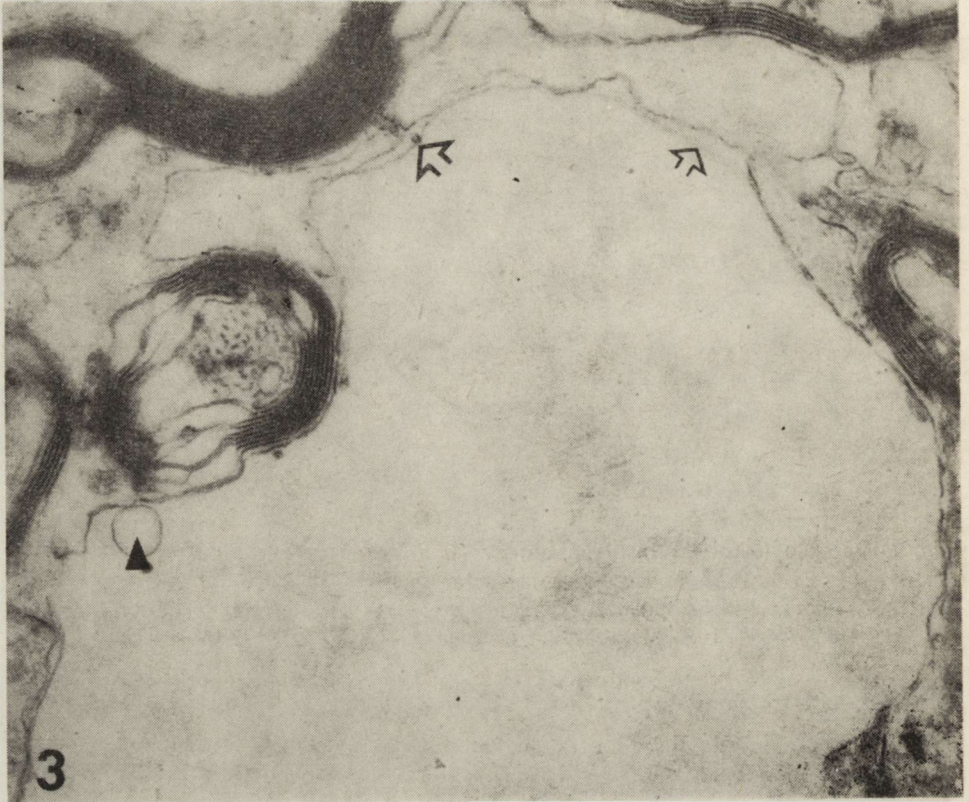


Fig. 3. Large vacuole in close connection with the myelinated axon. Note secondary vesicle (arrow head) and distorted membrane fragments (arrows). $\times 18\ 000$

Ryc. 3. Duża wakuola w kontakcie ze zmielinizowanym aksonem. Zwraca uwagę pęcherzyk wtórny (główka strzałki) oraz fragmenty błon (strzałki). Pow. $18\ 000\times$

covered with a few layers of myelin sheaths were also seen (Figs 4–6), and these in turn contained secondary vacuoles filled with amorphous, fluffy material. Beside vacuoles, the same myelin sheath covered undamaged axons, which typically contained mitochondria, microtubules, synaptic vesicles and so on.

In numerous samples, myelinated processes containing only vacuoles inside were seen adjacent to dystrophic neurites (Fig. 6). Some dystrophic neurites seen in longitudinal sections showed the presence of segments containing membrane-bound vacuoles and other segments containing dense bodies and mitochondria. The vacuoles inside axons (empty processes) may be vacuoles of dystrophic neurites sectioned in the plane in which the above-mentioned vacuoles were seen. In some of the empty processes the secondary vacuoles were observed, and these in turn contained tertiary vacuoles filled with amorphous material. The splitting off the myelin sheath, its innermost or outermost layers to form vacuoles was often visible. Axonal remnants of increased electron density and more or less homogenous appearance often were wrapped by undamaged



Fig. 4A. Distorted membrane fragments budding from the myelin sheath (arrows).
 $\times 30\,000$.

Fig. 4B. The vacuole fragment in close connection with the myelinated axon.
 Note secondary vesicles (arrow heads) and membrane fragments (arrows). $\times 18\,000$

Ryc. 4A. Porozwijane fragmenty błon osłonki mielinowej (strzałki). Pow. $30\,000 \times$

Ryc. 4B. Fragment wakuoli w bezpośrednim kontakcie ze zmielinizowanym aksonem. Widoczne pęcherzyki wtórne (główki strzałek) oraz fragmenty błon (strzałki).
 Pow. $18\,000 \times$

myelin sheaths (Fig. 6). Such axons did not show distinguishable organelles and often were further fragmented into parts of granular appearance and increased electron density. The swollen distended periaxonal



Fig. 5. Distended periaxonal space around degenerated axon (AX) with focally splitted myelin sheath. Note dystrophic axon (DN). $\times 30\ 000$

Ryc. 5. Poszerzona przestrzeń periaksonalna wokół zwyrodniałego aksonu (AX) z ogniskowo rozwarstwioną osłonką mielinową. Zwraca uwagę dystroficzny akson (DN). Pow. $30\ 000\times$



Fig. 6A. Small vacuole originating from the mitochondrium (m). $\times 30\ 000$.

Fig. 6B. Vacuole inside myelinated axon. $\times 18\ 000$

Ryc. 6A. Mała wakuola powstająca z mitochondrium (m). Pow. $30\ 000 \times$

Ryc. 6B. Wakuola wewnątrz zmielinizowanego aksonu. Pow. $18\ 000 \times$

space formed an electron-lucent area around the axonal fragment and between it and the myelin sheath.

Hypertrophic, reactive astrocytes were recognizable, but it was neither possible nor justifiable to differentiate between fibrous and protoplasmatic astrocytes (Peters et al. 1970; Mossakowski 1982). Their oval, round or elongated nuclei contained heterochromatin randomly dispersed or clumped beneath the nuclear membrane and electron-dense, granular nucleolus in central or excentric position. The cytoplasm of low electron density, observed mostly as a narrow strip, contained numerous mitochondria, in comparison with the small number of these organelles observed in normal astrocytes. Some mitochondria showed areas of increased electron density or of lower density of their matrix or broken cristae. The cristae were arranged transversely to the long axis of the mitochondria though several mitochondria had longitudinally arranged cristae. The profiles of endoplasmic reticulum were often distended and numerous star-like clusters of glycogen granules and ribosomes were seen in the cytoplasm. In several cells microtubules were seen, a phenomenon which seems to be characteristic for immature fibrous astrocytes and is never observed in protoplasmatic astrocytes.

The most characteristic feature of the astrocytes was the presence of 7–9 nm intermediate filaments (Figs 7–8). Bundles of parallelly arranged gliofibrils were observed in innumerable longitudinal, oblique and cross sections of glial processes. Gliofilaments were observed near the nuclear membrane. In the majority of cells, however, the very narrow area of cytoplasm adjacent to the nuclear membrane was free of gliofilaments. Shorter bundles were observed scattered between mitochondria or distended cisternae of endoplasmic reticulum. The astrocytic processes were numerous and contained electron-lucent cytoplasm, intermediate filaments and glycogen granules frequently seen beneath the basal membrane of capillaries forming collars which were particularly characteristic of the brain stem (Figs 7–8).

The axonal, dendritic or unidentified processes were classified as dystrophic neurites if they contained inclusion bodies. Two types of dystrophic neurites were seen: those containing only one and those containing more than one inclusion bodies. Both types were observed in the same terminal scrapie animal.

Five types of membrane-bound inclusions (Fig. 9) were recognized: 1. electron dense, which were homogeneous or heterogeneous; 2. amorphous; 3. vesicular: electron-lucent but containing amorphous material; 4. lamellar, composed of onion-bulb like arrays and 5. multivesicular, composed of small vesicles, within a common membrane. These dystrophic neurites were observed in cross-section but were also seen on longitudinal sections.

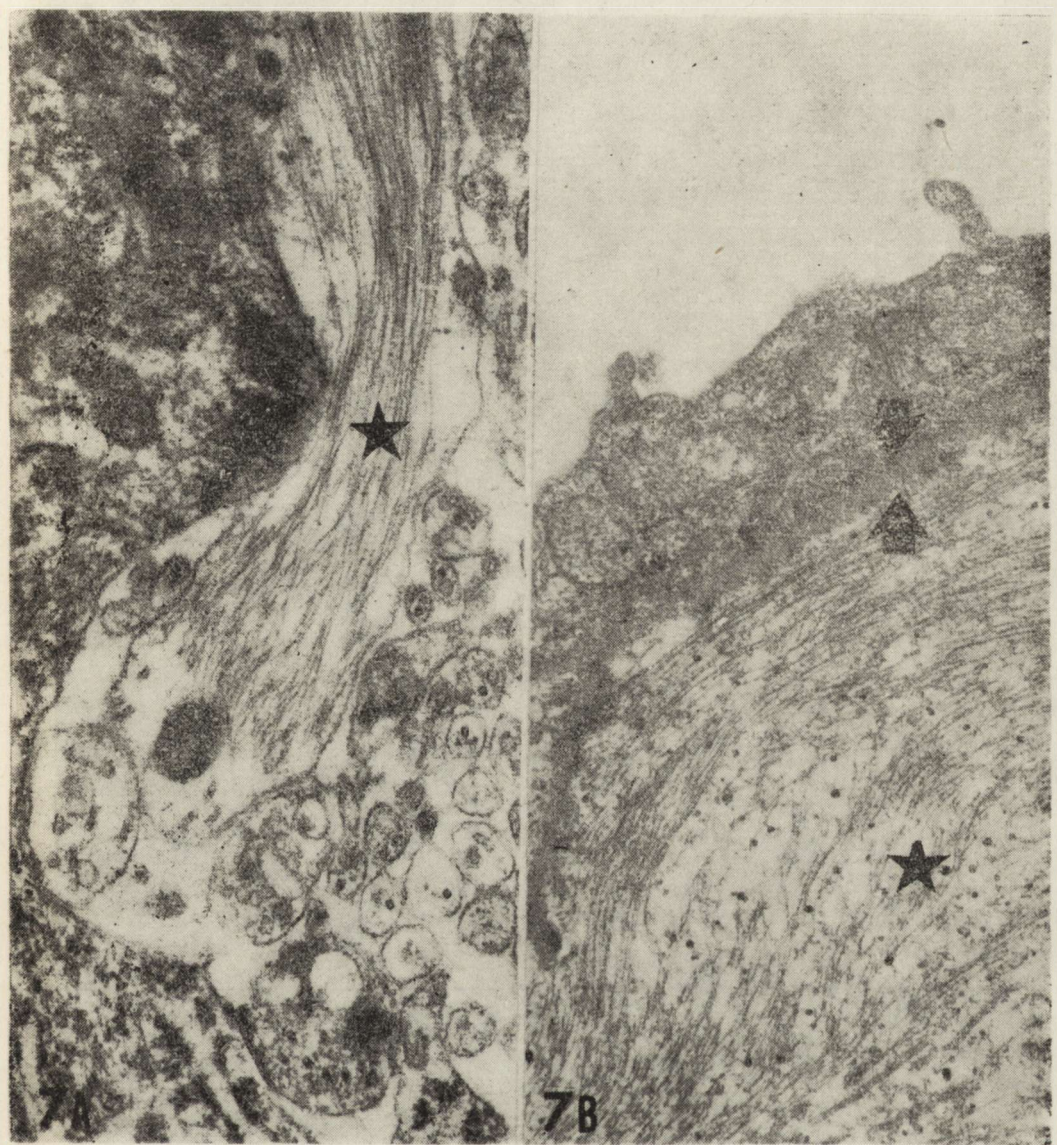


Fig. 7A. Astrocytic process with glial filaments asterisk $\times 30\,000$. *Fig. 7B.* Proliferated glial filaments inside the astrocytic process (asterisk). Note the basal membrane of the blood vessel (arrows). $\times 30\,000$

Ryc. 7A. Wypustka astrocytarna zawierająca liczne filamenty głojowe (gwiazdka). Pow. $30\,000\times$. *Ryc. 7B.* Proliferujące filamenty głojowe wewnątrz wypustki astrocytarnej (gwiazdka). Zwraca uwagę błona podstawna naczyń (strzałki). Pow. $30\,000\times$

Dystrophic neurites also contained mitochondria. Apart of these showed degenerative changes: increased electron density of matrix, homogenization, budding of small vacuoles from one end of the mitochondrion and degeneration into inclusion bodies.

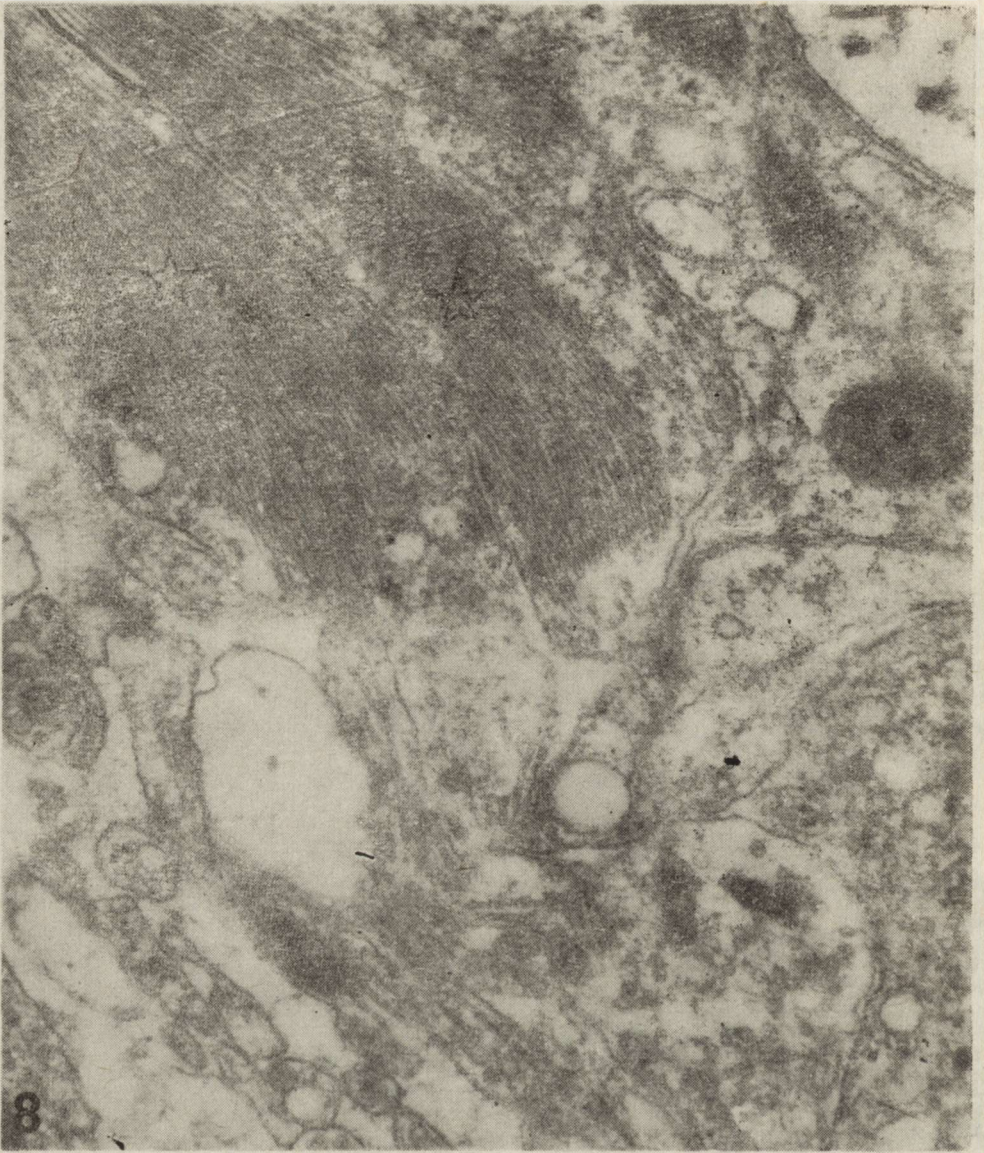


Fig. 8. Bundles of glial filaments inside astrocytic processes (asterisks). $\times 30\,000$
Ryc. 8. Pęczki filamentów glejowych wewnątrz wypustek astrocytarnych (gwiazdki)
 Pow. $30\,000\times$

Fully developed dystrophic neurites (Fig. 9) contained numerous inclusion bodies of several types. Electron dense inclusions were predominant.

Dystrophic neurites were rare findings and they were seen most frequently in the brain stem and thalamus. They, therefore, followed, partly at least the intensity of vaculization as described previously (Li-

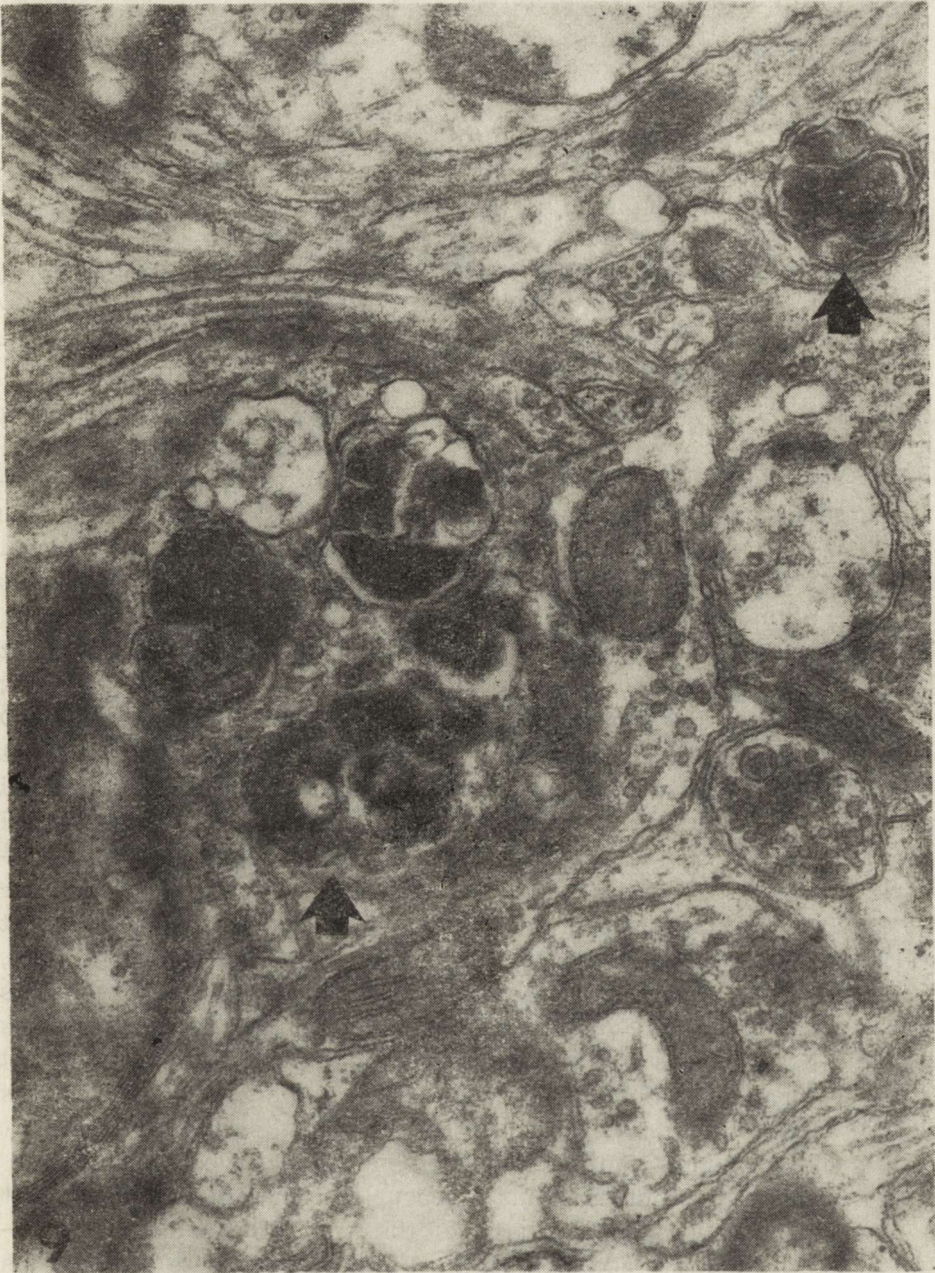


Fig. 9. Dystrophic neurite. Note numerous inclusions (arrows). $\times 30\ 000$

Ryc. 9. Dystroficzny neuryt. Zwracają uwagę liczne wtręty (strzałki). Pow. $30\ 000\times$

berski, Alwasiak 1983) and were seen either as single structures scattered at random among other elements of the neuropil or, more rarely, they formed clusters of two or three.

DISCUSSION

There are four major problems to be eventually answered when the fine structure of infectious degenerative encephalopathies is concerned:

1. which cellular elements participate in the formation of spongiform changes,
2. are there any distinctive features of astrocytic cells taking part in the glial reactions?
3. are there any, other than vacuoles pathological changes of possible significance, to be eventually used as an ultrastructural marker,
4. are there any differences in the ultrastructural patterns between different scrapie models.

Different cellular elements dendrites, axonal terminals and preterminals, small myelinated axons and glial processes participated in the formation of vacuoles corresponded to the spongiform changes as seen at the light microscopic level. The dendrites and small myelinated axons or axonal terminal and preterminals were most frequently noted as an element involved in vacuole formation in human CJD cases (Gonatas et al. 1965; Bignami, Forno 1970; Bubis et al. 1972; Hirano et al. 1972; Ribadeau-Dumas, Esquourolle 1974; Chou et al. 1980), experimental CJD and kuru in chimpanzees and New and Old World monkeys (Lampert et al. 1969, 1971, 1975; Beck et al. 1975; Chou et al. 1980), experimental CJD in small laboratory rodents (Kim, Manuelidis 1983) and natural and experimental scrapie (Bignami, Parry 1971; Chandler 1973; Baringer, Prusiner 1978; Baringer et al. 1979). The glial processes as cellular element from which vacuole originated are rarely mentioned (Lampert et al. 1969, 1971; Bignami, Forno 1970; Chandler 1973; Ribadeau-Dumas, Esquourolle 1974) and the small axons with electron-lucent contents were described only incidentally (Lampert et al. 1969). In the studies presented here the vacuoles were observed as derived from virtually all cellular elements mentioned above, and dendrites and axonal processes predominated. "Myelinated" vacuoles of the type described by Lampert et al. (1969) formed a significant portion of the observed vacuoles.

The mechanism or mechanisms of vacuole formation is unknown at the moment, however, on the basis of the very diverse cellular components involved, it seemed possible to speculate that these mechanisms may be different when operating in different cellular compartments. Multiplication of the cellular membranes and formation of multilamellar abnormal configurations of plasma membranes were described in the early stages of experimental kuru (Beck et al. 1982, 1985). Ho-

wever, these findings were later put in doubt as being spurious only (Gray 1985). They were not observed in later stages of experimental diseases. Since this study is based on examination of animals in the terminal state of disease, it added nothing to the recent discussion (Beck et al. 1985).

The proliferating astrocytes formed the hallmark of the electron microscopic picture in the described here scrapie model (Liberski 1986b). The astrocytes with abundant intermediate filaments formation and some degenerative changes met the criteria of hypertrophic astrocytes. However, multiplication of the astrocytic nuclei and formation of a dense network of astrocytic processes was highly suggestive of astrocytic hyperplasia, corresponding to gliocytosis (or sclerosis) of murine scrapie models as described elsewhere (Liberski 1986b). Hypertrophic astrocytes but not astrocytic hyperplasia were described during electron microscopic studies of other infectious degenerative encephalopathies (Gonatas et al. 1965; Lampert et al. 1969, 1971; Hirano et al. 1972; Bubis et al. 1972; Ribadeau-Dumas, Esquourolle 1974; Kim, Manuelidis 1983; Baringer et al. 1979).

The dystrophic neurites formed an important element in the electron microscopic pattern described here. They were described in various infectious degenerative encephalopathies (Gonatas et al. 1965; Lampert et al. 1969, 1971, 1975; Bignami, Parry 1971; Chandler 1973; De Reuck et al. 1975; Kim, Manuelidis 1983) as well as in other conditions, particularly in Alzheimer disease, where they form one of the elements of the neuritic plaque (Wiśniewski, Terry 1973; Hirano et al. 1972). Similar dystrophic neurites were also observed in murine scrapie (Bruce, Fraser 1975), in murine CJD (Tateishi et al. 1984) and in several unrelated conditions of the central nervous system (Jellinger 1973).

The significance of these structures is uncertain at the moment. Because as mentioned before, dystrophic neurites were encountered in such diverse conditions as for example the cerebral form of mannosidosis (Huxtable, Dorling 1985), and Alzheimer disease (Wiśniewski et al. 1981), one may suppose that dystrophic neurites represent only the product of unspecific neuritic degeneration. On the other hand, their participation in neuritic plaque formation led to speculation that small clusters of dystrophic neurites were the earliest neuritic plaque and formed later the nucleus at which amyloid was produced and processed (Wiśniewski et al. 1981, Liberski 1986a).

In comparative studies of murine scrapie 22C and 79A strains in C3H mice the increase of dystrophic neurite counts was observed during the incubation period (Gibbson, Liberski — unpublished observation). However, the difference between strains 79A — plaque-producing strain and 22C as nonproducing were not remarkable. Despite their possible role in neuritic plaque formation, dystrophic neurites seemed to be

another useful ultrastructural marker, and when observed in large numbers, may be used as a diagnostic tool in estimation of the samples originating from infectious degenerative encephalopathies. This seems to be particularly important because some models (the model of transmissible mink encephalopathy in Hediak-Higashi mink — Marsh et al. 1976) are poorly vacuolized models. Such a marker may be also used in the study of human biopsy material.

The last question to be eventually settled is the range of the ultrastructural changes encountered in different natural and experimental conditions belonging to infectious degenerative encephalopathies. Spongiform changes, astrocytic reaction and dystrophic neurites formed the common background of all these disorders, however, the ultrastructural picture may be dominated by different elements to different extents. The majority of murine scrapie models (Fraser 1979) are highly vacuolated and the astrocytic reaction is scanty with the exception of some gliocytic models. The 263K hamster scrapie model is poorly vacuolized and the hallmark of it is florid astrocytic reaction (Liberski, Alwasiak 1983; Liberski 1986b). It would seem that detailed electron microscopic studies in different combinations of scrapie strain and susceptible animal species may enable further comparisons.

ULTRASTRUKTURA MÓZGU W DOŚWIADCZALNEJ SCRAPIE — SZCZEP 263K PASAŻOWANY PRZEZ ŻŁOTE CHOMIKI SYRYJSKIE

Streszczenie

W pracy przedstawiono zmiany mikroskopowo-elektronowe w mózgach chomików syryjskich zakażonych *scrapie* szczep 263K pasażowany przez złote chomiki syryjskie.

Stwierdzono występowanie wewnątrzkomórkowych wakuoli zawierających wtórne wakuole i pęcherzyki. Występowały one wewnątrz dendrytów, aksonów i wypustek glejowych, z przewagą zajęcia wypustek neuronalnych. Przedstawiono również zmiany w astrocytach i obraz dystroficznych neurytów, stanowiących jeden z charakterystycznych wykładników ultrastrukturalnych encefalopatii gąbczastych.

Przedyskutowano własne wyniki w świetle danych opisanych w innych modelach doświadczalnej *scrapie* oraz w kuru i chorobie Creutzfeldta-Jakoba.

УЛЬТРАСТРУКТУРА МОЗГА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ SCRAPIE ШТАММ 263K ПАССАЖИРОВАННЫЙ ЗОЛОТЫМИ СИРИЙСКИМИ ХОМЯКАМИ

Резюме

В работе представлены электронно-микроскопные изменения в мозге сирийских хомяков, зараженных *Scrapie* (штамм 263K пассажированный золотыми сирийскими хомяками).

Обнаружено присутствие внутриклеточных вакуолей, содержащих вторичные вакуоли и пузырьки. Находились они внутри дендритов, аксонов и отростков глии с преобладанием

в нейрональных отростках. Представлены также изменения в астроцитах и картина дистрофических невритов, составляющих один из характерных показателей губчатых энцефалопатий.

Обсуждены собственные результаты в свете данных, описанных в других моделях экспериментальной scrapie а также в куру и болезни Кройцфельда-Якоба.

REFERENCES

1. Baringer J. R., Prusiner S. B.: Experimental scrapie in mice. Ultrastructural observations. *Ann. Neurol.*, 1978, 4, 205—211.
2. Baringer J. R., Wong J., Klassen T., Prusiner S. B.: Further observations on the neuropathology of experimental scrapie in mice and hamsters. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Academic Press, New York, 1972, vol. 2, 111—121.
3. Beck E., Daniel P. M., Davey A. J., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: The pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathy. An ultrastructural study. *Brain*, 1982, 105, 755—786.
4. Beck E., Daniel P. M., Davey A. J., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: A note on membrane lamellation. *Brain*, 1985, 108, 153—154.
5. Bignami A., Forno L. S.: Status pongiosus in Jakob-Creutzfeld disease. Electron microscopic study of a cortical biopsy. *Brain*, 1970, 93, 89—94.
6. Bignami A., Parry H. B.: Agregations of 35 nm particles associated with neuronal cytopathic changes in natural scrapie. *Science*, 1971, 389—390.
7. Bruce M. E., Fraser H.: Amyloid plaques in the brains of mice infected with scrapie: morphological variations and staining properties. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1975, 1, 189—202.
8. Bubis J. J., Goldhammer Y., Braham J.: Subacute spongiform encephalopathy. Electron microscopic studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1972, 35, 881—887.
9. Chandler R. L.: Experimental scrapie in the mouse. *Res. Vet. Sci.*, 1963, 4, 276—285.
10. Chandler R. L.: Ultrastructural observations on scrapie in gerbil. *Res. Vet. Sci.*, 1973, 15, 322—328.
11. Chou S. M., Payne W. N., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Transmission and scanning electron microscopy of spongiform changes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 1980, 103, 885—904.
12. De Reuck J., De Coster W., Vander Eecken H., Daneels P.: Creutzfeldt-Jakob disease! a comparative light-microscopic, histochemical and electron-microscopic study. *Europ. Neurol.*, 1975, 13, 154—166.
13. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. In: *Slow virus diseases of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin, North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-Oxford, 1976, 209—241.
14. Dickinson A. G., Fraser H.: Scrapie: pathogenesis in mice: an assesment of host control and response involving many strains of agent. In: *Slow virus infections of the central nervous system*. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Academic Press, New York, 1979, vol. 1, 367—385.
15. Fraser H.: Neuropathology of scrapie: the precision of lesions and their significance. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Academic Press, New York, 1979, vol. 1, 387—406.
16. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M. P.: Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 1966, 209, 794—796.

17. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. C., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews W.B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science*, 1969, 161, 388—389.
18. Gonatas N. K., Terry R. D., Weiss M.: Electron-microscopic study in two cases of Jakob-Creutzfeldt disease. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1965, 24, 575—598.
19. Gray E. G.: Membrane lamellation in brain unrelated to spongiform encephalopathy. *Brain*, 1985, 108, 139—152.
20. Hirano A., Ghatak N. R., Johnson A. B., Bartnow M. J., Gomori A. J.: Argentophilic plaques in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.*, 1972, 26, 530—542.
21. Huxtable C. R., Dorling P. R.: Mannoside storage and axonal dystrophy in sensory neurons of Swainsonine-treated rats: morphogenesis of lesions. *Acta Neuropath.*, (Berl.), 1985, 68, 65—73.
22. Jellinger K.: Neuroaxonal dystrophy: its natural history and related disorders. In: *Progress in neuropathology*. Ed. H. M. Zimmerman, Grune and Stratton Inc., New York, 1973, 129—178.
23. Kim J. W., Manuelidis E. E.: Ultrastructural findings in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in Guinea pigs. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1980, 16, 89—98.
24. Kimberlin R. H.: Scrapie: the disease and infectious agent. *Trends in Neurosci.*, 1984, 7, 312—316.
25. Kimberlin R. H., Walker C. K.: Characteristics of short incubation period of scrapie in golden hamsters. *J. Gen. Virol.*, 1977, 34, 295—304.
26. Lampert P. W., Earle K. M., Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Experimental kuru encephalopathy in chimpanzees and spider monkeys. Electron microscopic studies. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1969, 28, 353—370.
27. Lampert P. W., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Experimental spongiform encephalopathy (Creutzfeldt-Jakob disease) in chimpanzees. Electron-microscopic studies. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1971, 30, 20—32.
28. Lampert P. W., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Pathology of dendrites in subacute spongiform virus encephalopathies. In: *Advances in neurology*. Ed. G. W. Kreutzberg, Raven Press, New York, 1975, vol. 12, 465—470.
29. Liberski P. P., Alwasiak J.: Neuropathology of transmissible spongiform encephalopathy (263K strain of scrapie in golden syrian hamsters). I. Standard pathology and development of lesions. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 377—393.
30. Liberski P. P.: Degenerative neurites in experimental scrapie. *Neuropat. Pol.*, 1986a, 24 (in press).
31. Liberski P. P.: Astrocytic reaction in experimental scrapie. *Neuropat. Pol.*, 1986b, 24 (in press).
32. Marsh R. F., Hanson R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Academic Press, New York, 1979, vol. 1, 451—461.
33. Marsh R. F., Sipe J. C., Morse S. S., Hanson R. P.: Transmissible mink encephalopathy. Reduced spongiform degeneration in aged mink of the Chediak-Higashi genotype. *Lab. Invest.*, 1976, 34, 381—386.
34. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstmann-Straussler syndrome. *Brain*, 1981, 104, 559—588.
35. Mossakowski M. J.: Tkanka glejowa. In: *Podstawy neuropatologii*. Eds. M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender, Polish Medical Publishers, Warszawa, 1981, 19—30.
36. Peters A., Palay S. L., Webster H. De F.: The fine structure of the nervous

system. Hoeber Medical Div., Harber and Row Publ., New York, Evanston, London, 1970.

37. Ribadeau J. L., Escourolle R.: The Creutzfeldt-Jakob disease. A neuropathological and electron-microscopic study. In: Neurology. Eds. A. Subirana, J. M. Espadaler, E. H. Burrows. Excerpta Medica, Amsterdam, 1974, 315—329.
38. Tateishi J., Nagara H., Hikita H., Sato Y.: Amyloid plaques in the brains of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, 1984, 15, 278—280.
39. Williams E. S., Young S.: Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wild Animals*, 1980, 16, 89—98.
40. Wiśniewski H. M., Sinatra R. S., Iqbal K., Grundke-Iqbal I.: Neurofibrillary and synaptic pathology in the aged brain. In: Aging and cell structure. Ed. J. E. Johnson. Plenum Publ. Corp., New York, 1981, vol. 1, 105—142.
41. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Reexamination of the pathogenesis of senile plaques. In: Progress in neuropathology. Ed. H. M. Zimmerman. Grune and Stratton Inc., New York, 1973, vol. 2, 1—26.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

23 stycznia 1987 r. odbyła się w Lublinie uroczystość nadania prof. dr. hab. med. Mirosławowi Mossakowskiemu Doktoratu Honoris Causa Akademii Medycznej w Lublinie.

*

28 marca 1986 r. Rada Państwa mianowała profesorem nadzwyczajnym doc. dr. med. Wandę Horyd z Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

*

Doc. dr hab. Anna Rudkowska-Brzecka z Kliniki Neurologii AM we Wrocławiu uchwałą Rady Państwa z 11 kwietnia 1986 r. uzyskuje nominację na profesora nadzwyczajnego.

*

11 grudnia 1986 r. odbyło się przed Radą Naukową Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie Kolokwium Habilitacyjne dr. med. Agnieszki Jędrzejewskiej, kierownika Pracowni Neuropatologii Doświadczalnej Zakładu Neuropatologii tegoż Instytutu.

Tematem pracy habilitacyjnej był „Obraz morfologiczny unerwienia wewnątrznego przewodu pokarmowego w wybranych procesach patologicznych”.

*

7 stycznia 1987 r. odbyło się przed Radą II Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie Kolokwium Habilitacyjne dr. med. Adama Płaźnika, adiunkta Zakładu Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

Tematem pracy habilitacyjnej był „Wpływ leków przeciwdepresyjnych i elektrowstrząsów na aktywność systemów neuroprzekaznikowych wybranych struktur limbicznych: badania behawioralne”.

*

Rada Naukowa Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie nadała stopień naukowy doktora nauk medycznych lek. Joannie Jachowicz-Jeszka, na podstawie pracy pt. „Wiązanie 3H-Spiroperydolu przez limfocyty pacjentów z chorobami układu pozapiramidowego”.

Obrona pracy odbyła się 19 lutego 1987 r.

Promotorem była prof. dr hab. med. Anna Członkowska.

*

Rada Wydziału Lekarskiego AM we Wrocławiu nadała stopień naukowy doktora nauk medycznych lek. Lesławowi Różyckiemu, na podstawie pracy „Ocena angiograficzna skuteczności zaopatrzenia tętniaków wewnątrzczaszkowych”.

Obrona odbyła się 20 lutego 1987 r.

Promotorem był prof. dr hab. med. Jerzy Hołyst.

Jerzy Dymecki

PAWEŁ P. LIBERSKI

THE NATURE OF SPIROPLASMA-LIKE INCLUSIONS IN EXPERIMENTAL SCRAPIE

Department of Neurology, Medical Academy, Łódź

Transmissible spongiform encephalopathies consist of four major disorders: kuru (Gajdusek et al. 1965) and Creutzfeldt-Jakob disease — CJD (Gibbs et al. 1968) in man, natural scrapie in sheep and goats (Dickinson 1976), and transmissible mink encephalopathy (Marsh, Hanson 1979). They are characterized by a long incubation period, they follow a slow protracted course and always lead to death. So far all attempts to isolate and purify the transmissible agent of spongiform encephalopathies have been unsuccessful, this leading to speculations about its mysterious nature (Gajdusek 1977).

Recently limited evidence has been provided (Bastian 1979; Reyes, Hoenig 1981; Gray et al. 1980) that the agent might be identified as an organism belonging to the spiroplasma group, the wall-free prokaryote associated with mycoplasmae (Tully et al. 1976, 1977, 1980).

The aim of this communication is to suggest that what is called "spiroplasma-like inclusions" corresponds to an accidental rearrangement of the cytoskeleton system.

MATERIAL AND METHODS

The source of the scrapie used was 263K "quick" (kindly supplied by dr R. Kimberlin, Edinburgh, Scotland) propagated through Syrian golden hamsters (outbred local colony). The experimental protocol has been described elsewhere (Liberski, Alwasiak 1983). Briefly, the brain was homogenized in physiological saline at room temperature to give a 10% suspension, which was cleared by centrifugation at 1600 G for ten minutes. 0.02 ml of the supernatant was injected into the right hemisphere of a hamster under mild ether anesthesia. The animals were sacrificed when unequivocal signs of clinical scrapie appeared (tremor, ataxia, disturbances of equilibrium). Intracardiac perfusion with two increasing concentrations of glutaraldehyde and paraformaldehyde in

cacodylate (pH 7.2) buffer was applied. The tissue was postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated in a graded series of ethanol, embedded in Epon 812, and double stained with lead citrate and uranyl acetate. The grids were examined with a transmission electron microscope, EM 109 Zeiss and JEM 100 C Jeol.

RESULTS

The incubation period in the second passage performed in this laboratory and described here was 677 days. Clinical diagnosis of scrapie was confirmed in every case by the characteristic neuropathological pattern.

The electron microscopic examination revealed degenerating neurons and reactive astrocytes. The most intensive microglial reaction was observed in the brain stem, thalamus and hypothalamus. Many axons seemed swollen and empty, and numerous vacuoles of different shape and size were formed within cell processes.

Elongated, spiral inclusions (Fig. 1) were occasionally found among normal appearing neurotubules. The close proximity between the spirals and neurotubules was demonstrated. An external "fuzzy" material was associated with the spirals as well as with the adjacent neurotubules.

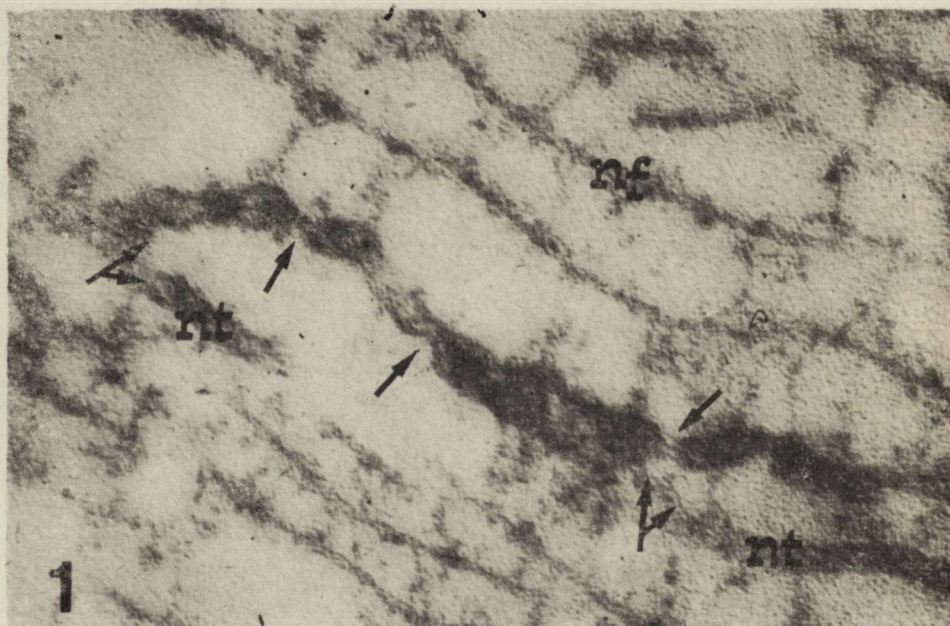


Fig. 1. Spiral-like inclusion. Note close proximity of spiral to neurotubules (double arrows). nt — neurotubules, nf — neurofilaments, arrows — spiral inclusion. $\times 95\ 000$

Ryc. 1. Inkluzja spiralna. Należy odnotować bliski kontakt inkluzji i neurotubul (podwójne strzałki). nt — neurotubule, nf — neurofilamenty, strzałki — inkluzja spiralna. Pow. 95 000 \times

The "heads" as described by Bastian (1979), were never observed in the study presented here. Careful examination of all other hamster brains revealed neither spirals nor other structures characteristic for the putative scrapie agent.

DISCUSSION

Spiroplasma-like inclusions firstly encountered in CJD material (Bastian 1979; Gray et al. 1980; Reyes, Hoenig 1981) was later found in scrapie-infected brains (Masters, Gajdusek 1982). They measured from 375 to 1000 nm in length, and 30 to 115 nm in width. Their localization was limited to the axoplasm or presynaptic terminals. In some cases (Reyes, Hoenig 1981) the continuity between spirals and adjacent brain cell membranes was demonstrated.

The origin of spirals is unknown. Similarities of the electron microscopic pattern of spirals to that of spiroplasmae (Tully et al. 1976, 1977) suggested the latter as a possible causative agent of spongiform encephalopathies. It should be stressed, however, that curvilinear inclusions were found only in four or five cases of spongiform encephalopathies and never in the bulk of other cases studied (Bots et al. 1971; Narang 1974a, b, c; 1975; Baringer, Prusiner 1978; Baringer et al. 1979; Sjakatos et al. 1979; Chou et al. 1980; Baringer et al. 1981; Shibayama et al. 1982; Beck et al. 1982; Kim et al. 1982).

The possibility that they represent aggregates of coated vesicles was suggested by Manuelidis (Masters, Gajdusek 1982). The findings from this laboratory strongly favoured the view of the artefactual nature of spirals, and contradicted their involvement in the etiology and pathogenesis of spongiform encephalopathies. Recently Leach et al. (1983) attempted to culture spiroplasmae from CJD brains, and to detect antibodies to several recognized spiroplasma species. The failure of all these attempts provided no support to the hypothesis of involvement of spiroplasmae in the etiology of spongiform encephalopathies. It should be stressed also, that ultrafiltration, sedimentation and irradiation studies (Prusiner, Hadlow 1979) provided no evidence that an organism of spiroplasma dimensions may be the causative agent of spongiform encephalopathies.

ACKNOWLEDGEMENTS: The author thanks Mrs L. Romańska, Mrs J. Wendt, Mrs Kryszka and Mr C. Andrzejewski for skillful technical assistance.

CHARAKTER WTRĘTÓW SPIROPLAZMO-PODOBNYCH W DOŚWIADCZALNEJ SCRAPIE

Streszczenie

Spiroplazmy, będące patogenami roślin, są formami pozbawionymi ścian komórkowej, przez co zbliżone są do mykoplazm. W ciągu kilku ostatnich lat przed-

stawiono szereg obrazów mikroskopowo-elektronowych uzyskanych w przypadkach choroby Creutzfeldta-Jakoba i doświadczalnej scrapie, mogących odpowiadać obrazom spiroplazm. Badania te stały się podstawą hipotezy o udziale spiroplazm w etiopatogenezie encefalopatii gąbczastych. W pracy opisano spiralną inkluzję, zaobserwowaną w doświadczalnej scrapie, przypominającą spiroplazmę, pozostającą w wyraźnej łączności z neurotubulami aksonu. Wydaje się, zgodnie z przyjętym poglądem, że opisywane spiralne wtręty są jedynie artefaktami bez istotnego znaczenia patogenetycznego.

ХАРАКТЕР СПИРОПЛАЗМОПОДОБНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ SCRAPIE

Резюме

Спироплазмы, являющиеся патогенами растений, это формы, не имеющие клеточной оболочки, благодаря чему они близки микроплазмам. В течение последних нескольких лет представлено ряд электронномикроскопных картин, полученных в случаях болезни Кройцфельда-Якоба и экспериментальной scrapie, которые могли бы соответствовать представлению спироплазм. Эти исследования стали основой гипотезы об участии спироплазм в этиопатогенезе губчатых энцефалопатий. В статье описано спиральное включение, наблюдаемое в экспериментальной scrapie, напоминающее спироплазмы, находящееся в явном контакте с тубулами аксона. Согласно принятой точке зрения возможно, что описываемые спиральные включения являются только артефактами без существенного патогенетического значения.

REFERENCES

1. Baringer J., Prusiner S. B.: Experimental scrapie in mice: ultrastructural observations. *Ann. Neurology*, 1978, 4, 205—221.
2. Baringer J. R., Wong J., Klassen T., Prusiner S. B.: Further observations on the neuropathology of experimental scrapie in mouse and hamsters: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 2. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Academic Press, New York 1979, p. 11—122.
3. Bastian F. O.: Spiroplasma-like inclusions in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1979, 103, 665—669.
4. Beck E., Daniel A. J., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: The pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathy. An ultrastructural study. *Brain*, 1982, 105, 755—786.
5. Bots G. T. A. M., de Man J. C. H., Verjaal A.: Virus-like particles in brain tissue from two patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol.*, (Berl.) 1971, 18, 267—270.
6. Chou S. M., Payne W. N., Gibbs J. G., Gajdusek D. C.: Transmission and scanning electron microscopy of spongiform changes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 1980, 103, 885—904.
7. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. In: *Slow virus diseases of animals and man*. Ed. B. Kimberlin, North Holland Publ. Comp. Amsterdam, 1976, p. 210—241.
8. Gajdusek D. C.: Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 1977, 197, 943—960.
9. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Asher D. M.: Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 1966, 209, 794—796.
10. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M.,

- Matthews W. B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science* 1968, 191, 388—389.
11. Gray A., Francis R. J., Scheltz C. L.: Spiroplasma and Crautzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 1980, 2, 152.
 12. Kim J. H., Manuelidis E. E.: Ultrastructural findings in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in guinea pigs. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1982, 42, 29—43.
 13. Leach R. H., Matthews W. B., Will R.: Creutzfeldt-Jakob disease. Failure to detect spiroplasms by cultivation and serological tests. *J. Neurol. Sci.*, 1983, 59, 349—353.
 14. Liberski P. P., Alwasiak J.: The neuropathology of experimental transmissible spongiform encephalopathy (263K strain of scrapie in golden syrian hamsters). I. Standard pathology and development of lesions. *Neuropat. Pol.*, 1983.
 15. Marsh R. F., Hanson R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. In: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Vol. 1. Eds. S. B. Prusiner, W. G. Hadlow. Academic Press, New York 1979, p. 451—461.
 16. Masters C. L., Gajdusek D. C.: The spectrum of Creutzfeldt-Jakob disease and the virus-inducee subacute spongiform encephalopathies. In: *Recent Advances in neuropathology*. Eds. W. T. Smith, J. B. Cavanagh, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982, p. 139—163.
 17. Narang H. K.: Ruthenium red and lanthanum nitrate a possible tracer and negative stain for scrapie „particles”? *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1974, 29, 37—43.
 18. Narang H. K.: An electron microscopic study of the scrapie mouse and rat: further observations on virus-like particles with ruthenium red and lanthanum citrate as a possible trace and negative stain. *Neurobiology*, 1974, 2, 349—363.
 19. Narang H. K.: An electron microscopic study of natural scrapie sheep brain: further observations on virus-like particles and paramyxovirus-like tubules. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1974, 28, 317—329.
 20. Narang H. K.: Virus-like particles in Creutzfeldt-Jakob biopsy material. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1975, 32, 163—168.
 21. Prusiner S. B., Hadlow W. J.: *Slow transmissible diseases of the nervous system*. Academic Press, New York 1979.
 22. Reyes J. M., Hoenig E. M.: Intercellular spiral inclusions in cerebral processes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Exp. Neurol.*, 1981, 40, 1—8.
 23. Shibayama Y., Sakaguchi Y., Nakata K., Goto T., Nakai M., Takai T., Shirakata S.: Creutzfeldt-Jakob disease with demonstration of virus-like particles. *Acta Pathol. Jpn.*, 1982, 32, 695—702.
 24. Siakatos A. N., Raved D., Longa G.: The discovery of a particle unique to brain and spleen subcellular fractions from scrapie-infected mice. *J. gen. virol.*, 1979, 43, 417—422.
 25. Tully J. G., Whitcomb R. F., Williamson D. L., Clark H. F.: Suckling mouse cataract agent is a helical wall-free procaryot (spiroplasma) pathogenic for vertebrates. *Nature*, 1976, 259, 117—120.
 26. Tully J. G., Whitcomb R. F., Clark F. H., Williamson D. L.: Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma. *Science*, 1977, 195, 892—894.
 27. Tully J. G., Rose D. L., Garcia-Jurado O., Vignault J.-C., Saillard C., Bove J. M., McCoy R. E., Williamson D. L.: Serological analysis of a new group of spiroplasma. *Current Microbiology*, 1980, 3, 369—372.

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

TERESA E. BUGERA-PIECUCH*, BARBARA KOSICKA*,
MAREK KITTEL**, MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK*

SYNTEZA GABA W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM SZCZURA Z ZESPOŁEM POZAPIRAMIDOWYM PO OSTRYM ZATRUCIU OCTANEM KOBALTAWYM W WARUNKACH NIEDOKRWIENIA MÓZGU

* Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

** Zakład Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Nauk Fizjologicznych AM,
Warszawa

W badaniach nad chorobą Parkinsona i zespołami parkinsonowskimi szczury szczepu Han-Wistar, genetycznie obciążone zespołem pozapiramidowym i padaczką, stanowią materiał do prac nad poznaniem patomechanizmu zaburzeń pozapiramidowych (Osborne, Sontag 1978). Objawy pozapiramidowe uzyskiwano również po egzogennym podaniu substancji neurotoksycznych, jedno- lub obustronne — w zależności od zastosowanego środka farmakologicznego i miejsca uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (Agid i wsp. 1973; Tarsy i wsp. 1975; Dray i wsp. 1977; Scheel-Krüger i wsp. 1977). W doświadczalnym zatruciu manganem, jedynie po dotętnicznym wstrzyknięciu chlorku manganawego ($MnCl_2$), uzyskano przejściowy zespół pozapiramidowy (Kosicka i wsp. 1985, 1986). Biochemicznie model ten charakteryzował znaczny przyrost kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w mózgowiu szczura, obniżenie puli dopaminy (DA) i stosunku stężeń DA/GABA (Kosicka i wsp. 1985, 1986). W powyższych badaniach stwierdzono, że ważną rolę w powstawaniu klinicznego zespołu pozapiramidowego u szczura odgrywa pula GABA.

W przedstawionej pracy podjęto badania nad neurotoksycznym wpływem kobaltu, również dwuwartościowego metalu. Pierwiastek ten, w porównaniu z manganem, hamuje w większym stopniu aktywność aminotransferazy aminomaślanowej (aminotransferaza 4-aminomaślan: 2-oksooglutaran-GABA-T), enzymu katalizującego rozkład GABA (Wu 1976). Zahamowanie procesu rozpadu GABA przyczynia się do zwiększenia jego puli metabolicznej i neuroprzebieżnikowej w układzie nerwowym

(Fowler 1973; Wu, Roberts 1974). Ponadto kobalt należy do ważnych blokerów kanałów wapniowych i transportu neuroprzekaźników (Baker 1972; Sypert, Bidgood 1977; Meyer, Cooper 1983). Jony kobaltowe przez wiązanie się z układami błonowymi zakończeń nerwowych wpływają zarówno na uwalnianie, jak i na transport neuroprzekaźników (Basse-mir, Strausfeld 1983). Jony kobaltowe należą także do grupy inhibitorów niektórych enzymów układu red-ox i mogą poprzez zwiększenie niedotlenienia komórkowego prowadzić do nasilenia objawów neurologicznych (Webb 1964).

Celem niniejszej pracy było zbadanie całkowitej puli GABA i aktywności dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w niektórych strukturach OUN w objawowym modelu pozapiramidowym u szczura po zatruciu octanem kobaltowym współistniejącym z niedokrwieniem mózgu (Bugera, Śmiałek 1986).

MATERIAŁ I METODY

Zastosowano podobny model doświadczalny, jak w pracy Kosickiej i wsp. (1985), przy czym zamiast manganu wstrzykiwano octan kobaltowy.

Do badań użyto szczury rasy Wistar, samce o masie ciała 150—180 g. Po uśpieniu gamma-butyrolaktonem, wstrzykiwanym dootrzewnowo w dawce 500 mg/kg masy ciała, zwierzętom izolowano i podwiązywano obie tętnice szyjne wspólne. Następnie do tętnicy szyjnej wspólnej lewej ponad podwiązaniem wstrzykiwano octan kobaltowy w fizjologicznym roztworze chlorku sodowego w objętości 50 μ l w dawce 1 mg Co⁺⁺/mózg. Natychmiast po wstrzyknięciu soli kobaltowej podwiązywano tętnicę powyżej miejsca wkłucia igły.

Szczury przeznaczone do badań kontrolnych podzielono na 4 grupy: Grupa 1 — szczurom wyizolowano jedynie tętnice szyjne wspólne bez podwiązywania tych naczyń; grupa 2 — zwierzętom wyizolowano i podwiązano obie tętnice szyjne wspólne, grupa 3 — wyizolowano i podwiązano obie tętnice szyjne wspólne, po czym do lewej tętnicy wstrzykiwano 50 μ l 0,9% roztworu NaCl i podwiązywano ją powyżej miejsca wkłucia, natychmiast po podaniu soli; grupa 4 (norma) — obejmowała szczury nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym.

Zwierzęta doświadczalne i kontrolne 1, 2 i 3 grupy dekapitowano po upływie 24, 48 i 72 godzin od podania octanu kobaltowego lub wykonania zabiegu kontrolnego. Mózgi po wyjęciu z jamy czaszkowej oziębiano na suchym lodzie i pobierano do badań biochemicznych prążkowie, istotę czarną, zakręt hipokampa, korę centralną oraz mózdzek (robak). Próbkę natychmiast po pobraniu zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem i wykorzystano do oznaczenia poziomu GABA i aktywności GAD.

Oznaczanie stężenia GABA — wykonano metodą Love'a i wsp. (1958) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974). Struktury mózgowia homogenizowano w 5 objętościach 0,01 N HCl. Pobierano 200 μ l homogenatu i dodawano 20 μ l 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Wytrącone w ten sposób białko odwirowywano przez 20 minut w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ przy 900 g/min. Otrzymany nadsącz inkubowano przez 30 minut w temperaturze $+60^{\circ}\text{C}$ po uprzednim dodaniu 20 μ l 50 mM kwasu glutaminowego i 200 μ l 14 mM ninhydryny. Następnie dolewano odczynnik miedziowy (winian miedziowy z węglanem sodowym). Fluorescencję odczytywano na spektrofluorymetrze Aminco-Bowman przy długościach fal 380—450 nm.

Oznaczanie aktywności GAD przeprowadzono według metody Love'a i wsp. (1958) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974). Tkanke homogenizowano w 5 objętościach buforu substratowego, przygotowanego bezpośrednio przed doświadczeniem, o składzie: 0,2 M bufor fosforanowy o pH 6,4, 100 mM kwas glutaminowy i 50 mM fosforan pirydoksalu. Homogenat w objętości 200 μ l inkubowano przez 30 minut w łaźni wodnej w temperaturze $+38^{\circ}\text{C}$. Następnie dodawano 200 μ l 10% TCA. Do próbki standardu wewnętrznego zamiast TCA dodawano 200 μ l roztworu GABA w 10% TCA (1 mg GABA w 20 ml 10% TCA) i wirowano w ciągu 20 minut przy szybkości 900 g/min. Dalszy etap oznaczania aktywności GAD przeprowadzono w podobny sposób, jak oznaczenie GABA z pominięciem dodatku kwasu glutaminowego.

Białko oznaczono metodą Lowry i wsp. (1951).

Obliczenia statystyczne uzyskanych danych liczbowych wykonano przy użyciu testu *t*-Studenta.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Spośród 121 szczurów, którym podano octan kobaltawy, około 50% padło w ciągu kilku minut po iniekcji z objawami obrzęku płuc. Około 10% zwierząt nie wybudziło się w okresie 2 godzin po zabiegu operacyjnym i zginęło z objawami zaburzeń oddechowych (bradypnoe, oddech typu Chaynes—Stockesa). Pozostałe przy życiu zwierzęta były początkowo spowolnione ruchowo i miały zjezoną sierść. Po około 24 godzinach zaobserwowano drżenie żuchwy i głowy, wzmożone napięcie mięśni kończyn i grzbietu oraz obniżenie aktywności ruchowej. Zwierzęta chodziły na usztywnionych kończynach z łukowato wygiętym grzbietem. Stopniowo narastały u nich zmiany w gałkach ocznych, wskazujące na zmętnienie rogówki. Wraz z narastającym spowolnieniem ruchowym obserwowano niechęć do jedzenia i picia. Okres przeżycia szczurów nie przekraczał zwykle 7 dni. Tylko 4 szczury utrzymały się przy życiu przez 10 dni.

Zwierzęta kontrolne po obustronnym podwiązaniu tętnic szyjnych wspólnych (grupa 2) i po obustronnym podwiązaniu tych tętnic oraz podaniu fizjologicznego roztworu NaCl (grupa 3) przeżywały okres 30 dni i dłużej bez objawów pozapiramidowych.

Wyniki badań biochemicznych

Zawartość GABA w mózgowiu szczurów doświadczalnych i kontrolnych przedstawiono w tabeli 1.

Prążkowie. U szczurów nie poddanych żadnym zabiegom, traktowanych jako norma stwierdzono $23,86 \pm 1,86$ nmola GABA/mg białka. W pozostałych grupach kontrolnych uzyskano: w grupie 1 — $24,29 \pm 2,14$ nmola GABA/mg białka, w grupie 2 — $25,15 \pm 1,57$, w grupie 3 — $24,86 \pm 1,86$ nmola GABA/mg białka. Różnice wyników uzyskanych w grupach kontrolnych były nieznamienne statystycznie w porównaniu z normą. Po 24 godz. od wstrzyknięcia octanu kobaltowego nie zanotowano istotnych różnic w odniesieniu do normy. W 48 i 72 godz. po zatruciu stwierdzono wzrost poziomu GABA odpowiednio o 242 i 223%.

Istota czarna. Stężenie GABA w normie wynosiło 23,86 nmola GABA/mg białka. Wyniki uzyskane w grupach kontrolnych nie różniły się istotnie od normy. U szczurów doświadczalnych po 24 godz. od zatrucia obserwowano znamienne statystycznie przyrost GABA o 65,9%, po 48 godz. o 155,7%, a po 72 godz. o 214,4%.

Zakręt hipokampa. U szczurów nie poddanych żadnym zabiegom stwierdzono $10,14 \pm 1,86$ nmoli GABA/mg białka. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy grupą przyjętą za normę i pozostałymi grupami kontrolnymi. U szczurów z 24-godz. przeżyciem po zatruciu przyrost GABA w zakręcie hipokampa był statystycznie nieznamienne, natomiast po 48 i 72 godz. zaobserwowano wzrost stężenia GABA odpowiednio o 673,24% i 466,2% w porównaniu z normą.

Kora centralna. W grupie zwierząt stanowiących normę zanotowano $12,14 \pm 2,00$ nmola GABA/mg białka. Różnice grup kontrolnych w stosunku do normy nie były istotne statystycznie. Po zatruciu octanem kobaltowym we wszystkich przedziałach czasu występowały statystycznie znamienne różnice. Po 24 godz. w korze centralnej stwierdzono zwiększenie puli GABA o 253%, po 48 godz. o 411,8% a po 72 godz. o 355,3% w porównaniu z normą.

Robak mózdzku. Stężenia GABA w tej strukturze wynosiły $5,29 \pm 0,86$ nmola/mg białka w normie. W grupach kontrolnych nie stwierdzono istotnych różnic w całkowitej puli GABA w porównaniu z normą. U szczurów, którym wstrzyknięto octan kobaltowy, obserwowano wzrost poziomu GABA we wszystkich przedziałach czasowych: po 24 godz. o 143%, po 48 godz. o 643%, a po 72 godz. o 783,8% w stosunku do normy.

Tabela 1. Poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w mózgowiu szczura po ostrym zatruciu octanem kobaltowym (nmole GABA/mg białka)
 Table 1. GABA level in the rat brain following acute cobaltous acetate intoxication (nmoles GABA/mg protein)

Struktura Structure	Norma Norm	Kontrola Control			Zatrucie + niedokrwienie Intoxication + ischemia		
		zabieg operacyjny sham operation	ischemia	ischemia +0,9% NaCl	24 godz. h	48 godz. h	72 godz. h
Prążkowie Striatum	23,86±1,86 (8)	24,29±2,14 (8)	25,15±1,57 (8)	24,86±1,86 (8)	22,57±2,57 (8)	81,71±0,57*	77,00±2,00*
Istota czarna S. nigra	23,86±2,00 (8)	23,57±2,29 (8)	24,71±2,71 (8)	25,00±2,86 (8)	39,57±3,43*	61,00±4,57*	75,00±3,29*
Kora centralna Central cortex	12,14±2,00 (8)	11,86±3,43 (8)	13,00±2,86 (8)	13,14±3,43 (8)	41,43±2,71*	62,43±4,57*	55,29±2,00*
Zakręt hipokampa Hippocampus	10,14±1,86 (8)	10,14±2,57 (8)	10,29±2,14 (8)	10,86±2,57 (8)	13,14±3,14 (8)	78,43±1,29*	57,43±3,14*
Robak mózdzku Cerebellar vermis	5,29±0,86 (8)	5,43±2,57 (8)	6,29±2,43 (8)	6,14±2,14 (8)	12,86±0,71*	39,29±1,57*	46,71±2,43*

Wyniki podano jako średnie arytmetyczne ± średni błąd średniej. W nawiasach — liczba zwierząt

Results are arithmetic means ± mean error of the mean. In brackets number of animals is given

* $p < 0,05$ obliczone wg testu *t*-Studenta

* $p < 0.05$ calculated according to *t*-Student's test

Tabela 2. Aktywność dekarboksylazy glutaminowej (GAD) (pmol GABA/mg białka/min) w mózgowiu szczura w ostrym zatruciu octanem kobaltowym
 Table 2. L-glutamate decarboxylase (GAD) activity (pmoles GABA/mg protein/min) in the rat brain following acute cobaltous acetate intoxication

Struktura Structure	Norma Norm	Kontrola Control		Zatrucie + niedokrwienie Intoxication + ischemia			
		zabieg operacyjny sham operation	ischemia	ischemia +0,9% NaCl	24 godz h	48 godz h	72 godz h
Prążkowie Striatum	5,27±0,47 (8)	5,26±0,03 (8)	5,20±0,10 (8)	5,40±0,50 (8)	4,06±0,40* (8)	3,05±0,64* (8)	4,52±0,20* (8)
Istota czarna S. nigra	6,29±0,32 (8)	6,26±0,65 (8)	6,43±0,63 (8)	6,50±0,64 (8)	3,33±0,13* (8)	3,33±0,06* (8)	3,69±0,13* (8)
Zakręt hipokampa Hippocampus	5,02±0,90 (8)	4,98±0,11 (8)	4,80±0,41 (8)	4,88±0,48 (8)	2,06±0,29* (8)	2,15±0,10* (8)	3,70±0,10* (8)
Kora centralna Central cortex	4,28±0,30 (8)	4,27±0,24 (8)	4,33±0,23 (8)	4,29±0,05 (8)	3,04±0,13* (8)	2,16±0,27* (8)	4,08±0,13 (8)
Mózdzek – robak Vermis – cerebellar	3,55±0,20 (8)	3,52±0,33 (8)	3,32±0,37 (8)	3,30±0,26 (8)	2,24±0,12* (8)	2,54±0,26* (8)	4,00±0,10 (8)

Objaśnienia w tab. 1

Explanations in Table 1

Aktywność GAD w mózgach zwierząt doświadczalnych i kontrolnych zestawiono w tabeli 2.

Prążkowie. Nie stwierdzono znamiennych statystycznie różnic aktywności GAD we wszystkich grupach kontrolnych w odniesieniu do normy. U zwierząt, którym wstrzyknięto octan kobaltawy, zaobserwowano istotny spadek aktywności tego enzymu we wszystkich grupach czasowych: po 24 godz. o 22,9%, po 48 godz. o 42% i po 72 godz. o 14,2%.

Istota czarna. Podobnie jak w prążkowie nie zanotowano istotnych różnic w aktywności enzymu w normie i w pozostałych grupach kontrolnych. U zwierząt poddanych zatruciu kobaltem stwierdzono znamienny statystycznie spadek aktywności GAD po 24 i 48 godz. około 47%, a po 72 godz. około 41,4% w porównaniu z normą.

Zakręt hipokampa. Różnice w aktywności enzymu w normie i w grupach kontrolnych były statystycznie nieznamienne. W 24 godz. po zatruciu aktywność GAD w zakręcie hipokampa stanowiła 41% normy, po 48 godz. — 42,9%, a po 72 godz. — 73,6%. We wszystkich grupach czasowych spadek aktywności enzymu był statystycznie istotny.

Kora centralna. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy aktywnością enzymu w grupie zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym i poszczególnymi grupami zwierząt kontrolnych. W wyniku zatrucia kobaltem aktywność GAD uległa obniżeniu około 29% po 24 godz. i około 49,4% po 48 godz. w stosunku do normy. W 72 godz. po zatruciu aktywność GAD w korze centralnej nie różniła się istotnie od normy.

Robak mózdzku. Podobnie jak we wszystkich pozostałych strukturach, aktywności enzymu w grupach kontrolnych nie różniły się istotnie od normy. U szczurów z 24 godz. przeżyciem po zatruciu stwierdzono spadek aktywności GAD około 47%, po 48 godz. około 28,5%, w obu przedziałach czasowych statystycznie znamienne w porównaniu z normą. Po 72 godz. od zatrucia zanotowano nieznaczny, (ok. 12,7% normy) statystycznie nie istotny wzrost aktywności enzymu.

OMÓWIENIE

W badanych modelach ostrego zatrucia szczura kobaltem w warunkach niedokrwienia OUN objawy piramidowe uzyskano tylko u tych zwierząt, którym podano octan kobaltawy po podwiązaniu obu tętnic szyjnych wspólnych. Nasilenie zaburzeń piramidowych narastało wraz z czasem przeżycia zwierząt po zatruciu, przy czym obserwowano obniżenie aktywności ruchowej i przewagę napięcia mięśniowego nad drżeniem. W uzyskanym objawowym modelu zatrucia octanem kobaltawym w badanych strukturach mózgowia, a zwłaszcza w istocie czarnej i w prążkowie, obserwowano stopniowe narastanie poziomu GABA, któremu towarzyszyły utrzymujące się zaburzenia pozapiramidowe. Stopniowe

zwiększanie się puli GABA może stanowić istotny element do wyjaśnienia narastających objawów pozapiramidowych. Na poparcie słuszności tej hipotezy można przytoczyć wyniki uzyskane w podobnym modelu doświadczalnym, w którym zamiast jonów kobaltowych zastosowano jony manganawe (Kosicka i wsp. 1985). Również i w tym modelu ustępowanie przejściowego zespołu pozapiramidowego było związane ze stopniową normalizacją poziomu GABA.

Przyrostowi puli GABA po zatruciu octanem kobaltowym nie towarzyszyło zwiększenie syntezy tego neuroprzekaźnika, a nawet w późnych przedziałach czasu w niektórych strukturach OUN stwierdzono obniżenie aktywności GAD. Znane jest zjawisko hamowania aktywności enzymu syntetyzującego GAD przez zwiększone stężenie produktu reakcji, jakim jest GABA (Sze, Lowell 1970; Sze i wsp. 1971). Znaczne zwiększenie poziomu GABA po zatruciu octanem kobaltowym w warunkach niedokrwienia mózgu u szczura, wobec braku przyrostu jego syntezy, może sugerować możliwość obniżenia rozpadu GABA na etapie katalizowanym przez aminotransferazę aminomaślanową (GABA-T). Zjawisko nagromadzenia GABA w układzie nerwowym w tych warunkach doświadczalnych może wiązać się również ze zwiększonym uwalnianiem i transportem tego neuroprzekaźnika. Kobalt należy do ważnych dwuwartościowych metali blokujących wolne kanały wapniowe (Baker 1972; Kashiwayanagi i wsp. 1983; Meyer, Cooper 1983; Miyamoto 1983). Ponadto pierwiastek ten jest szybko i trwale wiązany przez układy błonowe pęcherzyków synaptycznych i struktury części postsynaptycznej (Bassemir, Strausfeld 1983), co w efekcie może prowadzić do hamowania przewodnictwa pre- i postsynaptycznego i zmniejszenia uwalniania GABA (Sybert, Bidgood 1977).

Układ tego typu może przyczynić się do zmian w układzie dopaminergicznym, odpowiedzialnym w głównej mierze za powstanie zespołu parkinsonowskiego. Jony kobaltowe są bardzo szybko transportowane drogą aksonalną (Clayton, Emson 1977), prowadząc do uszkodzenia włókien mielinowych (Bugera, Śmiałek 1986; Gajkowska i wsp. 1986).

Wpływ kobaltu na pulę związków wysokoenergetycznych może wiązać się z jego działaniem hamującym aktywność niektórych enzymów układu red-ox związanych z cyklem Krebsa i syntezą wysokoenergetycznych wiązań fosforanowych (Webb 1964). Ponadto niektóre dwuwartościowe kationy metali w warunkach niedotlenienia prowadzą do autooksydacji dopaminy i produkcji toksycznych wolnych rodników O_2^- , H_2O_2 i $OH\cdot$ (Donaldson i wsp. 1980). Można sądzić, że niedotlenienie wywołane w naszym modelu przez podwiązanie tętnic szyjnych wspólnych mogło przyczynić się do zwiększenia toksycznego działania jonów Co^{++} . Duży przyrost puli GABA u naszych szczurów z zespołem pozapiramidowym może być również tłumaczony rozwojem niedotlenienia zarówno cytotoksycznego, jak i ischemicznego. Wiadomo, że synteza

GABA postępuje w warunkach beztlenowych, podczas gdy rozkład tego neuroprzekaźnika wymaga stanu pełnego utleniania komórkowego (Thorn i wsp. 1973).

WNIOSKI

1. Obecność zespołu pozapiramidowego u szczura po zatruciu octanem kobaltowym zależy od stopnia niedokrwienia mózgu.
2. Zwiększenie całkowitej puli GABA w wyniku zatrucia octanem kobaltowym w warunkach niedokrwienia mózgu nie zależy od przyrostu syntezy tego neuroprzekaźnika.
3. Klinicznemu zespołowi pozapiramidowemu rozwijającemu się po zatruciu octanem kobaltowym towarzyszy wzrost poziomu GABA w mózgowiu szczura.

СИНТЕЗ GABA В МОЗГЕ КРЫСЫ С ЭКСТРАПИРАМИДНЫМ СИНДРОМОМ ПОСЛЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ АЦЕТИЛАНОМ КОБАЛЬТА СВЯЗАННЫМ С ИШЕМИЕЙ МОЗГА

Резюме

Экспериментальный экстрапиримидный синдром у крысы был выработан методом введения раствора ацетила кобальта (1 мг Co^{++} /мозг) в шейную артерию в условиях ишемии мозга, вызванной перевязкой общих стволов обеих шейных артерий.

Содержание GABA и активность GAD определялись спектрофлюорометрическим методом по Love и соавт. (1958) в модификации Sutton a. Simmonds (1974).

Обнаружено значительное увеличение целого пула GABA в striatum черном веществе, центральной коре мозга, извилине гиппокампа и червячке мозжечка (от 65,9% по прошествии 24 часов после операции — в черном веществе, до 783,8% по прошествии 7 часов — в червячке мозжечка). Увеличение клинических экстрапиримидных симптомов сопровождалось постепенным увеличением уровня GABA в мозге крысы.

Не наблюдалось зависимости между увеличением пула GABA и возрастанием синтеза этого нейротрансмитера поскольку активность GAD не подвергалась изменениям или снижалась.

GABA SYNTHESIS IN THE BRAIN OF RAT WITH EXTRAPYRAMIDAL SYNDROME FOLLOWING ACUTE COBALTOUS ACETATE INTOXICATION ASSOCIATED WITH CEREBRAL ISCHEMIA

Summary

Extrapyramidal syndrome was achieved by injection of cobaltous acetate (1 mg Co^{++} /brain) into the left common carotid artery of rats in which cerebral ischemia was caused by ligation of both common carotid arteries. GABA concentration and GAD activity were estimated with a spectrofluorimetric method after Love et al. (1958) in Sutton's and Simmond's modification (1974).

A marked increase of total GABA pool in striatum, s. nigra, central cortex, hippocampus and cerebellar vermis was stated (from 65.9% in s. nigra 24 h

after operation up to 783.8% in cerebellar vermis in rats with 72 h survival time). Increase of GABA concentration was associated with the graduate intensification of extrapyramidal symptoms. No relationship was found between GABA concentration and GAD activity, which was unchanged or even decreased.

PISMIENICTWO

1. Agid Y., Javoy F., Glowinski J.: Hyperactivity of remaining dopaminergic neurons after partial destruction of the nigrostriatal dopaminergic system in the rat. *Nature (Lond.)*, 1973, 245, 150—152.
2. Baker P. F.: Transport and metabolism of calcium ions in nerve. *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1972, 24, 177—223.
3. Bassemir U. K. and Strausfeld N. Y.: Cytology of cobalt-filled neurons in flies: cobalt deposits at presynaptic and postsynaptic sites, mitochondria and the cytoskeleton, *J. Neurocytol*, 1983, 12, 949—970.
4. Bugera T., Śmiałek M.: Zmiany patomorfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym szczura w następstwie zatrucia kobaltem i niedokrwienia mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 209—220.
5. Clayton P. R., Emson P. C.: Cobalt toxicity convulsion. *Experientia (Basel)*, 1976, 32, 1302—1305.
6. Donaldson J., La Bella F. S., Gesser D.: Enhanced autooxidation of dopamine as a possible basis of manganense neurotoxicity. *Neurotoxicol.*, 1980, 2, 53—64.
7. Dray A., Oakey N. R. and Simmonds M. A.: Rotational behaviour following inhibition of GABA metabolism unilaterally in the rat substantia nigra. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1977, 27, 627—629.
8. Fowler L. J.: Analysis of the major amino acids of rat brain after *in vivo* inhibition of GABA-transaminase by ethanolamine O-sulphate. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 437—440.
9. Gajkowska B., Bugera T., Śmiałek M.: Ultrastruktura mieliny w ośrodkowym układzie nerwowym szczura po zatruciu octanem kobaltowym. *Neuropt. Pol.*, 1986, 24, 545—555.
10. Kashivayanagi M., Miyoke M., Kurihara K.: Voltage dependent Ca^{++} channel and Na^{++} channel in frog taste cells. *Am. J. Physiol.*, 1983, 244, 82—88.
11. Kosicka B., Bugera T., Kittel M., Śmiałek M.: Badanie poziomu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) oraz aktywność dekarboksylazy glutaminianowej (GAD) w ostrym zatruciu chlorkiem manganawym. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 201—209.
12. Kosicka B., Bugera T., Śmiałek M.: Stosunek stężeń dopamina (GABA) w mózgu szczura w następstwie zatrucia chlorkiem manganawym. *Neuropat. Pol.*, 1986 (w druku).
13. Lowry O. H., Rosebrough N. J.: Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
14. Love I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8—13.
15. Meyer E. M., Cooper J. R.: Cobalt-ions dissociate between calcium uptake through voltage-dependent sodium and calcium channels in synaptosomes, *Brain Res.* 1983, 265, 173—176.
16. Miyamoto M. D.: Hg^{++} causes neurotoxicity at an intracellular site following entry through Na and Ca channels. *Brain Res.*, 1983, 16, 265, 173—176.
17. Osborne N. N., Sontag K. H.: Some characteristic of mutant Han-Wistar rats which exhibit paresis and paralysis. W. Dopamine: *Advances Biochem. Psychopharmacol. Red. P. J. Roberts*, Raven Press, New York, 1978, 19, 557—361.

18. Scheel-Krüger J., Arnt J., Magelund G.: Behavioural stimulation induced by muscimol and other GABA agonists injected into the substantia nigra. *Neurosci. Lett.*, 1977, 4, 351—356.
19. Strausfeld N. J., Bassemir U. K.: Cobalt coupled neurons of a giant fibre system in Diptera, *J. Neurocytol.*, 1983, 12, 971—991.
20. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain, *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801—1805.
21. Sypert G. W., Bidgood W. D.: Effect of intracellular cobalt ions on postsynaptic inhibition in cat spinal motoneurons. *Brain Res.*, 1977, 134, 372—376.
22. Sze P. Y., Lovell R. A.: Reduction of level of L-glutamic acid decarboxylase by aminobutyric acid in mouse brain. *J. Neurochem.*, 1970, 17, 1657—1664.
23. Sze P. Y., Kuriyama K., Haber B., Roberts E.: Effect of GABA on L-glutamic acid decarboxylase activities in chick embryo brain. *Brain Res.*, 1971, 26, 121—130.
24. Tarsy D., Pycock C., Meldrum B., Marsden C. D.: Rotational behaviour induced in rats by intranigral picrotoxin. *Brain Res.*, 1975, 89, 160—165.
25. Thorn W., Grieshaber Th., Jange H.: Gamma-Aminobutterssäure und NH_3 -Gehalt in Kaninchenhirnen nach Hypoxie und Ischämie. *Pflueger. Arch. Ges. Physiol.*, 1973, 345, 347—351.
26. Webb M.: The biological action of cobalt and other metals IV. Inhibition of α -oxoglutarate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1964, 431—446.
27. Wu J. Y., Roberts E.: Properties of brain L-glutamate decarboxylase: Inhibition studies. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 759—767.
28. Wu J. Y., Purification, characterization and kinetic studies of GAD and GABA-T from mouse brain, W: GABA in Nervous System Function, Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York, 1976, 7—55.

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

RYSZARD PLUTA, BARBARA OSTROWSKA

ZMIANY ECoG i EKG W OSTRYM ZATRUCIU TRÓJETYLKIEM CYNY U SZCZURÓW

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Zatrucie trójetylkiem cyny (TET) powoduje zmiany czynnościowe i strukturalne w ośrodkowym układzie nerwowym (Magee i wsp. 1957; Torack i wsp. 1970; Benedek i wsp. 1979). Związane są one z neurotoksycznym działaniem tego związku. Obserwacje kliniczne oraz wyniki badań doświadczalnych wskazują, że TET wywołuje cytotoksyczny obrzęk mózgowia i uszkodzenie osłonek mielinowych (Lee, Bakay 1965; Hedges, Zaren 1969; Torack i wsp. 1970). To ostatnie charakteryzuje się rozwarstwieniem blaszek oraz tworzeniem wakuoli wewnątrz linii międzykresowej osłonki mielinowej (Scheinberg i wsp. 1961; Hirano i wsp. 1968; Graham, Gonatas 1973) i w konsekwencji może prowadzić do zwyrodnienia osłonek w ośrodkowym układzie nerwowym (Smith 1973; Gerren i wsp. 1976).

Badania patofizjologiczne zarówno w ostrym, jak i w przewlekłym zatruciu TET prowadzono sporadycznie. Ograniczały się one do ogólnej charakterystyki EEG (Benedek i wsp. 1976; Marshall i wsp. 1976). Nie znaleziono natomiast w dostępnym piśmiennictwie równolegle prowadzonych badań ECoG i EKG u zwierząt podczas ostrego zatrucia trójetylkiem cyny. Tego typu badania mają istotne znaczenie nie tylko dla charakterystyki faz, dynamiki i przebiegu zatrucia, ale także dla wyjaśnienia mechanizmów rozwijających się w tym czasie zmian patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym. W pracy podjęto próbę porównania zmian wybranych parametrów fizjologicznych w warunkach ostrego zatrucia TET, przy zastosowaniu dwóch różnych dawek.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na szczurach rasy Wistar o masie ciała 150—250 g. Doświadczenia przeprowadzono w dwóch grupach. Zwierzętom grupy 1 podawano TET dootrzewnowo, jednorazowo w dawce 2,5 mg/kg

masy ciała. Zwierzęta grupy 2 otrzymywały TET w dawce 9 mg/kg masy ciała. Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym zamiast TET wstrzyknięto dootrzewnowo 0,9% roztwór NaCl. Po 12, 24, 48 godz. od podania TET szczury usypiano eterem (każda grupa czasowa obejmowała 5 zwierząt). Następnie po miejscowym znieczuleniu 1% Xylocainą odślaniano kości czaszki. Srebrne elektrody igłowe mocowano w kościach czaszki w okolicy ciemieniowej, potylicznej i w zatoce czołowej w celu rejestracji ECoG. Stosowano dwa odprowadzenia jedno jednobiegunowe i drugie dwubiegunowe. Zapisy ECoG i EKG (odprowadzenie II) rejestrowano za pomocą aparatu EEG (Accutrace-8, firmy Beckman).

Po zakończeniu doświadczeń u wszystkich zwierząt przeprowadzono badanie sekcyjne, zwracając szczególną uwagę na zmiany występujące w sercu i płucach. Do badań w mikroskopie świetlnym pobrano wycinki z mięśnia sercowego, które po utrwaleniu w 10% formalinie przeprowadzono w sposób standardowy i zatapiano w parafinie. Skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

U zwierząt obu grup doświadczalnych pierwsze objawy kliniczne obserwowano już po kilku minutach od momentu wstrzyknięcia TET. Stwierdzano tachykardię, przyspieszenie oddechu oraz spowolnienie ruchowe nasilające się wraz z upływem czasu. Szczury były apatyczne, nie reagowały lub słabo reagowały na otoczenie. W tym czasie obserwowano również postępujące zwiótczenie mięśni szkieletowych.

U zwierząt, którym podano TET w dawce 2,5 mg/kg masy ciała, oprócz spowolnienia, obserwowano brak koordynacji ruchów, które w tym czasie odbywały się w płaszczyźnie poziomej w lewo lub w prawo i miały charakter pelzający. Natomiast u szczurów, które otrzymały 9 mg/kg masy ciała, pojawiały się w tym czasie objawy śpiączki. U zwierząt obu grup bardzo silne bodźce bólowe powodowały krótkotrwałe, opóźnione i zwolnione reakcje ruchowe. Opisane objawy obserwowano po 6 godz. od podania TET. Po tym czasie u zwierząt grupy 1 występował mniej lub bardziej głęboki sen, natomiast szczury grupy 2 były w stanie śpiączki o różnym nasileniu. Reakcje odruchowe były u szczurów minimalne lub okresowo zniesione.

W 12 godz. po wstrzyknięciu TET w dawce 2,5 mg/kg masy ciała zwierzęta wykazywały spontaniczną aktywność ruchową. Natomiast u zwierząt grupy 2 można było za pomocą silnych bodźców wywołać reakcje odruchowe, które były bardziej dynamiczne i dłużej trwające niż w 6 godz. po podaniu TET.

W 18 godz. po iniekcji TET u zwierząt obu grup objawy kliniczne ponownie się nasilały. Szczury grupy 1 słabo reagowały na otoczenie, występowało spowolnienie ruchowe i zwiótczenie mięśni szkieletowych, u zwierząt grupy 2 rozwijał się ponownie stan głębokiej śpiączki.

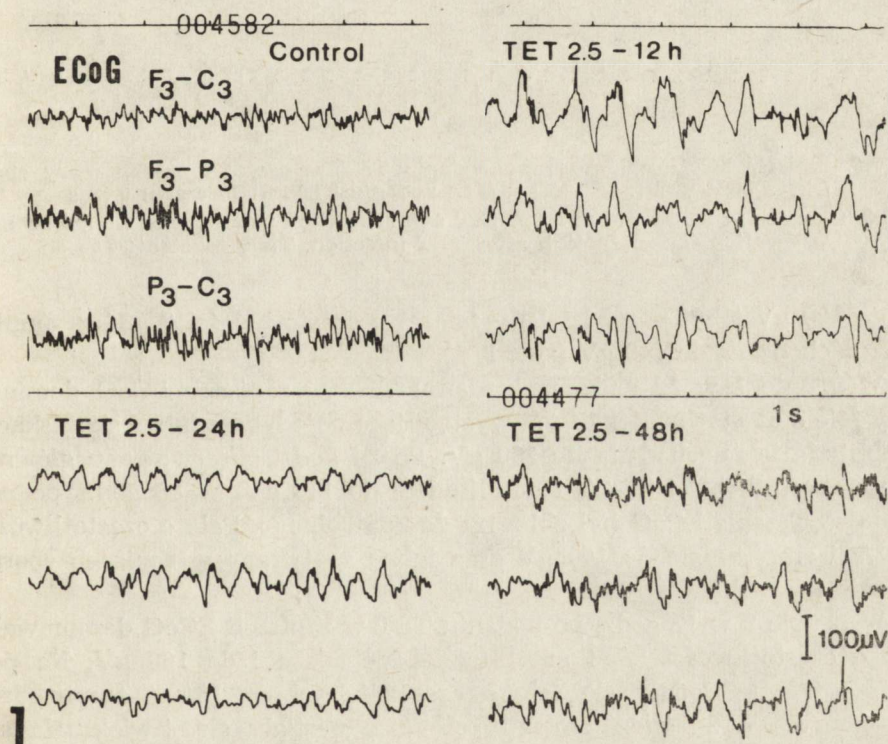
Po 48 godz. po podaniu TET stan kliniczny zwierząt grupy 1 był zbliżony do normy. Tylko u niektórych zwierząt grupy 2 obserwowano nieznaczną poprawę, co objawiało się ustąpieniem stanu śpiączki oraz nasileniem reakcji odruchowych i ruchowych na silne bodźce, natomiast większość była w stanie śpiączki.

Po 2—3 dniach większość zwierząt grupy 1 nie różniła się od kontroli, jednakże pojedyncze szczury tej grupy w tym czasie padały. Natomiast w grupie 2 tylko pojedyncze zwierzęta wykazywały nieznaczną poprawę stanu klinicznego, a większość szczurów z nasilonymi niedowładami i porażeniami tylnych kończyn padała wśród objawów niewydolności krążenia.

U wszystkich zwierząt przez cały okres obserwowano obniżenie ciepłoty ciała, pragnienia i łaknienia.

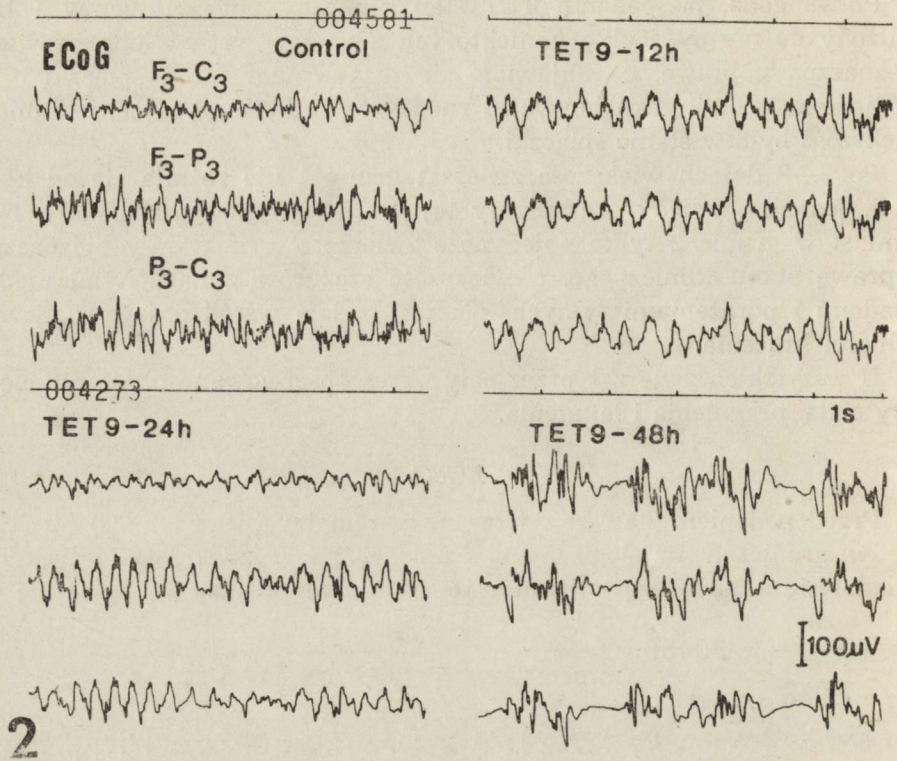
ECoG

Przed podaniem TET rejestrowane parametry (ECoG, EKG) mieściły się w granicach fizjologicznych. Zapis ECoG u zwierząt kontrolnych składał się z fal o częstotliwości 16—20/s z amplitudą wahającą się od



Ryc. 1. Zmiany ECoG u szczura po podaniu TET w dawce 2,5 mg/kg masy ciała. Okres obserwacji: 12—48 godz. po iniekcji. Stała czasu: 0,03 s

Fig. 1. Changes in ECoG in rat after TET administration in a dose of 2.5 mg/kg b.w. Observation time: 12—48 h after TET injection. Time constant: 0.03 s



Ryc. 2. Zmiany ECoG u szczura po podaniu TET w dawce 9 mg/kg masy ciała. Okres obserwacji: 12–48 godz. po podaniu TET. Stała czasu: 0,03 s

Fig. 2. Changes in ECoG in rat after TET administration in a dose of 2.5 mg/kg b.w. Observation time: 12–48 h after TET injection. Time constant: 0.03 s

10 do 100 μV i był porozdzielany falami o częstotliwości 3–5/s z amplitudą dochodzącą do 140 μV (ryc. 1, 2).

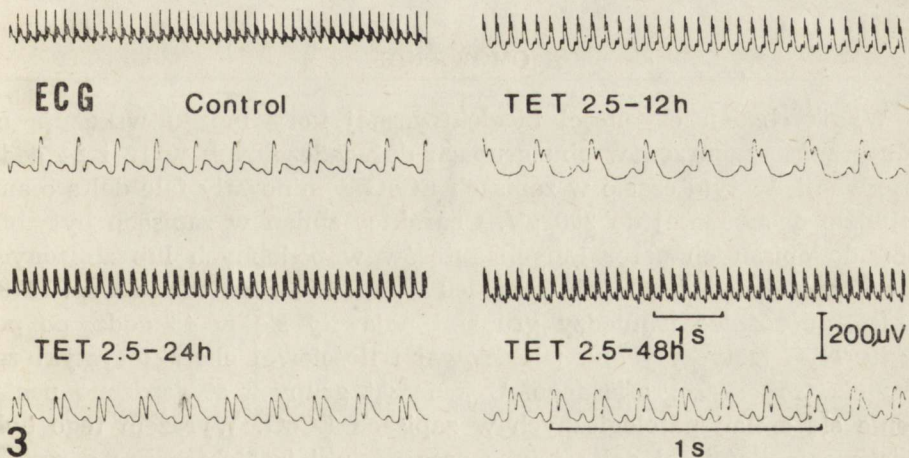
W grupie 1 w 12 godz. po podaniu TET w zapisach ECoG dominowały fale o częstotliwości 1–3/s występujące pojedynczo lub w skupiskach. Amplituda ich dochodziła do 200 μV . Po 24 godz. obserwowano głównie fale o częstotliwości 2–3/s i amplitudzie do 110 μV . W 48 godz. po podaniu TET zapis ECoG był zbliżony do kontrolnego. Fale o częstotliwości 1–3/s i amplitudzie do 160 μV oraz iglice spotykano w zapisach sporadycznie (ryc. 1).

W grupie 2 w 12 godz. po podaniu TET w zapisach ECoG dominowały fale o częstotliwości 3/s i amplitudzie dochodzącej do 160 μV . Na powyższe fale nakładały się fale o częstotliwości do 16/s i amplitudzie 10–40 μV . Po 24 godz. zmiany powyższe nasilały się. Zwiększała się ilość fal wolnych na niekorzyść fal o częstotliwości średniej. W 48 godz. stwierdzano skupiska fal o częstotliwości 8/s. Skupiska te składały się głównie z fal delta i iglic i były porozdzielane izoelektrycznymi odcinkami o zmiennym czasie trwania (ryc. 2).

EKG

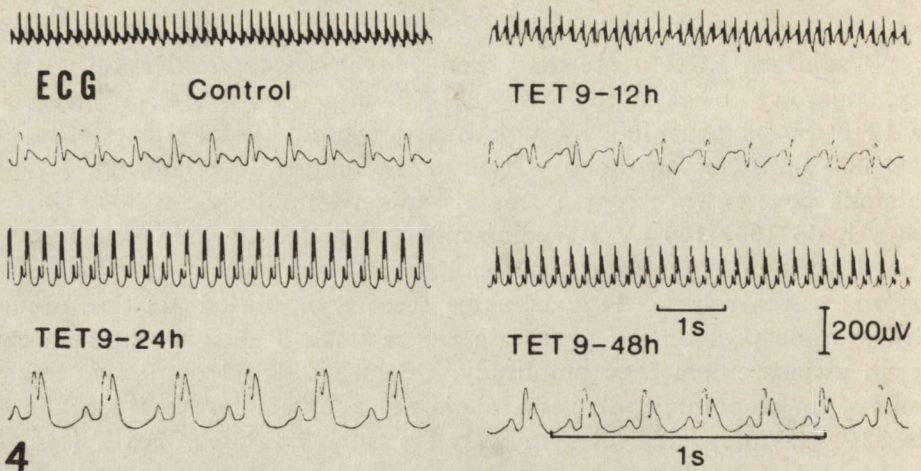
W zapisach EKG u szczurów kontrolnych występował rytm zatokowy, miarowy o częstotliwości 420—456/min (ryc. 3 i 4). W grupie 1 w 12 godz. po podaniu TET pojawiała się bradykardia o częstotliwości 290—358/min. Obserwowano w tym czasie uniesienie załamka T i zanik załamka S, z równoczesnym zmniejszeniem amplitudy zespołów komorowych do 100—140 μ V i wydłużeniem czasu ich trwania. Odcinek TP miał kształt miseczkowaty i był obniżony, a czas jego trwania był dłuższy niż w kontroli. Po 24 godz. akcja serca wynosiła od 312 do 375/min. Stwierdzano postępujące unoszenie się załamka T do góry z równoczesnym zwiększeniem jego amplitudy. Odcinek TP był obniżony, lecz w mniejszym stopniu. W 48 godz. akcja serca była miarowa i dochodziła do 324—380/min, nadal utrzymywały się zmiany załamka S i T (ryc. 3).

W grupie 2 w 12 godz. po podaniu TET obserwowano bradykardię wynoszącą 288—384/min. Zespoły komorowe miały zmniejszoną amplitudę w porównaniu do kontroli. Załamek S miał kształt miseczkowaty i był obniżony. Natomiast załamek T był uniesiony, a załamek P miał zwiększoną amplitudę. Oprócz tego stwierdzano wydłużenie odcinka ST z równoczesnym skróceniem odcinka TP. Po 24 godz. obserwowano uniesienie załamka T, natomiast załamek S zanikał. Odcinek TP był obniżony i miał kształt miseczkowaty. Załamek P nadal miał zwiększoną amplitudę. Zespoły komorowe miały większą amplitudę niż w kontroli. Natomiast odcinek PR był wydłużony. Akcja serca w tym czasie wynosiła od 177 do 357/min. W 48 godz. akcja serca była miarowa i wahała się od 182 do 353/min. Zmiany załamków P, S i T oraz odcinka TP nadal się utrzymywały, lecz o mniejszym nasileniu (ryc. 4).



Ryc. 3. Zmiany EKG u szczura po podaniu TET w dawce 2,5 mg/kg masy ciała. Okres obserwacji: 12—48 godz. po iniekcji TET. Stała czasu: 0,03 s.

Fig. 3. Changes of ECG in rat after TET administration in a dose of 2.5 mg/kg b.w. Observation time: 12—48 h after TET injection. Time constant: 0.03 s.



Ryc. 4. Zmiany EKG u szczura po podaniu TET w dawce 9 mg/kg masy ciała. Okres obserwacji: 12—48 godz. po iniekcji TET. Stała czasu: 0,03 s.
 Fig. 4. Changes of ECG in rat after TET administration in a dose of 9 mg/kg b.w. Observation time: 12—48 h after TET injection. Time constant: 0.03 s.

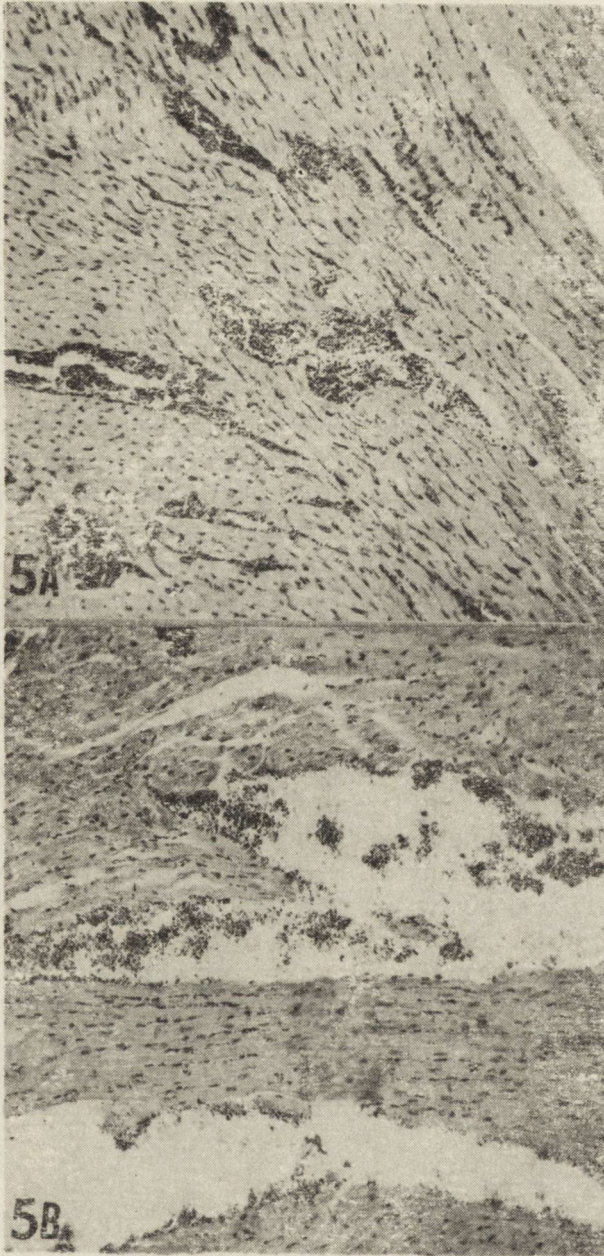
Badanie morfologiczne mięśnia sercowego

W obu grupach doświadczalnych, niezależnie od czasu przeżycia zwierząt, podczas oceny makroskopowej obserwowano w mięśniu sercowym punktowe wybroczyny krwawe o różnym umiejscowieniu i zmiennej ilości. W badaniach mikroskopowych stwierdzono rozległe, świeże wylewy krwawe rozsuwające i rozrywające włókna mięśniowe oraz jeziorka płynu przesiękowego umiejscowione głównie przynaczyniowo, rzadziej bez związku z naczyniami pomiędzy pasmami włókien mięśniowych (ryc. 5A, B).

OMÓWIENIE

Wyniki badań czynności bioelektrycznej kory mózgu wskazują na identyczność zaburzeń w obu grupach doświadczalnych w 12 i 24 godz. obserwacji. W tym czasie w zapisach ECoG dominowały fale delta o amplitudzie dochodzącej do 200 μ V. Charakter zmian w zapisach był zbliżony do opisanych przez innych autorów w podobnych lub zbliżonych warunkach doświadczalnych (Benedek i wsp. 1976; Benedek i wsp. 1979).

Istotne różnice pomiędzy grupami pojawiły się w 48 godz. po podaniu TET. Dotyczyły one jakościowej i ilościowej charakterystyki zapisu elektrokortykograficznego. U zwierząt grupy 2 stwierdzono pogłębienie się zmian patologicznych w zapisach ECoG. Wyrazem tego było zwiększenie ilości fal delta i iglic oraz odcinki izoelektryczne o zmiennym czasie trwania. Odwrotne zjawisko obserwowano w grupie 1 zwierząt, wskazujące na odwracalność zmian patologicznych w zapisach czynności bioelektrycznej kory mózgu.



Ryc. 5. Rozległe, świeże wylewy krwawe w mięśniu sercowym, rozsuwające i rozrywające włókna mięśniowe. Czas przeżycia zwierząt po podaniu TET — 24 godz. *Ryc. 5A* — dawka TET 2,5 mg/kg masy ciała, *ryc. 5B* — 9 mg/kg masy ciała. H—E. Pow. 100×

Fig. 5. Extensive recent hemorrhages in the cardiac muscle, separating and damaging muscle fibers. Survival time after TET administration 24 h. *Fig. 5A* — TET dose 2.5 mg/kg b.w. *Fig. 5B* — TET dose 9 mg/kg b.w. H—E. ×100

Zmiany ECoG wykazujące zależność od dawki TET przypominały w swoim ogólnym ilościowym i jakościowym obrazie nieprawidłowości związane z ograniczeniem mózgowego przepływu krwi lub obrzękiem mózgu (Marshall i wsp. 1976; Legrain, MacKenzie 1981; Pluta 1982; Pluta, Ostrowska 1986).

W obu grupach doświadczalnych zaburzenia czynności mięśnia sercowego miały taki sam charakter. W zapisach EKG stwierdzano cechy niedokrwienia mięśnia sercowego oraz zaburzenia okresu repolaryzacji. Stałym elementem towarzyszącym tym zmianom była postępująca bradykardia. Wykładnikiem patomorfologicznym uszkodzenia mięśnia sercowego były rozległe wylewy krwawe. Opisane zaburzenia czynnościowe mogą mieć bezpośredni związek z toksycznym działaniem TET na mięsień sercowy. Nie można również wykluczyć wpływu na czynność i stan mięśnia sercowego, równoległe rozwijających się zmian patologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym (Gerren i wsp. 1976; Marshall i wsp. 1976). Benedek i wsp. (1979) sugerują, że działanie histotoksyczne TET związane jest z pierwotnym pobudzeniem sympatycznego układu nerwowego.

Zmiany zachowania się szczurów w przedstawionej serii doświadczeń są podobne do obserwacji poczynionych przez innych autorów (Suzuki 1971; Benedek i wsp. 1979). Na podstawie powyższych danych doświadczalnych należy stwierdzić, że zwierzęta grupy 1 powracały po zatruciu trójetylkim cyny do stanu prawidłowego. W tej grupie zwierząt zmiany miały charakter całkowicie odwracalny, natomiast w grupie 2 wszystkie zwierzęta ginęły w ciągu trzech dni obserwacji.

Zróznicowany w obu grupach doświadczalnych przebieg kliniczny zatrucia, jak również zmiany ECoG wykazujące zależność od zastosowanej dawki TET, znalazły wyraz w wynikach badań Ostrowskiej (1986) w tym samym modelu doświadczalnym. Stwierdziła ona tylko po zastosowaniu TET w dawce 9 mg/kg cytotoksyczny obrzęk w OUN, powikłany w późniejszym okresie zatrucia zaburzeniami przepuszczalności bariery naczyniowo-mózgowej. Rozwój obrzęku mózgu i jego następstwa w postaci dodatkowego działania czynnika anoksyjno-ischemicznego miały istotny wpływ na obraz kliniczny zatrucia i wykładniki bioelektrycznej czynności mózgu.

ИЗМЕНЕНИЯ ЭКОГ И ЭКГ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ТРИЭТИЛОМ ОЛОВА У КРЫС

Резюме

Исследования были проведены на взрослых крысах линии Вистар в 2 экспериментальных группах. Животные из I группы получили однократно внутривентриально ТЕТ в дозе 2,5 мг/кг веса тела, а крысы из 2 группы — дозу 9 мг/кг веса тела. В обеих группах в 12 и 24 часа после подачи ТЕТ в записях ЭКОГ доминировали медленные волны. В 48 часу наблюдения записи

ЭКоГ в I группе не отличались от контрольных записей, тогда как во второй группе наблюдалось увеличение патологических изменений с увеличением числа волн дельта и пиков а также появлением изоэлектрических участков переменной длительности. Изменения в ЭКоГ, проявляющие зависимость от дозы TET, качественно и количественно напоминали отклонения от нормы, связанные с ограничением мозгового кровообращения или отёком мозга.

Нарастанию изменений в ЭКоГ сопутствовало углубление отклонений от нормы в записе ЭКГ, свидетельствующих о ишемии сердечной мышцы и нарушениях периода реполяризации. Постоянным элементом была брадикардия, усиливающаяся одновременно с увеличением времени наблюдения. Патоморфологическое исследование выявило в сердечной мышце обширные кровоизлияния, повреждающие мышечные волокна, наиболее выраженные у крыс из группы II.

У животных обеих экспериментальных групп наблюдалось охлаждение тела, исчезновение или уменьшение реакции на боль, нарастающее обнижение двигательной активности, и кома. Клиническая картина крыс из I группы нормализовалась, тогда как у крыс из II группы клинические изменения нарастали и привели к гибели всех исследуемых животных.

CHANGES OF ECoG AND ECG FOLLOWING ACUTE TRIETHYL TIN INTOXICATION IN RATS

Summary

Investigations were performed on adult Wistar rats which were given single i.p. injection of TET in a dose of 2.5 mg/kg b.w. (group I) and 9 mg/kg b.w. (group II).

ECoG recordings revealed a predominance of slow waves in animals of both experimental groups 12 and 24 h after TET administration. After 48 h ECoG in group I did not differ from control, whereas in group II intensification of pathological changes was found, with the increase of delta waves and spikes and the appearance of isoelectric areas of varying duration time. The ECoG changes, which were related to the TET dose in general resembled those following restriction of cerebral blood flow or cerebral edema. Intensification of ECoG changes was accompanied by the increase of ECG abnormalities being indicative of cardiac muscle ischemia and disturbances of repolarization period. The steady element was bradycardia, increasing with the survival time after TET administration. Pathomorphological study of the heart revealed extensive hemorrhages in the cardiac muscle, more pronounced in the animals of group II.

Clinically, rats of both experimental groups were characterized by decrease of body temperature, gradually decreased motor function, decrease or loss of reaction to pain stimuli and comatous state. Rats of group I usually recovered, whereas in group II clinical disturbances increased, leading to death of all experimental animals.

PIŚMIENICTWO

1. Benedek G., Szekeres L., Zoltán T. Ö., Obal F.: Elektrozephalographische Untersuchung des experimentellen Gehirnödems. *Arzneim.-Forsch. (Drug Res.)*, 1976, 26, 335—340.
2. Benedek G., Szikszay M., Zoltán T. Ö., Obal F.: Metabolic and EEG alterations during the early phase of triethyltin-sulphate (TET) intoxication. *Acta physiol. Acad. Sci. hung.*, 1979, 54, 381—387.

3. Gerren R. A., Groswald D. E., Luttges M. W.: Triethyltin toxicity as a model for degenerative disorders. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1976, 5, 299—307.
4. Graham D. I., Gonatas N. K.: Triethyltin sulfate-induced splitting of peripheral myelin in rats. *Lab. Invest.*, 1973, 29, 628—632.
5. Hedges T. R., Zaren H. E.: Experimental papilledema: a study of cats and monkeys intoxicated with triethyltin acetate. *Neurology*, 1969, 19, 359—366.
6. Hirano A., Zimmerman H. M., Levine S.: Intramyelinic and extracellular spaces in triethyltin intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 571—580.
7. Lee J. C., Bakay L.: Ultrastructural changes in the edematous central nervous system. *Arch. Neurol.*, 1965, 13, 48—57.
8. Legrain Y., MacKenzie E. T.: Various indices of brain metabolism and activity in a model of chronic neurological dysfunction: triethyltin intoxication in the rat. *Eur. Neurol.*, 1981, 20, 183—187.
9. Magee P. N., Stoner H. B., Barnes J. M.: The experimental production of oedema in the central nervous system of the rat by triethyltin compounds. *J. Path. Bact.*, 1957, 73, 107—124.
10. Marshall L. F., Bruce D. A., Graham D. I., Langfitt T. W.: Triethyltin induced cerebral edema: Implications for determination of cerebral blood flow in edematous tissue. w: *Dynamics of brain Edema*. Red. H. M. Pappius, W. Feindel, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, 83—86.
11. Ostrowska B.: Obraz strukturalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego w ostrym zatruciu trójetylkciem cyny u szczura. Wyniki nieopublikowane (materiał do pracy doktorskiej), 1986.
12. Pluta R.: Badanie możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, 1982, s. 270.
13. Pluta R., Ostrowska B.: Acute poisoning with triethyltin in the rat. Changes in cerebral blood flow, cerebral oxygen consumption, arterial and venous blood gases. *Acta Neurol. Scand.*, 1986, in press.
14. Scheinberg L. C., Taylor J. M., Herzog I., Mandell S.: Optic and peripheral nerve response to triethyltin intoxication in the rabbit: Biochemical and ultrastructural studies. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1961, 25, 202—213.
15. Smith M. E.: Studies on the mechanism of demyelination. Triethyltin-induced demyelination, *J. Neurochem.*, 1973, 21, 357—372.
16. Suzuki K.: Some new observations in triethyltin intoxication of rats. *Exp. Neurol.*, 1971, 31, 207—213.
17. Torack R. M., Gordon J., Prokop J.: Pathobiology of acute triethyltin intoxication. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1970, 12, 45—86.

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

KRYSTYNA RENKAWEK, JOANNA MAJKOWSKA-WIERZBICKA

EFFECT OF HYPERTHERMIA ON THE STRUCTURAL
AND ENZYMATIC PROPERTIES OF RAT CEREBELLUM
CULTURED *IN VITRO*

Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

Hyperthermia is a common clinical complication leading to cerebral dysfunction but its effect on the brain structure or metabolism is not well understood. The results reported in animal experiments demonstrated that the effect of hyperthermia on structural and biochemical parameters of tissue damage is to a large extent secondary to hyperventilation, alkalosis and a fall of blood pressure (Gaudio, Abramson 1968; Nemoto, Frankel 1970), but not due to hyperthermia per se. In the central nervous system, secondary brain hypoxia or ischemia may additionally complicate the picture of tissue damage (Frankel et al. 1963; Hales et al. 1967; Dunn, Liroy 1971).

The present study was undertaken to examine the direct effect of increasing ambient temperature on the morphological structure of neurons and glia cells growing *in vitro*. Our previous work on the effect of hyperthermia on the enzymatic activity in cultured rat cerebellum demonstrated a marked increase of glucose-6-phosphate and succinate dehydrogenase in the glia cells without their significant morphological alterations (Renkawek, Majkowska 1984). The ultrastructural basis for a correlative enzymatic study of the direct effect of temperature on CNS cultures is presented.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures were prepared from newborn rat cerebella (Wistar). Each cerebellum was cut into 8—10 parasagittal 1—2 mm sections, explanted in pairs on collagen-coated coverslips and maintained at 36—36.5°C in Carrel flasks. The nutrient medium consisted of 40% fetal calf serum, 50% Earle's solution pH 7.1—7.2, 10% embryo saline extract, 600 mg% of glucose and penicillin (100 units/ml of medium). Seven and

14 DIV cultures (DIV — days *in vitro*) growing in standard conditions were transferred to an incubator maintained at a temperature of 39°, 40° or 41°C for 3 h. Afterwards, the cultures were either (1) fixed immediately following hyperthermia or (2) they were kept at a standard temperature of 36—36.5°C for 24, 48 and 72 h. Cultures from all experimental groups were stained by routine histological methods including PAS, PAS-dimedon reactions (Bulmer 1959), phosphorylase activity was demonstrated by the method of Takeuchi and Kuriaki (1955); the activity of uridine-diphosphate glucose-glycogen transferase according to Takeuchi and Glenner (1961), and acid phosphatase after Burstone (1962). For electron microscopy, the cultures were fixed in cold 2% glutaraldehyde for 1/2 h. The tissues were then rinsed in cacodylate buffer, pH 7.2, for 1 h, and postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer, pH 7.2. After dehydration, the cultures were embedded in Epon 812, cut on an ultramicrotome, counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEM 100 B electron microscope.

RESULTS

Organotypic cultures taken for the experiments were composed of thick explants with generally a monolayer outgrowth zone. On the following days *in vitro*, the explants became flattened and the outgrowth zone was composed of numerous, densely packed glial cells (Fig. 1).

After incubation at 39°C and 40°C for 3 h the explants and the outgrowth zone exhibited under the light microscope small morphological changes such as vacuolization of the cytoplasm and reduction in the



Fig. 1. Control culture of cerebellum. 7 DIV. Outgrowth zone composed of numerous, densely packed glial cells. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 1. Hodowla kontrolna mózdzku, 7 dni *in vitro*. Strefa wzrostu utworzona przez liczne, gęsto ułożone komórki glejowe. Fiolet krezyłu. Pow. 100 \times



Fig. 2. High activity of acid phosphatase in the astrocytic cell cytoplasm in 14 DIV control culture. $\times 200$

Ryc. 2. Wysoka aktywność fosfatazy kwaśnej w cytoplazmie komórek astrocytarnych. Hodowla kontrolna, 14 dni *in vitro*. Pow. $200\times$

lengths of the cell processes; in some instances also inhibition of the outgrowth. At 41°C , numerous cells became damaged. The explants detached from the glass and the cultures were presumed to undergo necrosis. Further, after exposure for 30 min to temperatures higher than 41°C , degenerative changes were frequent and irreversible.

After a thermic shock for 3 h at $39\text{--}40^{\circ}\text{C}$, the cells, when returned

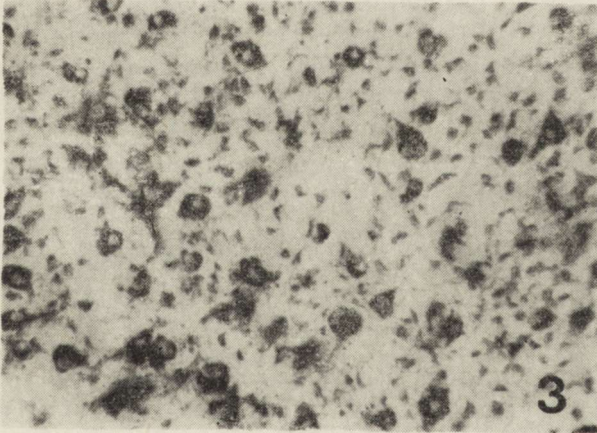


Fig. 3. Enhanced acid phosphatase activity after 40°C and 24 h survival in standard conditions. Reaction product is present in the cytoplasm of all types of the glial cells. Nuclei and cell processes exhibited no activity. Culture of cerebellum, 14 DIV. $\times 200$

Ryc. 3. Hodowla mózdzku, 14 dni *in vitro*. Zwiększona aktywność fosfatazy kwaśnej po przegrzaniu (40°C) i 24 godz. przeżyciu w warunkach standardowych. Produkt reakcji enzymatycznej widoczny w cytoplazmie wszystkich typów komórek glejowych. Jądra i wypustki komórek glejowych nie wykazują aktywności enzymu. Pow. $200\times$

to standard conditions for 24—72 h not only grew normally again, but also began to rebuild their loss of cytoplasmic structures.

The glial cells cultured in standard conditions were characterized by a high activity of acid phosphatase (Fig. 2). In the experiments, enzymatic activity increased immediately after hyperthermia and remained higher as compared with the control values after 24 and 72 h (Fig. 3). PAS-positive reaction granules were present in the cytoplasm of the glia cells, but the PAS-dimedon reaction was not visualized as glycogen granules. The activities of both enzymes connected with glycogen, transferase and phosphorylase, were not observed in the cultured cells.

Ultrastructural observations performed on 7 DIV cultures subjected to 39°C and fixed immediately after hyperthermia showed noticeable lesions in the glial cells. These changes involved some, but not all, the glia cells. One of the first changes seen after 3 h of exposure to hyperthermia was granular degeneration of the mitochondrial matrix and disruption of their cristae. The characteristic picture represented a great variety in the severity of cell damage from slight edematous changes to pronounced degeneration of the cells. A common morphological feature observed in most of the cells was a reduced number of their organelles and the appearance of numerous lysosomes, vesicles or shortened channels of endoplasmic reticulum. In the cytoplasm large, dark and elongated mitochondria often appeared (Fig. 4). In some cells, prominent bundles of gliofibrils were lying between the cell organelles. Numerous fibrillar elements, scattered phagocytic vacuoles, lysosomes and a few ribosomes represented degenerative changes of the glia cells. The nuclei of glial cells were usually large, and chromatin was widely distributed. Several cells possessed prominent nucleoli, but no distinct abnormalities in their structure were visible.

In the same experimental group, slight structural changes as compared to the more affected glial cells, exhibited a granular type of neuron. The increased number of lysosomes was one of the most pronounced alterations (Fig. 5). In different areas of the cytoplasm, there were scattered or accumulated lipid bodies irregular in shape and density. Another feature frequently observed during heat treatment, was a reduced number of polyribosomes. In many granular cells, the normal grouping of ribosomes into polysomes characteristic for untreated cells was no longer noticeable and, only monosomes were seen. The channels of granular endoplasmic reticulum were shortened, few in number and covered with scanty ribosomes.

At 39—40°C or even 41°C, no structural lesion occurred in Purkinje cells. They displayed numerous granular endoplasmic membranes and scattered free ribosomes. Mitochondria had rudimentary cristae and amorphous material. There were no striking nuclear lesions after exposure to hyperthermia. Nucleoli were prominent and some of them exhibited a coarse and densely packed structure (Fig. 6).

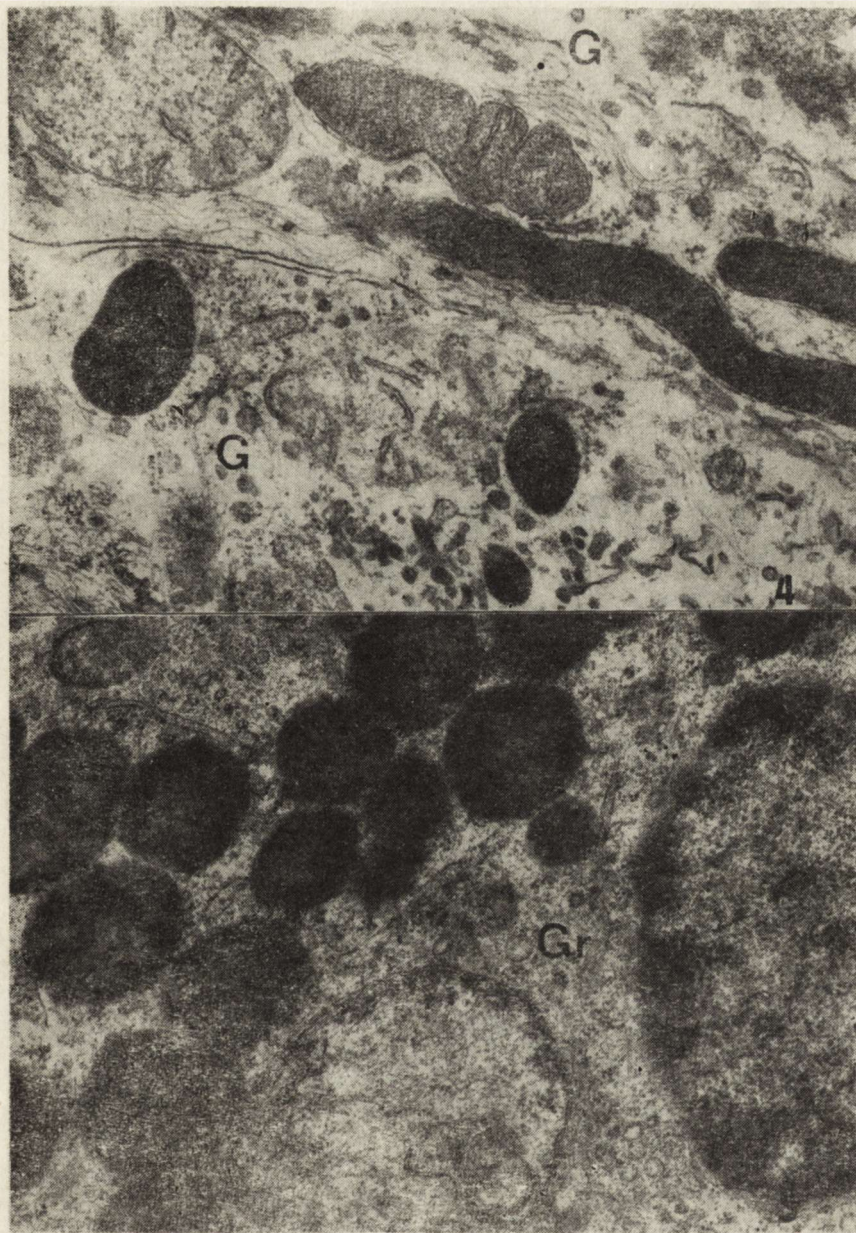


Fig. 4. Culture of cerebellum, 7 DIV, 3 h after 39°C. Lysosomes and mitochondria with electron-lucent or condensed mitochondrial matrix in the cytoplasm of glia cells (G). $\times 12\,000$

Ryc. 4. Hodowla mózdzku, 7 dni *in vitro*, 3 godz. przeżycia po 39°C hipertermii. W cytoplazmie komórek glejowych (G) widoczne lizosomy oraz mitochondria o przejaśnionej i zagęszczonej macierzy. Pow. 12 000 \times

Fig. 5. Culture of cerebellum, 7 DIV, 3 h after 39°C. Numerous lipid droplets and damaged mitochondria in the granular neuron (Gr). $\times 9\,000$

Ryc. 5. Hodowla mózdzku, 7 dni *in vitro*, 3 godz. przeżycia po przegrzaniu w 39°C. W komórce ziarnistej (Gr) widoczne liczne krople lipidowe i uszkodzone mitochondria. Pow. 9000 \times

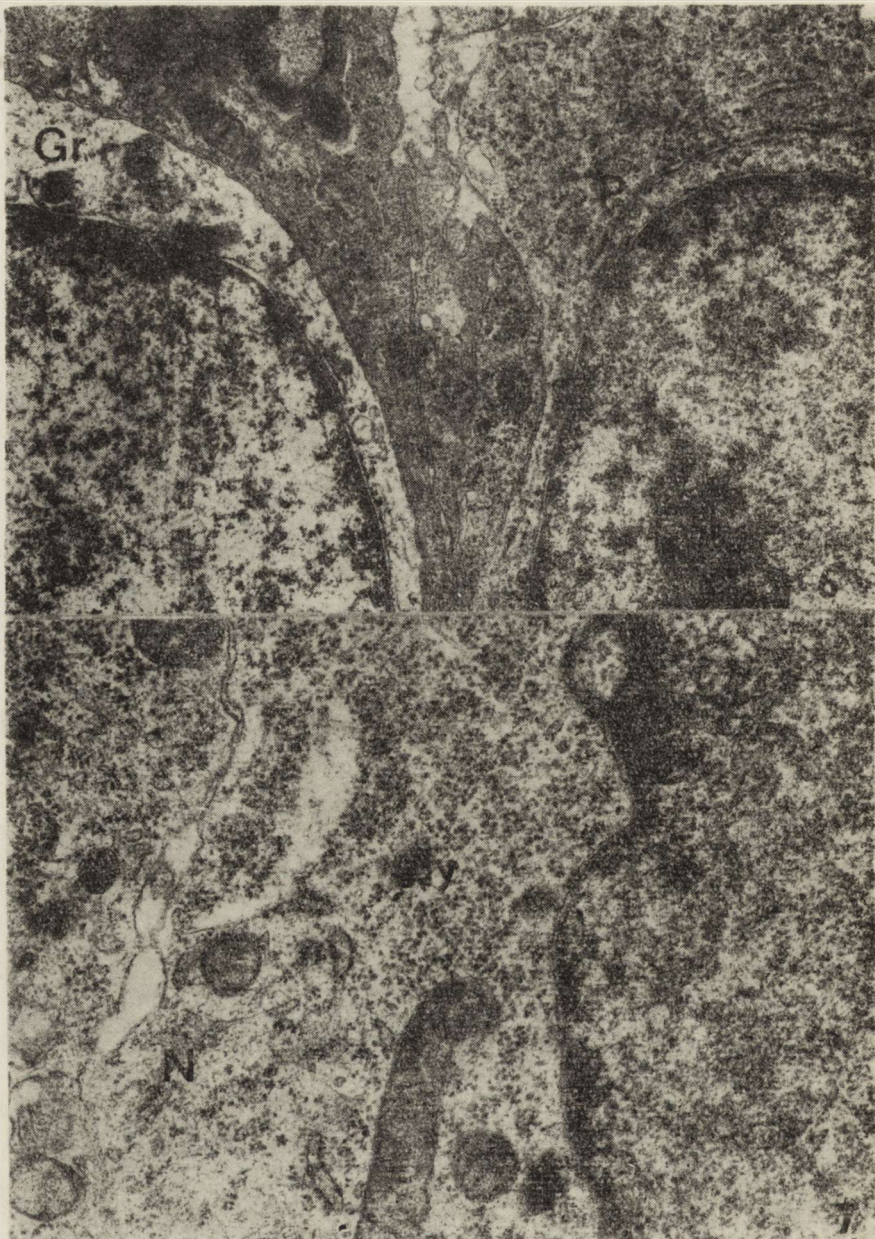


Fig. 6. Culture of cerebellum, 7 DIV, 24 h after 40°C. Intact structure of Purkinje cell (P) and slight ultrastructural abnormalities in the granular cells (Gr).
×6000

Ryc. 6. Hodowla mózdzku, 7 dni *in vitro*, 24 godz. po przegrzaniu w 40°C. Prawidłowa struktura komórki Purkiniego (P), nieznaczne zmiany w organellach komórek ziarnistych (Gr). Pow. 6000×

Fig. 7. Culture of cerebellum, 7 DIV, 3 h after 39°C. Two neurons with intensive accumulation of glycogen particles (gly). ×9000

Ryc. 7. Hodowla mózdzku, 7 dni *in vitro*, 3 godz. po przegrzaniu w 39°C. Widoczne dwa neurony z obficie nagromadzonymi ziarnistościami glikogenu (gly) w cytoplazmie. Pow. 9000×

Immediately after 3 h of hyperthermia in astrocytes and granular neurons, glycogen was present (Fig. 7). Glycogen accumulation was observed within astrocytic processes and neuronal and glial perikarya. It was characteristic that few other abnormalities accompanied this accumulation. These were some swelling of mitochondria with loss of internal cristae. Moreover, one could observe that morphologically similar cells showed a lack of glycogen, whereas others were filled with granules. After 24 h or a longer time after hyperthermia, glycogen was not detected.

Similar structural changes to those described above were observed 24 h after hyperthermia but, they were much less pronounced. Mitochondrial swelling, vacuolization of the cytoplasm and lipid degeneration could be noted in some cells, but the number of cells involved in the degenerative process was reduced. Most of the neurons were not affected. In the granular cells, only lysosomes were seen more frequently than in control cells. Free ribosomes were fairly abundant and they reassembled into polysomes. In Purkinje cells, condensation of chromatin on the nuclear membrane and prominent nucleoli, not uniform in structure were sporadically seen. When the cultures were returned to 36–36.5°C for 48 and 72 h, lesions of astrocytes and neurons were not observed.

The 14-day-old cultures exposed to 3 h hyperthermia and examined both immediately or after 24–72 h of survival under standard conditions exhibited less pronounced ultrastructural changes. There were several severely affected astrocytes, but most of them were not changed. In granular neurons, the increase in cytoplasmic free ribosomes and polysomes that can be interpreted as evidence of active protein synthesis, occurred in the recovery period from thermic shock.

DISCUSSION

Our data brought some new information concerning the influence of direct hyperthermia on the CNS cells including glia and neurons, which was difficult to observe in the animal model. Cultured cells of rat cerebellum appeared to be very sensitive to elevation of temperature which resulted in ultrastructurally detected alterations both of the glia cells and granular neurons. The temperature at which cell damage occurred *in vitro* was much lower, than that used in the animal model. It ranged between 39°C to 40°C, whereas the upper body temperature limit in animals and man is 43–45°C (Burger, Fuhrman 1969). In tissue culture, we observed a correlation between the temperature and the extent of cell damage. Higher temperature than 40°C induced profound morphological alterations of cell organelles and inhibition of cell outgrowth. Results of the present experiments, probably reflect, therefore, the influence of increased temperature per se, in contrast to animal experiments

where tissue damage depends upon many other factors, not only hyperthermia.

Not all the cells of the cerebellum showed the same degree of morphological destruction. In tissue cultures, a different response to hyperthermia was observed depending upon the cell type. Between glial cells, a distinct reaction to high temperature was present mainly in astrocytes. Among the types of cerebellar neurons, hyperthermia had no significant effect on either Purkinje cells or axons, but induced morphological changes in granular cells. The differences in reactions between astrocytes and neurons are connected with the cell function. Astrocytes reacted mainly as edematous changes of the cell cytoplasm and organelles expressing their well known function in the CNS in water and electrolyte metabolism. In the granular cells, ribosomal destruction was more pronounced than that observed in animals, showing that an implication of hyperthermia is brain-specific disaggregation of polysomes (Heikilla, Brown 1979) and inhibition of protein synthesis (Murdock et al. 1978). A common feature observed in glial and granular cell cytoplasm was the presence of a great number of lysosomes together with a high activity of acid phosphatase. Also, a transient accumulation of glycogen particles was visible both in granular cells and glial cells.

In tissue culture, cell damage was dependent upon cell maturation. This supposition is confirmed by our results obtained with cultures of different ages studied under hyperthermia conditions. More severe cell damage observed was in 7-day-old cultures than in the 14-day-old ones. It suggests that immature cells are more sensitive to hyperthermia under *in vitro* conditions as compared with the *in vivo* situation (Holzman et al. 1982). In our studies, the effect of hyperthermia on the growing cells derived from the explanted cerebellum appears to differ in some respects from that observed previously in other cells cultured *in vitro*. The common feature was an increased number of lysosomes both in our CNS cultured cells and in HeLa cells (Heine et al. 1971), but we did not observe specific morphological alterations in the nucleus or nucleolus. These changes are probably connected with an intensive denaturation of protein and blocked RNA synthesis during higher temperatures than that used in our experiments. But, it is still surprising that structural lesions in the nucleus or nucleolus were observed in the absence of any other cytological alterations (Simard, Bernhard 1967). In our experiments, nucleolar changes corresponded to the critical temperature above which morphological changes appeared drastically and were irreversible.

Although several studies are confined to hyperthermia, there are conflicting results as concerns the metabolic rate in the brain. Carlsson et al. (1976) concluded that the only clear effect of hyperthermia on the metabolic pattern was an increase in condensation of glucose and glucose-6-phosphatase. *In vitro* studies on brain slices have shown that oxy-

gen consumption and glucose use increase at temperatures above 37°C; however, when the temperature was increased above 40°C, oxygen consumption decreased progressively with time (Field et al. 1944; Goldberg et al. 1966). In the brain, high temperature affected mainly oxidative enzymes and oxidative phosphorylation (Gwozdz et al. 1970). Moreover, the cells which contribute significantly to the respiratory function in the mature cerebral cortex are astrocytes (Hertz, Schousboe 1975).

Our previous results showing differences in oxidoreductive enzymes activity after hyperthermia and the present observations of the morphological structure suggest that the first discernable cell response to high temperature was an increase of enzyme activity with corresponding ultrastructural alterations. Morphological characteristics of glial and neuronal changes differed markedly from the cell damage *in vitro* after experimentally induced anoxia (Renkawek et al. 1984). Therefore, the foregoing results seem to indicate that hyperthermia *in vitro* (39–40°C) does not induce cerebral hypoxia, and cell changes can be attributed to some other factors i.e., possibly temperature per se, or stimulating enzyme activity. This agrees with the results of Nemoto and Frankel (1970) who excluded hypoxia as an additional factor evoking cell damage in the brain. After hyperthermia *in vitro* we found cell "activation" expressed by the accumulation of large mitochondria or vesicles, but typical for anoxia glia cell destruction was not often seen. Carlsson et al. (1976) observed that at constant pCO₂ the only consistent change in the amino acid pattern was increased glutamate content, but its cause remains unexplained. In some instances, such glial changes, as edema of the cytoplasm or glial fibrils accumulation are similar to those described in tissue culture after kainic acid (analogue of glutamate) treatment (Renkawek et al. 1982). The character and intensity of the described abnormalities depend on the age of the culture but also on the period of survival after hyperthermia. The greatest intensity of pathological changes was observed in cultures examined immediately after hyperthermia. These abnormalities corresponded well with the enzymatic alterations observed in the light microscope, i.e. a marked increase of glucose-6-phosphate, succinate dehydrogenases and acid phosphatase activity. It seems that structural changes in mitochondria and the accumulation of lysosomes are the basis of those enzymatic disturbances in hyperthermia (Raison et al. 1971; Gwozdz et al. 1978).

The only change induced by hyperthermia, but rarely seen in tissue culture of cerebellum in normal and pathological conditions was the accumulation of glycogen in glial cells and neurons. This phenomenon indicating disturbances in intracellular glucose metabolism was similar to that observed in various types of oxygen insufficiency in the brain in experimental animals (see References Long et al. 1972). In hyperthermia experiments, glycogen is accumulated only in a few cells and this

can be treated as a transient metabolic disorder. It appears that early accumulation of glycogen in the cells without any distinct morphological abnormalities due to increased temperature is the most sensitive indicator of neuronal and glial damage.

Summarizing our results in tissue culture, we reported that glial cells and neurons react rapidly to hyperthermia per se by structural and metabolic disorders. The majority of cells recovered almost completely within 24 h after return to normal temperature at 36—36.5°C. The fact that enzymatic activity decreased to essentially the same level as in the control can be considered evidence of recovery of the metabolic function.

WPLYW HIPERTERMII NA WLAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE I ENZYMATYCZNE ORGANOTYPOWEJ HODOWLI MÓZDŻKU SZCZURA

Streszczenie

Oceniono w mikroskopie elektronowym wpływ podwyższonej temperatury na organotypowe hodowle mózdzku szczura. Badania przeprowadzono na hodowlach 7- i 14-dniowych, przetrzymywanych przez okres 3 godzin w temperaturze 39, 40 i 41°C. Hodowle badano bezpośrednio po hipertermii oraz po 24, 48 i 72 godz. przeżyciu w warunkach standardowych.

Największą wrażliwość na działanie podwyższonej temperatury wykazały astrocyty i komórki ziarniste. Na obraz zmian ultrastrukturalnych składały się obrzmienie i zmiany zwyrodnieniowe niektórych organelli cytoplazmatycznych w astrocytach oraz zmniejszenie ilości polirybosomów i nagromadzenie lipidów w komórkach ziarnistych. Ponadto w komórkach glejowych i w neuronach stwierdzono gromadzenie się glikogenu. Zmianom ultrastrukturalnym towarzyszył wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej. Nieprawidłowości zarówno strukturalne, jak i enzymatyczne miały charakter odwracalny.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА СТРУКТУРНЫЕ И ЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫСЫ

Резюме

С помощью электронного микроскопа оценено влияние повышенной температуры на органотипические культуры мозжечка крысы. Исследования провели на 7- и 14-дневных культурах, подвергаемых в течение 3 часов действию температуры 39°, 40° и 41°C. Культуры обследовано непосредственно после гипертермии а также после прожития 24, 48 и 72 часов в стандартных условиях.

Наибольшую чувствительность к действию повышенной температуры проявили астроциты и зернистые клетки. Картина ультраструктурных изменений состояла из набухания и дегенерационных изменений некоторых цитоплазматических органелл в астроцитах а также уменьшения числа полирибосом и накопления липидов в зернистых клетках. Кроме того, в клетках глии и нейронах обнаружено накопление гликогена. Ультраструктурным изменениям сопутствовало нарастание активности кислой фосфатазы. Отклонения от нормы, как структурные так и enzymатические, имели обратимый характер.

REFERENCES

1. Bulmer D.: Dimedone as an aldehyde blocking reagent to facilitate to histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
2. Burger F. J., Fuhrman F. A.: Evidence of injury by heat in mammalian tissues. *Am. J. Physiol.*, 1969, 106, 1057—1061.
3. Burnstone M. S.: *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasm.* Academic Press, New York 1962.
4. Carlsson C., Hägerdal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and under organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001—1006.
5. Dunn R. B., Lioy F.: Lactate and pyruvate levels in brain and skeletal muscle during hyperthermia in dogs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1970, 49, 520—524.
6. Field J. F., Fuhrman F. A., Martin A. W.: Effect of temperature on the oxygen consumption of brain tissue. *J. Neurophysiol.*, 1944, 7, 117.
7. Frankel H. M., Ellis J. P., Cain S. M.: Development of tissue hypoxia during progressive hyperthermia. *Am. J. Physiol.*, 1963, 205, 733—737.
8. Gaudio R., Abramson N.: Heat-induced hyperventilation. *J. Appl. Physiol.*, 1968, 25, 742—746.
9. Goldberg N. D., Passonneau J. V., Lowry O. H.: Effects of changes in brain metabolism on the levels of citric acid cycle intermediates. *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 3997—4003.
10. Gwozdz B., Krause M., Dyduch A.: Investigations on oxidative phosphorylation in the brain tissue on animals subjected to high temperature. *Acta Physiol. Pol.*, 1970, 21, 293—300.
11. Gwozdz B., Dyduch A., Grzybek H., Panz B.: Structural changes in brain mitochondria of mice subjected to hyperthermia. *Exp. Pathol.*, 1978, 15, 124—126.
12. Hales J. R. S., Findlay J. D., Mabon R. M.: Tissue hypoxia in oxen exposed to severe heat. *Resp. Physiol.*, 1967, 3, 43—46.
13. Heikkila J. J., Brown I. R.: Hyperthermia and disaggregation of brain polysomes induced by bacterial pyrogen. *Life Sci.*, 1979, 25, 347—352.
14. Heine U., Sverak L., Kondratyck J., Bonar R. A.: The behaviour of HeLa-S₃ cells under the influence of supranormal temperatures. *Ultr. Res.*, 1971, 34, 375—396.
15. Hertz L., Schousboe A.: Ion and energy metabolism of the brain at the cellular level. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1975, 18, 141—211.
16. Holtzman D., Nguyen H., Zemvil S., Olson J.: *In vitro* cellular respiration at elevated temperatures in developing rat cerebral cortex. *Develop. Brain Res.*, 1982, 4, 401—405.
17. Long M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal cord motor neurons due to partial ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1972, 20, 335—347.
18. Murdock L. L., Berlow S., Colwell R. E., Siegel F. L.: The effects of hyperthermia on polyribosomes and amino acid levels in infant rat brain. *Neuroscience*, 1978, 3, 349—367.
19. Nemoto E. M., Frankel H. M.: Cerebral oxygenation and metabolism during progressive hyperthermia. *Am. J. Physiol.*, 1970, 219, 1784—1788.
20. Raison J. K., Lyons J. M., Mehlhorn R. J., Keith A. D.: Temperature-induced phase changes in mitochondrial membranes detected by spin labeling. *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 4036—4040.

21. Renkawek K., Matyja E., Mossakowski M. J.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of rat cerebellum. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 53, 321—330.
22. Renkawek K., Majkowska J.: Enzymatic changes in the glia cells of rat cerebellar cultures induced by hyperthermia. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1984 (in press).
23. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: Ultrastructural properties of rat cerebellum *in vitro* after anoxia and PGI₂-pretreated anoxia. 1984 (in press).
24. Simard R., Bernhard W.: A heat-sensitive cellular function located in the nucleolus. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 61—76.
25. Takeuchi T., Kuriaki H.: Histochemical detection of phosphorylase in animals tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1955, 3, 153.
26. Takeuchi T., Glenner G. G.: Histochemical demonstration of uridine diphosphate glucose-glycogen transferase in animal tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 11, 304—316.

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

PRZEMYSŁAW NOWACKI, KRYSZYNA HONCZARENKO,
GRAŻYNA SZECHEREW

PRZYPADEK PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WIELOKORZENIOWO- NERWOWEGO O SZCZEGÓLNIE CIĘŻKIM PRZEBIEGU KLINICZNYM I ROZLEGŁYCH ZMIANACH NEUROPATOLOGICZNYCH

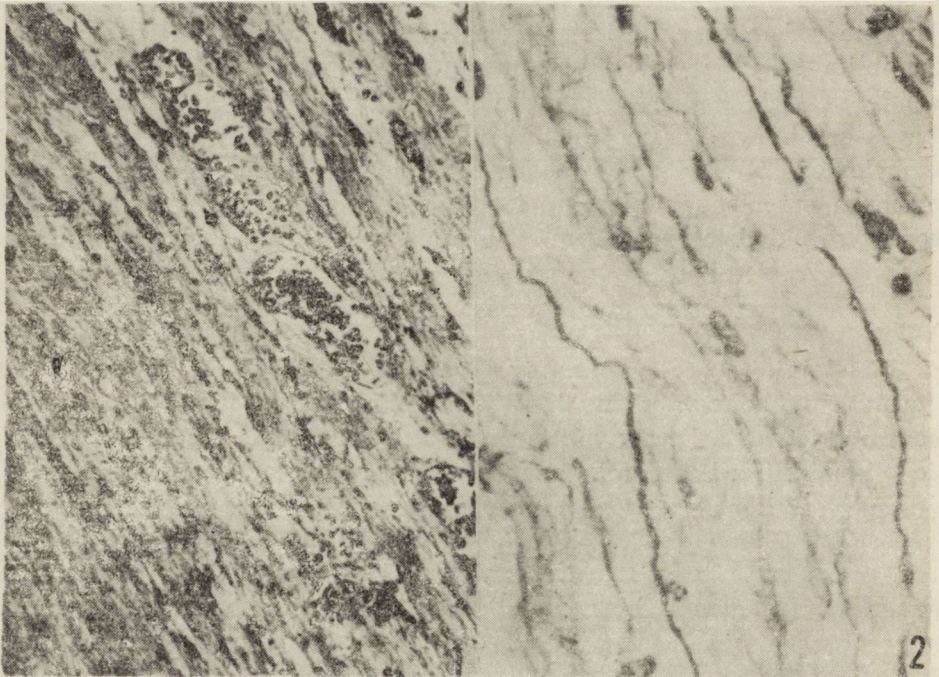
Klinika Neurologii Instytutu Chorób Układu Nerwowego i Narządów
Zmysłów Pomorskiej Akademii Medycznej, Szczecin

Istotę zapalenia wielokorzeniowo-nerwowego (ZWKN) stanowi demielinizacja w obwodowym układzie nerwowym. Posiada ona zwykle charakter odcinkowy, nasilając się zwłaszcza w korzeniach rdzeniowych (Dąbska 1964; Haymaker, Kernohan 1966; Jędrzejowska 1981). Przewlekłe postaci ZWKN o ciężkim przebiegu klinicznym mają na ogół charakter objawowy (Leneman 1966). Poniżej przedstawiamy przypadek przewlekłego ZWKN o nie ustalonej etiologii, o bardzo ciężkim, niepomysłnym przebiegu klinicznym i wyraźnym uszkodzeniu mieliny w obwodowym układzie nerwowym.

OPIS PRZYPADKU

U 31-letniej chorej w czerwcu 1982 r. wystąpiło stopniowe osłabienie i drętwienie kończyn dolnych. W tym okresie zajmowała się naklejaniami etykietek na hermetycznie zamknięte puszki nie mając bezpośredniego kontaktu z lakierami. Przez następny rok dolegliwości nasilały się, wystąpiły w kończynach górnych, pojawiły się uporczywe bóle wzdłuż kręgosłupa. Chora schudła około 30 kg. Do Kliniki Neurologii PAM została przyjęta we wrześniu 1983 r. (Nr hist. chor. 626/83). Chora była wyniszczona, powłoki skórne miały ziemisto-szare zabarwienie. Stwierdzono obrzęk tarcz nerwów wzrokowych, uogólniony zanik mięśni i osłabienie siły mięśniowej, głównie w dosiebnych częściach kończyn, osłabienie napięcia mięśniowego, brak odruchów głębokich, osłabienie czucia powierzchniowego typu rękawiczek i skarpetek oraz czucia głębokiego z niezbornością. Chora skarżyła się na stałe drętwienia i bóle stóp i rąk. Poziom białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (pmr) wynosił 900 mg^{0/0}, cytoza była prawidłowa. Ze względów technicznych nie wykonano elektroforyzy pmr. Badanie emg wykazało wyraźne zwolnienie szybkości

przewodzenia we włóknach ruchowych nerwu łokciowego i strzałkowego prawego (28/s) ze znacznym wydłużeniem latencji końcowej. Wsunięto podejrzenie ZWKN o charakterze objawowym. Krzywa cukrowa, żelazowa, proteinogram surowicy krwi, próba lateksowa, poziom kwasu wanilino-migdałowego o porfiryn w moczu, próby wątrobowe, wchłanianie witaminy B₁₂, badania kału na jaja pasożytów i krew utajoną, testy pozaustrojowe, scyntygram tarczycy i narządów jamy brzusznej, badania radiologiczne i endoskopowe oraz wycinek błony śluzowej żołądka były prawidłowe. W leczeniu zastosowano: Encorton (łączna dawka od 80 mg na dobę — 2180 mg), strychninę, witaminy, środki przeciwbólowe, rehabilitację ruchową. Stan chorej ulegał stopniowemu pogorszeniu. W lutym 1984 r. dołączyły się ostre objawy psychiatryczne oraz cechy obwodowej niewydolności krążenia, wśród których chora zmarła w około 20 miesięcy od wystąpienia pierwszych objawów schorzenia. Rozpoznano: *Polyradiculoneuritis probabiliter symptomatice ignotae causae*. Ogólna sekcja zwłok, (prot. sek. K-53/84) poza odoskrzelowym zapaleniem płuc i zastojem żylnym w różnych narządach, nie wykazała zmian.



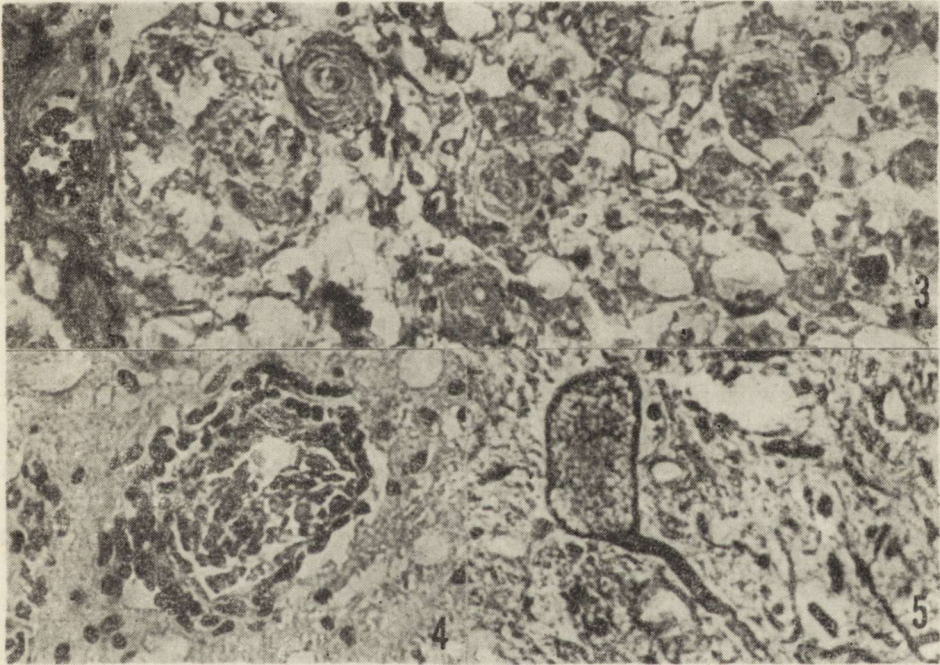
Ryc. 1. Całkowita demielinizacja fragmentu nerwu obwodowego z resztkami obrzmiałych osłonek mielinowych. Heidenhain. Pow. 100×

Fig. 1. Total demyelination of the peripheral nerve fragment's with remnants of swollen myelin sheaths. Heidenhain. ×100

Ryc. 2. Fragmenty pojedynczych, wyrodniających włókien osiowych w nerwie obwodowym. Impregnacja met. Bielschowskiego. Pow. 100×

Fig. 2. Fragments of single degenerating axonal fibers in peripheral nerve. Bielschowsky impregnation. ×100

Największe zmiany neuropatologiczne obserwowano w nerwie pachowym i korzeniach rdzeniowych. Fragment badanego nerwu był całkowicie zdemielinizowany, a resztki osłonek obrzęknięte i rozwarstwione (ryc. 1). Włókna osiowe w wielu miejscach poprzerywane, posiadały nierówną grubość, niekiedy były kolbowato rozdęte. Często obserwowano jedynie fragmenty pojedynczych włókien (ryc. 2). Całkowicie zdemielinizowane były korzenie tworzące ogon koński. Obserwowano w nich wyraźny rozplem komórek Schwanna. Miejscami występowały tu rozległe skupiska struktur o charakterze „onion bulb”. Składały się one z różnej liczby nieregularnych pierścieni włóknistych układających się koncentrycznie wokół jądra, które utworzone było zwykle z wypustki osiowej, niekiedy otoczonej cienką osłonką mielinową (ryc. 3). Niektóre „onion bulb” zawierały w utkaniu pierścieni kilka komórek o układzie okrężnym. W rdzeniu kręgowym uszkodzenie mieliny polegało na umiarkowa-



Ryc. 3. Struktury typu „onion bulb” w utkaniu zdemielinizowanych włókien korzeni ogona końskiego. Heidenhain. Pow. 240 ×

Fig. 3. Onion bulbs in area of demyelinated roots in the cauda equina. Heidenhain. ×240

Ryc. 4. Limfocytarny naciek okołozylny w istocie białej rdzenia kręgowego. Fiolet krezylu. Pow. 100 ×

Fig. 4. Perivenous lymphocytic infiltration in the spinal cord white matter. Cresyl violet. ×100

Ryc. 5. Obwodowy układ pogrubiałych neurofibryli w komórce ruchowej rogu przedniego rdzenia kręgowego. Impregnacja met. Bielschowskiego. Pow. 400 ×

Fig. 5. Peripheral arrangement of thickened neurofibrils in the motor neuron of the anterior horn of spinal cord. Bielschowsky impregnation. ×400

nym obrzęku osłonek dróg długich, zwłaszcza sznurów tylnych w miejscach wnikania do rdzenia korzeni grzbietowych. Przekroje poprzeczne przez osłonki były niejednakowej grubości i średnicy. W stopie mostu występowało drobne ognisko spłowienia mielinowego. W sznurach bocznych i tylnych piersiowego odcinka rdzenia kręgowego, w sąsiedztwie jądra oliwy dolnej, w stopie mostu oraz istocie białej półkuli mózdku występowały niewielkie pojedyncze nacieki okołozylne. Składały się z jednego lub kilku rzędów limfocytów lub komórek limfocytopodobnych (ryc. 4). Większość neuronów odcinka piersiowego i szyjnego rdzenia kręgowego, a także pojedyncze komórki nerwowe w rdzeniu przedłużonym, wykazywały wyraźnie obwodowy, regularny układ nieco pogrubiałych neurofibrilli, co mogłoby odpowiadać początkowej fazie zwyrodnienia włóknienkowego Alzheimera (ryc. 5). W pozostałych okolicach mózgowia i w oponach miękkich istotnych zmian nie stwierdzono.

OMÓWIENIE

W przewlekłym ZWKN uszkodzenie mieliny, głównie o charakterze odcinkowej demielinizacji, dotyczy zwykle korzeni rdzeniowych. W bardziej zaawansowanych przypadkach demielinizacja wykazuje tendencję do szerzenia się do nerwów obwodowych, jednak jest ona w nich zjawiskiem nieczęstym (Dąbska 1964). W naszym przypadku demielinizacja była szczególnie rozległa i prawie całkowita, występowała ona zarówno w nerwie obwodowym, jak i korzeniach grzbietowych i brzusznych. Towarzyszył jej wyraźny rozplem komórek Schwanna. Zjawiska te wskazują na dużą i długotrwałą aktywność czynnika uszkodzającego. Za przewlekłym, naprzemiennym procesem demielinizacji i remielinizacji przemawiają struktury o typie „onion bulb” (Jędrzejowska 1981) obserwowane w dużej ilości także w naszym przypadku. Biorąc pod uwagę fakt, że występowały one wyłącznie w korzeniach rdzeniowych, należy sądzić, że demielinizacja i remielinizacja zachodziły głównie w tej części układu nerwowego.

W ostatnich latach coraz częściej ZWKN przypisuje się podłoże autoimmunologiczne (Appenzeller, Marshall 1963; Ala, Shearman 1965; Bammer, Schenk 1965; Sigwald, Nouailhat 1970; Prusiński i wsp. 1979; Maciejek i wsp. 1983). Antygenowo zmieniona mielina wywołuje odpowiedź typu nadwrażliwości późnej (Jędrzejowska 1981). Jednym z objawów przemawiających za autoimmunologicznym pochodzeniem choroby w naszym przypadku był wysoki poziom białka w pmr. Objaw taki za wynik immunologicznej natury schorzenia uważają także Barraine (1965) oraz Maciejek i wsp. (1983). Można się zastanawiać, czy taki wysoki poziom białka nie stanowił dodatkowo czynnika toksycznego, uszkodzającego mielinę korzeni wewnątrz worka oponowego. Zjawisko to wydaje się prawdopodobne, zważywszy fakt, że wysoki poziom białka wpływa tok-

sycznie na nerwy wzrokowe, prowadząc do ich obrzęku, co miało miejsce także u naszej chorej. Uszkodzenie wypustek osiowych było prawdopodobnie zjawiskiem wtórnym do demielinizacji. O takim charakterze zmian aksonalnych świadczy fakt niewielkiego zwyrodnienia wstępującego Wallera neuronów rdzenia kręgowego i przedłużonego. Na pierwotny charakter demielinizacji w ZWKN zwrócił uwagę Wiśniewski (1969, 1970). Sądząc po stopniu demielinizacji mało prawdopodobny wydaje się wpływ na to zjawisko nie ustalonych czynników toksycznych (może poza wysokim poziomem białka w pmr) i metabolicznych. Do końca nie zostało wyjaśnione pochodzenie nacieków zapalnych w układzie nerwowym w ZWKN (Bogaert 1958; Martin 1960). Z jednej strony przemawiają one za czynnym charakterem procesu chorobowego (Jędrzejowska 1981), z drugiej zaś, ze względu na swą strukturę i okołozynną lokalizację, mogą potwierdzać autoimmunologiczne tło schorzenia.

W całości przypadek nasz odpowiada przewlekłej postaci zespołu Guillain-Barré (GB). Do niedawna przewlekłe postaci tego zespołu uznawane były za rzadkość (Collin-Jones 1965; Kotwica 1967; Prusiński i wsp. 1979). Za rozpoznaniem przewlekłego zespołu GB w naszym przypadku przemawia rozszczenie białkowo-komórkowe w pmr, prawdopodobnie pierwotna demielinizacja, brak objawowego tła choroby, a także, podkreślany przez Dycka i wsp. (1975), ciężki, niepomysłny przebieg tego typu schorzenia.

СЛУЧАЙ ХРОНИЧЕСКОГО ПОЛИРАДИКУЛОНЕВРИТА
С ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ТЯЖЕЛЫМ КЛИНИЧЕСКИМ ТЕЧЕНИЕМ
И ОБШИРНЫМИ НЕВРОПАТОЛОГИЧЕСКИМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ

Резюме

Авторы представляют случай хронической формы полирадикулоневрита у 31 летней больной, который в течение 15 месяцев привёл к летальному исходу. В невропатологической картине преобладала обширная, почти полная демиелинизация спинномозговых корешков и исследованного периферического нерва. Многочисленные очаги со структурами „onion bulbs” указывали на хроническую де- и ремиелинизацию. На основе высокого уровня белка в спинномозговой жидкости (900 мг%) и невропатологических изменений выдвинуто подозрение хронической формы синдрома Гийена-Барре. Обширную демиелинизацию принято за результат аутоиммунологической реакции между миелином периферической нервной системы и неустановленным болезнетворным агентом.

A CASE OF CHRONIC POLYRADICULONEURITIS WITH SEVERE CLINICAL
COURSE AND EXTENSIVE NEUROPATHOLOGICAL CHANGES

Summary

The authors presents a case of 31-year-old woman with chronic polyradiculoneuritis which in the course of 15 months led to the patient's death.

In the neuropathological picture prevailed extensive, almost total demyelination of spinal roots and the examined peripheral nerve. Numerous agglomerations

of structures of onion bulb type indicated chronic de- and remyelination. On the ground of high protein level in the cerebrospinal fluid (900 mg^{0/0}) as well as neuropathological changes, Guillain-Barré syndrome of chronic type was suggested. It is supposed that extensive demyelination is the result of autoimmunologic reaction of peripheral myelin to an unknown pathological factor.

PIŚMIENNICTWO

1. Ala F. A., Sherman D. J.: A case of autoimmune haemolytic anaemia, thrombocytopenia and Landry-Guillain-Barré syndrome, *Acta Haemat. (Basel)*, 1965, 34, 361—369.
2. Appenzeller O., Marshall J.: Vasomotor disturbances in Landry-Guillain-Barré syndrome. *Arch. Neurol., (Chic.)*, 1963, 9, 368—372.
3. Bammer H., Schenk K.: Meningo-myelo-radiculitis nach Zeckenbis mit Erythem. *Dtsch. Z. Nervenheilk.*, 1965, 187, 25—34.
4. Barraine P.: Les polyradiculonervites avec dissociation albuminocytologique autres que le syndrome de Guillain-Barré. A propos de 38 observations, Thesis, Paris, 1965.
5. Bogaert L. V.: La poly-ganglio-radiculo-neurite, *Handbuch Spez. Pathol. Anat. u. Histol.* Springer-Verlag, Berlin, 1958.
6. Collin-Jones D. G.: 6 Mercaptopurine in polyradiculoneuropathy. *Lancet*, 1965, 2, 739.
7. Dyck P. J., Thomas P. K., Lambert E. H.: Chronic inflammatory polyradiculoneuropathy. *Mayo Clin. Proc.*, 1975, 50, 621—637.
8. Dąmbska M.: Polyganglioradiculoneuritis jako jednostka anatomo-kliniczna. *Neuropat. Pol.*, 1964, 2, 219—229.
9. Haymaker W., Kernohan J. W.: The Landry Guillain-Barré syndrome. The need for exact diagnostic criteria and analysis of 100 cases. *Arch. Neurol.*, 1966, 14, 196—204.
10. Jędrzejowska H.: Choroby obwodowego układu nerwowego. W: *Podstawy neuropatologii*. Red. M. Mossakowski. J. Dymecki, M. Wender, PZWL, Warszawa, 1981.
11. Kotwica S.: Spostrzeżenia własne nad postaciami klinicznymi zespołu Guillain-Barrégo. *Folia Med. Lodzencia*, 1967, 3, 5—28.
12. Leneman F.: The Guillain-Barré syndrome. *Arch. Intern. Med.* 1966, 118 (Aug.), 139—144.
13. Maciejek Z., Wrocławski R., Rebeś Z., Czernicki J.: Z kazuistyki zespołu Guillain-Barré. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1983, 17, 1, 145—148.
14. Martin J. J.: Polyradiculoneurites aigues et subaigues. *Acta Neur. Psych. Belg.*, 1960, 60, 1087—1139.
15. Prusiński A., Szulc-Kuberska J., Erendt A., Pniewski S., Zawadzki Z.: Zastosowanie azatiopryny w leczeniu przewlekłej postaci zespołu Guillaina i Barrégo. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1972, 3, 5, 487—489.
16. Sigwald J., Nouailhat F.: The Guillain-Barré syndrome. W: *Handbook of Clinical Neurology*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, Am. Elsevier Comp. Inc., New York, 1970, 495—509.
17. Wiśniewski H., Terry P. D., Weitaker J. N., Cook S. D., Dowling P. C.: Landry-Guillain-Barré syndrome. A primary demyelinating disease. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1969, 21, 269—276.
18. Wiśniewski H.: Materiały VI Międzynarodowego Kongresu Neuropatologicznego, Masson-Cie, Paryż, 1970, 37—38.

Adres autorów: Klinika Neurologii PAM, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

ANDRZEJ LOESCH

ZMIANY ULTRASTRUKTURALNE I IMMUNOCYTOCHEMICZNE
NEUROSEKRECYJNEGO UKŁADU PODWZGÓRZOWO-
-PRZYSADKOWEGO ORAZ SPLOTU AUERBACHA JELITA KRĘTEGO
SZCZURA W DOŚWIADCZALNEJ CUKRZYCY INSULINOZALEŻNEJ

STRESZCZENIE ROZPRAWY HABILITACYJNEJ

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

Klasyfikacja cukrzycy zaproponowana w 1979 r. przez Komitet Ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) do Spraw Cukrzycy opiera się głównie na kryteriach etiopatogenetycznych. Rozróżniono dwie postaci tej choroby: cukrzycę insulinozależną — zwaną inaczej typem I lub cukrzycę młodzieńczą (insulin-dependent diabetes mellitus, juvenile-onset diabetes mellitus) oraz cukrzycę insulinoniezależną — zwaną inaczej typem II lub cukrzycą typu dorosłych (insulin-independent diabetes mellitus, maturity-onset diabetes mellitus). Chociaż etiologia cukrzycy nie jest w pełni poznana, jest ona zaliczana do chorób spowodowanych zaburzeniem przemiany węglowodanów (Czyżyk 1984). Cukrzyca jest obecnie uznana za chorobę społeczną o długotrwałym przebiegu, w której zaburzeniom metabolicznym towarzyszą zmiany morfologiczne, m. in. w obrębie układu nerwowego (neuropathia diabetica) i układu naczyniowego (angiopathia diabetica); zakres obu rodzajów zmian decyduje o rokowaniu w cukrzycy.

Przedmiotem niniejszej rozprawy jest analiza ultrastrukturalnej i immunocytochemicznej organizacji elementów neuronalnych neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego oraz splotu Auerbacha w doświadczalnej cukrzycy insulinozależnej u szczura. Wiadomo, że w cukrzycy insulinozależnej występuje od jej początku uszkodzenie i zniszczenie komórek-B wysepek Langerhansa w trzustce z następowym bezwzględny niedoborem insuliny. Jako przyczynę tych zmian wymienia się predyspozycję genetyczną (nieswoistą), zakażenie wirusowe i autoimmunizację (Czyżyk 1984). W obecnej pracy do wywołania cukrzycy insulinozależnej zastosowano wysoce swoisty diabetogen — streptozotocynę (STZ), który wybiórczo uszkadza, a nawet niszczy wytwarzające insulinę komórki-B trzustki wysepkowej.

Neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy ssaków, który jest integralną częścią ośrodkowego układu nerwowego (Scharer, Schar-

rer 1940), prócz wielu biologicznie czynnych substancji syntetyzuje i wydziela do krwi wazopresynę (VP) i oksytocynę (OT) — dwa główne hormony peptydowe przysadki nerwowej (NHP). Zarówno VP, jak i OT są syntetyzowane w odrębnych neurocytach jądra nadwzrokowego (SON) i jądra przykomorowego (PVN) podwzgórza, skąd oba te neurohormony są transportowane do NHP odrębnymi aksonami sekrecyjnymi (Swaab i wsp. 1975; Vandesande, Dierickx 1975, 1976). Zatem w zjawisku syntezy, transportu i wydzielania do krwi VP i OT uczestniczą dwie populacje wyżej wymienionych neuronów wydzielniczych podwzgórza.

Splot Auerbacha natomiast jest integralną częścią śródściennego unerwienia przewodu pokarmowego (Bayliss, Starling 1899) należącego do obwodowego autonomicznego układu nerwowego. Splot Auerbacha, z którego czynnością jest związana samoistna motoryka przewodu pokarmowego, jest umiejscowiony pomiędzy zewnętrzną warstwą podłużną i wewnętrzną warstwą okrężną mięśni gładkich ściany przewodu pokarmowego. Splot ten składa się ze zwojów i międzyzwojowych włókien nerwowych. Podobnie jak neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy, splot Auerbacha jest złożonym układem wielu rodzajów komórek nerwowych wytwarzających wiele biologicznie czynnych substancji. Do tych ostatnich należy m. in. wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), który po raz pierwszy został wyizolowany przez Saida i Mutta (1970) z jelita świni. Neurosekrecyjny układ podwzgórzowo-przysadkowy jest odpowiedzialny m. in. za utrzymywanie homeostazy wodnej i elektrolitowej organizmu, w czym dominującą rolę odgrywa VP. (VP działa antydiuretycznie poprzez pobudzenie absorpcji zwrotnej wody w cewce dystalnej nefronu). Natomiast splot Auerbacha bierze udział w kontroli motoryki (perystaltyki) przewodu pokarmowego. W tym względzie szczególną rolę przypisuje się VIP, który m. in. pobudza powolną relaksację mięśni gładkich ściany przewodu pokarmowego (Furness i wsp. 1980; Polak, Bloom 1980; Schultzberg i wsp. 1980). Jakikolwiek odbiegające od normy zmiany czynnościowe tak układu podwzgórzowo-przysadkowego, jak i splotu Auerbacha mogą prowadzić do poważnych zaburzeń fizjologicznych o zasięgu ogólnoustrojowym.

CEL PRACY

Wiadomo, że cukrzyca insulinozależnej towarzyszą odwodnienie organizmu i zaburzenia czynności motorycznej przewodu pokarmowego; jednak mechanizmy prowadzące do rozwoju tych zjawisk nie są dotychczas w pełni wyjaśnione. W związku z tym wydawało się celowe zbadanie w doświadczalnym modelu cukrzyca insulinozależnej ultrastrukturalnej organizacji neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego, ze szczególnym uwzględnieniem jego neuronów syntetyzujących VP i OT, oraz zbadanie splotu Auerbacha, a szczególnie jego włókien nerwowych zawierających VIP.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na szczurach szczepu Wistar, dorosłych samcach o masie ciała 400—450 g, którym jednorazowo podano dootrzewnowo STZ (65 mg/kg masy ciała). Po 8 tygodniach niektóre szczury wykazywały objawy kliniczne charakterystyczne dla cukrzycy insulinozależnej (Lincoln i wsp. 1984), a mianowicie około 37% spadek masy ciała, wielomocz, cukromocz i hiperglikemię. Szczury z powyższymi objawami cukrzycy (STZ-diabetyczne szczury) oraz szczury u których po podaniu STZ nie zaobserwowano żadnych objawów cukrzycy (STZ-niediabetyczne szczury) objęto badaniami porównawczymi.

Konwencjonalne badania ultrastrukturalne. Szczury perfundowano mieszaniną glutaraldehydu i paraformaldehydu, a następnie wyjmowano podwzgórze i przysadkę nerwową oraz jelito kręte i dotrwalano je czterotlenkiem osmu, barwiono en bloc wodnym roztworem octanu uranylu, odwadniano w etanolu i zatapiano w Araldicie. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie badano je i fotografowano w mikroskopie elektronowym Philips-300 i JEM-7A.

Immunocytochemiczne badania ultrastrukturalne. Zastosowano tę samą technikę utrwalania (perfuzja) i procedurę immunocytochemiczną jak opisano w uprzednich publikacjach (Loesch 1985; Loesch, Burnstock 1985). Do wyznakowania neuronów zawierających VP i OT użyto poliklonalne przeciwciała w rozcieńczeniu 1:1500 dla VP oraz 1:1000 dla OT. Do wyznakowania włókien nerwowych zawierających VIP zastosowano poliklonalne przeciwciała na VIP w rozcieńczeniu 1:1000. Ultracienkie skrawki aralditowe kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i następnie badano je i fotografowano w mikroskopie elektronowym Philips-300 i JEM-7A.

Kontrola do immunocytochemii. Swoistość reakcji immunocytochemicznej na VP, OT i VIP przedstawiono we wcześniejszych publikacjach (Loesch 1985; Loesch, Burnstock 1985).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Badania, które przeprowadzono na dwóch grupach doświadczalnych szczurów, tzn. STZ-niediabetycznych szczurach i STZ-diabetycznych szczurach, wykazały u zwierząt drugiej grupy istotne zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne w obrębie a) elementów neuronalnych neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego i b) włókien nerwowych (aksonów) splotu Auerbacha.

Układ podwzgórzowo-przysadkowy. Perykariony SON i PVN diabetycznych szczurów były hipertroficzne. Towarzyszył temu zjawisku ubytek ziarnistości neurosekrecyjnych w NHP. Cechy te odpowiadały zatem ogólnie przyjętej charakterystyce przypisywanej neurosekrecyjnemu układowi podwzgórzowo-przysadkowemu ssaków podczas wzmożonych pro-

cesów sekrecyjnych (Zambrano, De Robertis 1966; Kalimo, Rinne 1972; Tasso, Rua 1978). Obok wyżej wymienionych cech stwierdzono także zmiany o charakterze zwyrodnieniowym, jak np. wakuolizacja aksonów i niektórych perykarionów, pojawianie się wokółaksonalnych lub wewnątrzaksonalnych blaszkowatych pierścieni oraz złogów bezpostaciowego materiału. Zmiany te można przypisać wzmożonej czynności sekrecyjnej układu podwzgórzowo-przysadkowego (Dellmann 1973). Jednakże, są one również podobne do tych zmian patologicznych, jakie stwierdzono m. in. w układzie podwzgórze-przysadka nerwowa szczurów pozbawionych wody do picia (Loesch 1979) lub też w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków — w tym i w układzie podwzgórzowo-przysadkowym chomika mongolskiego — poddanych niedokrwieniu czy niedotlenieniu tkanki nerwowej (Yu i wsp. 1972; Loesch 1983a, b). Zmiany tego rodzaju obserwowano również w ośrodkowym układzie nerwowym ssaków poddanych rozmaitym warunkom doświadczalnym (Lampert i wsp. 1964; Hirano i wsp. 1968; Loesch 1986).

Badania immunocytochemiczne umożliwiły identyfikację neuronów zawierających VP lub OT. Wykazały one zmiany w obu typach neuronów u diabetycznych szczurów, przy czym zmiany te są bardziej wyraźne w neuronach zawierających VP. Stwierdzono zatem niezwykle rozproszenie organelli cytoplazmatycznych w perykarionach SON i PVN, czemu towarzyszyło również anormalne w porównaniu z niediabetycznymi szczurami rozproszenie immunoprecypitatu. W NHP stwierdzono natomiast ubytek VP- i OT-immunododatnich aksonów. Obserwacje te wskazują na czynny udział VP- i OT-ergicznych neuronów w ogólnoustrojowych zmianach fizjologicznych towarzyszących cukrzycy, z jednej strony, z drugiej natomiast sugerują wzmożoną syntezę w SON i PVN podwzgórza obu rodzajów neurohormonów z jednoczesnym wzmożonym ich wydzielaniem w NHP do krwi.

Niektóre zmiany o charakterze zwyrodnieniowym, które obserwowano w badaniach konwencjonalnych diabetycznych szczurów, można przypisać neuronom OT-, a przede wszystkim VP-ergicznym. Dla przykładu, w aksonach obserwowano immunoprecypitat występujący pozapęcherzykowo, tzn. bezpośrednio w aksoplazmie lub w postaci związanej z wakuolami autofagowymi. Niektóre VP-ergiczne aksony posiadały dodatkowo struktury wieloblaszkowate. Należy tutaj jednak podkreślić, że zakończenia synaptyczne utworzone na powierzchni OT- bądź VP-dodatnich elementów neuronalnych wykazywały prawidłową organizację ultrastrukturalną. Powyższe spostrzeżenia wskazują na normalną kontrolę synaptyczną neuronów VP- i OT-ergicznych w badanym modelu doświadczalnej cukrzycy insulinozależnej.

Na podstawie przedstawionych wyników badań mikroskopowo-elektronowych konwencjonalnych i immunocytochemicznych można wnio-

kować, że w cukrzycy insulinozależnej czynność neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura ulega modyfikacji polegającej m. in. na zwiększonym wydzielaniu do krwi VP i OT, czemu towarzyszy cykliczne lub trwałe zwyrodnienie niektórych elementów neuronalnych. Nieprawidłowości ultrastrukturalne i immuno-ultrastrukturalne, opisane w niniejszej pracy, wydają się być skutkiem tak niedoboru insuliny, jak i przewlekłego odwodnienia organizmu oraz niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego.

Splot Auerbacha. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na wyraźne zmiany ultrastrukturalne i immuno-ultrastrukturalne również włókien nerwowych (aksonów) splotu Auerbacha diabetycznego szczura. Stwierdzono mianowicie takie zjawiska, jak np. agregacja nieziarnistych pęcherzyków synaptycznych oraz pojawianie się pęcherzyków pleomorficznych, wakuol autofagowych i figur mielinowych. Obserwowano również profile aksonów pozbawione pęcherzyków synaptycznych — niektóre profile obfitowały natomiast w duże pęcherzyki ziarniste.

Wiele spośród zaobserwowanych zmian można przypisać procesom zwyrodnieniowym włókien nerwowych splotu Auerbacha. Należy tutaj podkreślić, że podobne zmiany stwierdzono w obwodowym układzie nerwowym w przebiegu ostrego zwyrodnienia włókien nerwowych wywołanego doświadczalnie (Hámori i wsp. 1968), a także u pacjentów z cukrzycą insulinozależną (Babel i wsp. 1970).

Badania immuno-ultrastrukturalne wskazują natomiast, że wiele spośród obserwowanych zmian można przypisać aksonom zawierającym VIP. Podczas gdy profile VIP-ergicznych aksonów niediabetycznych szczurów charakteryzowały się istotną przewagą małych pęcherzyków nieziarnistych, to w przypadku szczurów diabetycznych obserwowane profile zawierały dodatkowo: a) wakuole autofagowe, b) liczne duże pęcherzyki ziarniste, c) złogi immunoprecypitatu w nieobecności komponentu pęcherzykowego lub d) immunoprecypitat pozostający w łączności ze strukturami trudnymi do zidentyfikowania. W nawiązaniu do tych spostrzeżeń istotny jest fakt, że VIP-ergiczne aksony splotu Auerbacha jelita krętego zdrowego szczura zawierają około 93% małych nieziarnistych pęcherzyków synaptycznych i około 7% dużych pęcherzyków ziarnistych (Loesch, Burnstock 1985).

Niedawne badania biochemiczne i immunofluorescencyjne VIP-ergicznego komponentu splotu Auerbacha wykazały istotny wzrost poziomu VIP w jelicie krętym i okrężnicy wstępującej diabetycznego szczura (Belai i wsp. 1985). Zjawisko to przypisano neuropatii VIP-ergicznych włókien nerwowych w kontekście możliwego uczestnictwa tych włókien w rozwoju zaburzeń czynnościowych przewodzenia pokarmowego w cukrzycy. Badania przedstawione w obecnej rozprawie w pełni potwierdzają tę opinię. Opis i ilustracja badań nad immuno-ultrastrukturalną organi-

zaczają aksonów splotu Auerbacha jelita krętego diabetycznego szczura, które uwzględniono w niniejszej rozprawie zostały wcześniej opublikowane (Loesch i wsp. 1986).

Jaki wpływ na czynność przewodu pokarmowego mają zmiany w organizacji aksonów splotu Auerbacha, w tym i aksonów zawierających VIP, na tym etapie badań trudno jest sprecyzować. Zmiany o charakterze zwyrodnieniowym, jakie wykazują niektóre VIP-ergiczne aksony, mogą przyczyniać się do rozwoju towarzyszących cukrzycy zaburzeń czynności motorycznej przewodu pokarmowego. Wiadomo, że zaburzenia czynności układu pokarmowego w cukrzycy dotyczą m. in. zaburzenia motoryki jelita cienkiego i grubego, tłumienia odruchu opróżniania oraz wystąpienia biegunki lub obstrukcji (Hosking i wsp. 1978; Clarke i wsp. 1979).

WNIOSKI

Jak wynika z przedstawionych powyżej badań, zmiany ultrastrukturalne i immuno-ultrastrukturalne, które odzwierciedlają zmiany czynności tak splotu Auerbacha, jak i neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego, mogą rzutować na przebieg cukrzycy insulinozależnej i jej objawy.

Zmiany immuno-reaktywności profili neuronalnych podwzgórza, jak i ubytek wazopresyno- i oksytocyno-dodatnich aksonów w przysadce nerwowej świadczą o modyfikacji procesów syntezy oraz transportu wazopresyny oraz oksytocyny, a także o zwiększonym wydzielaniu tych neurohormonów do krwi w cukrzycy. Niektóre zmiany mogą odzwierciedlać pozorne zwyrodnienie elementów neuronalnych wynikające ze wzmożonej czynności sekrecyjnej układu podwzgórzowo-przysadkowego, bądź też powikłania fizjologiczne prowadzące do nieodwracalnych zmian zwyrodnieniowych.

Zmiany zaobserwowane w splocie Auerbacha wskazują, że w cukrzycy następuje zwyrodnienie niektórych aksonów w tym i aksonów zawierających wazoaktywny polipeptyd jelitowy. Zmiany te świadczą o możliwości uczestnictwa włókien zawierających wazoaktywny polipeptyd jelitowy w rozwoju zaburzeń czynności motorycznej przewodu pokarmowego w cukrzycy.

PIŚMIENNICTWO

1. Babel J., Bischoff A., Spöndlin H.: Ultrastructure of the peripheral nervous system and sensory organs. Atlas of normal and pathological anatomy. Red. A. Bischoff, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1970.
2. Bayliss W. M., Starling E. H.: The movements and innervation of the small intestine. *J. Physiol. (Lond.)*, 1899, 24, 99—143.
3. Belai A., Lincoln J., Milner P., Crove R., Loesch A., Burnstock G.: Enteric nerves in diabetic rats. Increase in vasoactive intestinal polypeptide but not substance P. *Gastroenterology*, 1985, 89, 967—976.

4. Clarke B. F., Ewing D. J., Campbell I. W.: Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetologia*, 1979, 17, 195—212.
5. Czyżyk A.: Cukrzyca. W: *Endokrynologia kliniczna*, tom 2, Red. W. Hartwig, PZWL, Warszawa, 1984, 661—794.
6. Dellmann H.-D.: Degeneration and regeneration of neurosecretory system. *Int. Rev. Cytol.*, 1973, 36, 215—315.
7. Furness J. B., Costa M., Franco R., Llewellyn S. J.: Neuronal peptides in the intestine: distribution and possible functions. W: *Neuronal peptides and neuronal communications*. Red. E. Costa, M. Traburchi, Raven Press, New York, 1980, 607—617.
8. Hámori J., Láng E., Simon L.: Experimental degeneration of preganglionic fibres in the superior cervical ganglion of the cat. An electron microscopic study. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 1968, 90, 37—52.
9. Hirano A., Rubin R., Sutton C. H., Zimmerman H. M.: Honeycomb-like tabular structure in axoplasm. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1968, 10, 17—25.
10. Hosking D. J., Bennett T., Hampton J. R.: Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes*, 1978, 27, 1043—1055.
11. Kalimo H., Rinne U. K.: Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurons of the rat. II. The hypothalamo-neurohypophysial system in rats with hereditary hypothalamic diabetes insipidus. *Z. Zellforsch.*, 1972, 134, 205—225.
12. Lampeert P., Blumberg J. M., Pentschew A.: An electron microscopic study of dystrophic axons in the gracile and cuneate nuclei of vitamin E-deficient rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1964, 23, 60—76.
13. Lincoln J., Bokor J., Crowe R., Griffith S. G., Haven A. J., Burnstock G.: Myenteric plexus in streptozotocin-treated rats. Neurochemical and histochemical evidence for diabetic neuropathy in the gut. *Gastroenterology*, 1984, 86, 654—661.
14. Loesch A.: Badania mikroskopowo-elektronowe neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura w stanie odwodnienia. Rozprawa doktorska, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa 1979.
15. Loesch A.: The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983a, 61, 545—556.
16. Loesch A.: The effect of cerebral ischemia on the ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophysial system of the mongolian gerbil. The neurohypophysial axons and pituicytes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1983b, 61, 557—568.
17. Loesch A.: A light and electron microscopic study of oxytocin-containing neurons in the paraventricular nucleus of the rat. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1985, 63, 691—702.
18. Loesch A.: Effect of high ambient temperature on the neurohypophysis of the rabbit. A further evidence for ultrastructural alterations in neurohypophysial axons and pituicytes. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 273—283.
19. Loesch A., Burnstock G.: Ultrastructural identification of VIP-containing nerve fibres in the myenteric plexus of the rat ileum. *J. Neurocytol.*, 1985, 14, 327—335.
20. Loesch A., Belai A., Lincoln J., Burnstock G.: Enteric nerves in diabetic rats: electron microscopic evidence for neuropathy of vasoactive intestinal polypeptide-containing fibres. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1986, 70, 161—168.
21. Polak J. M., Bloom S. R.: The distribution and significance of the VIP-ergic system in man and other mammals. *Endocrinol. Japan*, 1980, 1, 11—21.

22. Said S. I., Mutt V.: Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 1970, 169, 1217—1218.
23. Scharrer E., Scharrer B.: Secretory cells within the hypothalamus. *Res. Publ. Accoc. Nerv. Ment. Dis.*, 1940, 20, 170—194.
24. Schultzberg M., Hökfelt T., Nilsson G., Terenius L., Rehfeld J. F., Brown M., Elde R. P., Goldstein M., Said S.: Distribution of peptide- and catecholamine-containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig: immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin, and dopamine-beta-hydroxylase. *Neuroscience*, 1980, 5, 689—744.
25. Swaab D. F., Nijveldt F., Pool C. W.: Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *J. Endocrinol.*, 1975, 67, 461—462.
26. Tasso F., Rua S.: Ultrastructural observations of the hypothalamo-posthypophysial complex of the Brattleboro rat. *Cell Tissue Res.*, 1978, 191, 267—289.
27. Vandesande F., Dierickx K.: Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res.*, 1975, 164, 153—162.
28. Vandesande F., Dierickx K.: Immuno-cytochemical demonstration of the inability of the homozygous Brattleboro rat to synthesize vasopressin and vasopressin-associated neurophysin. *Cell Tissue Res.*, 1976, 165, 307—316.
29. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1972, 22, 222—234.
30. Zambrano D., De Roberts E.: The secretory cycle of supraoptic neurons in the rat. A structural and functional correlation. *Z. Zellforsch.*, 1966, 73, 414—431.

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

Krystyna Renkawek, Joanna Majkowska: Effect of hyperthermia on the structural and enzymatic properties of rat cerebellum cultured <i>in vitro</i>	81
Przemysław Nowacki, Krystyna Honczarenko, Grażyna Szecherew: A case of chronic polyradiculoneuritis with severe clinical course and extensive neuropathological changes	93
Andrzej Loesch: Ultrastructural and immunocytochemical changes of the hypothalamo-neurohypophysial system and myenteric plexus of the ileum of rat in experimental insulin-dependent diabetes	99

СОДЕРЖАНИЕ

Адам Куницы: Явление регрессии опухолей центральной нервной системы	1
Пшемислав Новацки: Происхождение и локализация лейкоэмических клеток в центральной системе в нелимфобластических лейкомиях у взрослых	7
Мирослав Я. Моссаковский, Роман Гадамски: Влияние простаглицлина и индометацина на ишемическое повреждение сектора СА ₁ рога Амона у монгольских хомяков	21
Павел П. Либерски: Ультраструктура мозга в экспериментальной scrapie-штамм 263 К пассажированной золотыми сирийскими хомяками	35
Павел П. Либерски: Характер спирооплазмоподобных включений в экспериментальной scrapie	53
Тереса Бугера-Печух, Барбара Косицка, Марек Киттел, Мечислав Смялек: Синтез GABA в мозге крысы с экстрапирамидным синдромом после острого отравления ацетатом кобальта, связанным с ишемией мозга	59
Рышард Плюта, Барбара Островска: Изменения ЭКоГ и ЭКГ при остром отравлении триэтилом олова у крыс	71
Крыстына Ренкавек, Йоанна Майковска: Влияние гипертермии на структурные и ферментатические свойства органотипической культуры мозжечка крысы	81
Пшемислав Новацки, Крыстына Хончаренко, Гражина Шехерев: Случай хронического полирадикулоневрита с исключительно тяжелым клиническим течением и обширными невропатологическими изменениями	93
Анджей Лоеш: Ультраструктурные и иммунохимические изменения нейросекреторной гипоталамо-гипофизарной системы, а также сплетения Ауэрбаха подвздошной кишки крысы в экспериментальном инсулинозависимом сахарном диабете	99

SPIS TREŚCI

Adam Kunicki: Zjawisko regresji guzów ośrodkowego układu nerwowego	1
Przemysław Nowacki: Pochodzenie i lokalizacja komórek białaczkowych w ośrodkowym układzie nerwowym w białaczkach nielinfoblastycznych u dorosłych	7
Mirosław J. Mossakowski, Roman Gadamski: Wpływ prostacykliny PGI ₂ i indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie sektora CA ₁ rogu Amona u chomików mongolskich	21
Paweł P. Liberski: Ultrastruktura mózgu w doświadczalnej scrapie. Szczep 263K pasażowany przez złote chomiki syryjskie	35
Paweł P. Liberski: Charakter wtrętów spiroplazma-podobnych w doświadczalnej scrapie	53
Teresa E. Bugera-Piecuch, Barbara Kosicka, Marek Kittel, Mieczysław Śmiłek: Synteza GABA w ośrodkowym układzie nerwowym szczura z zespołem pozapiramidowym po ostrym zatruciu octanem kobaltowym skojarzonym z niedokrwieniem mózgu	59
Ryszard Pluta, Barbara Ostrowska: Zmiany ECoG i EKG w ostrym zatruciu trójetylkciem cyny u szczurów	71
Krystyna Renkawek, Joanna Majkowska: Wpływ hipertermii ma właściwości strukturalne i enzymatyczne organotypowej hodowli mózdzku szczura	81
Przemysław Nowacki, Krystyna Hoczarenko, Grażyna Szecherew: Przypadek przewlekłego zapalenia wielokorzeniowo-nerwowego o szczególnie ciężkim przebiegu klinicznym i rozległych zmianach neuropatologicznych	93
Andrzej Loesch: Zmiany ultrastrukturalne i immunocytochemiczne neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego oraz splotu Auerbacha jelita krętego szczura w doświadczalnej cukrzycy insulinozależnej	99

CONTENTS

Adam Kunicki: Phenomenon of tumor regression in the central nervous system	1
Przemysław Nowacki: Origin and localization of leukemic cells in the central nervous system of adult patients with non-lymphoblastic leukemia	7
Mirosław J. Mossakowski, Roman Gadamski: Influence of prostacyclin PGI ₂ and indomethacin on ischemic damage of CA ₁ sector of Ammon's horn in Mongolian gerbils	21
Paweł P. Liberski: The brain fine structure in experimental scrapie. The 263K strain in golden syrian hamsters	35
Paweł P. Liberski: The nature of spiroplasma-like inclusions in experimental scrapie	53
Teresa E. Bugera-Piecuch, Barbara Kosicka, Marek Kittel, Mieczysław Śmiłek: GABA synthesis in the brain of rat with extrapyramidal syndrome following acute cobaltous acetate intoxication associated with cerebral ischemia	59
Ryszard Pluta, Barbara Ostrowska: Changes of ECoG and ECG following acute triethyltin intoxication in rats	71