

CMD: k PAN

Zgierz

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 25

1987

ZESZYT 2

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

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 25

1987

ZESZYT 2

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

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

ADRES REDAKCJI

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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1987.
Nakład: 600 egz. Objętość: ark. wyd. 9,60, ark. druk. 8, ark. A₁-10.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g, B-1. Oddano do drukarni 1987.03.27.
Podpisano do druku 1987.10.15. Druk ukończono w październiku 1987.
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 169/87. C-14. Cena zł 180,—

MIECZYSLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,
JANINA STANISLAWSKA, JADWIGA PANKRAC, DANUTA TALKOWSKA,
ALINA GROCHOWALSKA

EFFECT OF ACUTE HYPOXIA ON MYELIN LIPIDS *

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Disturbances in the metabolism of cerebral lipids have been experimentally studied in various types of hypoxia (Kosow et al. 1966; Porcellati et al. 1978; Strosznajder, Domańska-Janik 1980; De Medio et al. 1980; Domańska-Janik 1982 and others). Most of the studies concerned the brain as a whole and the observed alterations were related to metabolic changes in the membranes without further structural differentiation. For this reason, little information is available on the effect of hypoxia on the cerebral white matter and on the lipid-rich myelin sheath. The latter issue seems particularly important since in numerous morbid processes in humans hypoxia leads to a variable degree of myelin lesions and, in rare cases, even to diffuse demyelination (Raine 1984; Traugott, Raine 1984). This induced us to perform studies on the effects of acute hypoxia on cerebral myelin lipids.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were performed on male rats of Wistar strain, weighing each 200 do 250 g. Acute hypoxia was induced by placing the animals for 3 min in an air-tight glass chamber of 79.2 l (0.0792 m³) capacity with a gas mixture, containing 2% O₂ in 97.9% N₂ and 0.1% CO₂, passed through the chamber at a 2.8 l per min flow rate. The control level of body temperature was maintained by heating the experimental rats with a lamp. Under such conditions the experimental rats were greatly agitated, but later lost their motoric activity. Concomitantly, they developed tachypnoe, and later often showed an irregular respiratory function leading to complete apnoe. Immediately after hypoxia, mixed arterio-

* The studies were supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (Research Programme No. 06-02.II.1.3).

-venous blood was taken from the tail for gasometric estimations (pH, pO₂, pCO₂) in a BMS-2 apparatus (Radiometer, Copenhagen). The animals were sacrificed after 4 h, 24 h, 14 days or 2 months after hypoxia.

Chemical myelin studies. The myelin fraction was isolated according to the method of Norton and Poduslo (1973). The brain homogenates were layered on top of the discontinuous sucrose gradient (0.32 M and 0.85 M, pH 7.0) and centrifuged using a swing-out rotor. The isolated myelin fraction was washed three times with distilled water, each washing procedure being followed by centrifugation at 75 000 g (23 000 t/min) for 20 minutes. The final sediment was then lyophilized.

Total lipids of the myelin fraction were extracted by the procedure described by Folch-Pi et al. (1957) and, then, further separated by means of a combined column and thin-layer chromatography (TLC). Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated according to Svennerholm (1964), and phospholipids by means of bidimensional TLC according to Singh et al. (1971). Thereafter, cholesterol was quantitated according to the method of Sperry and Webb (1950), cerebrosides and sulfatides were estimated employing the techniques of Radin et al. (1965). Phosphorus content was determined by the method of Bartlett (1959). The results were subjected to statistical analysis by Student's *t* test.

Histological studies. Cerebral sections were embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin, Nissl or Weil methods.

RESULTS

Histological studies. The sections stained by the method of Weil failed to demonstrate any changes of myelin stainability. Neither were changes found in the white matter sections stained by the method of Nissl or

Table 1. Results of gasometric estimations in mixed blood immediately after experimental hypoxia
Tabela 1. Wyniki badań gazometrycznych krwi mieszanej natychmiast po zakończeniu niedotlenienia

	pH	pO ₂ (in mmHg) (w mmHg)	pCO ₂ (in mmHg) (w mmHg)
Control group Grupa kontrolna	7.33±0.04	75.8±4.3	41.8±3.5
Acute hypoxia (2% oxygen in respiratory mixture for 3 min) Ostre niedotlenienie (2% tlenu w mieszaninie oddechowej przez 3 minuty)	7.14±0.05**	40.6±3.4**	62.9±4.0**

Means from 10 estimations ±SE (standard error)

Średnie z 10 badań ±SE (błąd standardowy)

** Differences significant at $p < 0.01$

** Różnice istotne na poziomie $p < 0,01$

with hematoxylin-eosin. In contrast, in the cerebral cortex of the pallium, of the Ammon's horn and of the cerebellum many degenerative changes in neurocytes, mainly of chronic or ischemic type were found.

Chemical studies. Results of gasometric studies used as criterion to evaluate the applied method of hypoxia are presented in Table 1.

Table 2. Effect of acute hypoxia (2% O₂) on lipid pattern in rat brain myelin (mmole per 100 g dry myelin)

Tabela 2. Wpływ ostrego niedotlenienia (2% tlenu) na obraz lipidów mielinę mózgu szczura (w mmol/100 g mielinę suchej)

	Control Norma	4 hours after hypoxia 4 godz. po niedo- tlenieniu	24 hours after hypoxia 24 godz. po niedo- tlenieniu	14 days after hypoxia 14 dni po niedo- tlenieniu	2 months after hypoxia 2 miesiące po niedo- tlenieniu
Cholesterol	38.9±1.68	33.1±2.12	33.2±1.35*	24.3±2.01*	29.5±1.99*
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.02±0.01	0.1±0.02*	0.2±0.06*	0.6±0.07*	0.1±0.03*
Sulfatides Sulfatydy	3.8±0.27	3.7±0.23	3.7±0.31	3.6±0.28	3.7±0.14
Cerebrosides Cerebrozydy	14.7±0.73	14.6±0.27	14.5±0.40	7.6±0.63*	14.7±0.18
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	18.4±0.94	18.3±0.48	18.1±0.64	11.2±0.64	18.4±0.25
Sphingomyelins Sfingomieliny	1.3±0.17	2.4±0.12*	1.8±0.12*	1.6±0.14	1.1±0.12
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	7.7±0.68	7.8±0.38	8.5±0.45	9.2±0.55	9.9±0.34*
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	0.5±0.07	0.5±0.12	0.8±0.07*	0.7±0.11	1.0±0.09*
Phosphatidylserine + phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	2.5±0.21	2.9±0.32	2.3±0.32	1.5±0.10*	3.1±0.21
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	2.8±0.15	2.8±0.19	3.6±0.12*	2.8±0.27	3.3±0.31
Plasmalogen Plazmalogen	10.3±0.31	11.3±0.81	9.6±0.57	9.5±1.03	10.4±0.48
Total phospholipids Całkowite fosfolipidy	25.1±1.31	27.8±1.23	26.6±1.23	25.3±1.46	28.8±1.09

Number of animals in each group: 6±SE (standard error)

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6±SE (błąd standardowy)

* Differences significant at $p < 0.05$

* Różnice istotne na poziomie $p < 0,05$

The most pronounced changes, observed in the myelin lipid pattern, expressed in absolute figures in relation to the dry myelin mass, was a pronounced increase in cholesterol esters content. The alteration was noticed as early as 4 hours after the experiment, being most intense after 14 days and tending to vanish thereafter. The alteration was accompanied by a decrease in the content of free cholesterol.

Table 3. Effect of acute hypoxia (2% O₂) on lipid pattern in rat brain myelin (% of total lipid content)
Tabela 3. Wpływ ostrego niedotlenienia (2% tlenu) na obraz lipidów mielinę mózgu szczura (w % całkowitej zawartości lipidów)

	Control	4 hours after hypoxia 4 godz. po niedo- tlenieniu	24 hours after hypoxia 24 godz. po niedo- tlenieniu	14 days after hypoxia 14 dni po niedo- tlenieniu	2 monthsh after hypoxia 2 miesiące po niedo- tlenieniu
Cholesterol	30.6±0.64	25.5±0.98*	26.4±0.66*	25.2±1.68*	23.2±1.09*
Cholesterol esters	0.01±0.006	0.11±0.02*	0.2±0.05*	0.5±0.05*	0.1±0.02*
Estry cholesterolu					
Sulfatides	6.8±0.40	6.9±0.38	7.0±0.53	9.5±0.35*	7.1±0.26
Sulfatydy					
Cerebrosides	23.7±0.72	25.0±0.89	24.7±0.85	15.9±1.11*	24.8±0.70
Cerebrozydy					
Total galactolipids	30.5±0.79	31.9±0.98	31.7±1.15	25.4±1.07	31.9±0.82
Całkowite galaktolipidy					
Sphingomyelins	2.1±0.11	3.8±0.17*	3.0±0.21*	3.3±0.34*	1.8±0.16
Sfingomieliny					
Phosphatidylcholine	12.5±0.68	12.8±0.45	14.1±0.78	18.7±1.71*	16.2±0.45*
Fosfatydylocholina					
Lysophosphatidylcholine	0.6±0.07	0.6±0.16	0.9±0.07*	1.0±0.16	1.1±0.12*
Lizofosfatydylocholina					
Phosphatidylserine	4.4±0.21	4.8±0.45	4.0±0.48	3.3±0.23*	5.4±0.22*
+ phosphatidylinositide					
Fosfatydyloseryna					
+ fosfatydyloinozytol					
Phosphatidylethanolamine	4.1±0.18	3.8±0.21	5.5±0.13*	5.8±0.58*	4.9±0.41
Fosfatydyloetanolamina					
Plasmalogen	15.2±0.28	16.6±1.24	14.2±0.59	16.8±1.58	15.3±0.30
Plasmalogen					
Total phospholipids	38.9±0.71	42.4±0.70	41.7±1.34	48.9±1.97	44.7±0.73
Całkowite fosfolipidy					

Number of animals in each group: 6±SE (standard error)

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6±SE (błąd standardowy)

* Differences significant at $p < 0.05$

* Różnice istotne na poziomie $p < 0,05$

The content of sulfatides and cerebrosides was unchanged after hypoxia. In changes observed in the phospholipid fractions, the slight increase in lysophosphatidylcholine, most pronounced in the late period after hypoxia (2 months) attracted our attention. Shifts in other phospholipids were not reproducible in all experimental groups. The results are presented in detail in Table 2. When levels of individual fractions were related to total lipids (Table 3), the character of changes was similar. It should be stressed only that nearly all phospholipid fractions, exhibited relative shifts, small but statistically significant, at the significance level of $p \leq 0.05$. Analogous results concerning the pattern of myelin phospholipids, as related to the total phospholipids are presented in Table 4.

Table 4. Effect of acute hypoxia (2% O₂) on lipid pattern in rat brain myelin (% of total phospholipid content)

Tabela 4. Wpływ ostrego niedotlenienia (2% tlenu) na obraz lipidów mielinę mózgu szczura (w % całkowitej zawartości fosfolipidów)

	Control Norma	4 hours after hypoxia 4 godz. po niedo- tlenieniu	24 hours after hypoxia 24 godz. po niedo- tlenieniu	14 days after hypoxia 14 dni po niedo- tlenieniu	2 months after hypoxia 2 miesiące po niedo- tlenieniu
Sphingomyelins Sfngomielin	5.3±0.33	9.2±0.35*	7.2±0.40*	6.8±0.57*	4.1±0.33*
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	32.1±1.20	29.7±1.22	33.7±1.38	38.3±3.11	36.3±0.87*
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	1.6±0.18	1.3±0.33	2.3±0.15*	2.1±0.36	2.5±0.27*
Phosphatidylserine + phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	11.3±0.48	11.6±0.91	9.4±0.97	6.8±0.51*	12.0±0.73
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	10.5±0.48	9.6±0.53	13.1±0.33*	11.8±1.40	10.9±0.73
Plasmalogen Plazmalogen	39.2±0.98	38.6±1.97	34.3±1.57*	34.2±2.56	34.2±0.90*

Number of animals in each group: 6±SE (standard error)

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6±SE (błąd standardowy)

* Differences significant at $p \leq 0.05$

* Różnice istotne na poziomie $p \leq 0,05$

DISCUSSION

Diffuse demyelination of cerebral white matter, resulting from hypoxia, described in clinical pathology as delayed hypoxic encephalopathy (Plum et al. 1962; Plum, Posner 1972), belongs to the vasogenic syndro-

me, very rare in comparison with cerebral infarction or selective necrosis of neurocytes. The syndrome described only in single cases of severe cerebral atheromatosis, may occur also after cardiac arrest, or carbon monoxide intoxication and even in deep hypoglycemia (Wender 1963; Wender et al. 1964; Traugott, Raine 1984). Diffuse, often uneven degeneration of the myelin of cerebral hemispheres, with relative preservation of intact axons, is the anatomical equivalent of the syndrome. The corresponding experimental model, in which massive demyelination, but limited to the commissural system occurred regularly, involves cyanide intoxication (Levine, Stypułkowski 1959; Bass 1964; Hirano et al. 1967; Wender et al. 1972, 1973, 1975).

As we have found in previous investigations (Wender et al. 1986), cyanide intoxication, at an intensity not leading to myelin destruction, leads to early cholesterol esterification. In the late period after exposing animals to cyanide, some shifts in the proportion of lipid components of myelin occurred, in the form of a decrease in cerebroside content and minor changes in the content of particular phospholipid classes. When cyanide intoxication was more severe, leading to demyelination in the corpus callosum, a significant decrease of the content of sphingomyelins, sulfatides, cholesterol and some phospholipids, as well as an increased cholesterol esterification without correlation with the reaction of macrophages occurred in the white matter (Wender et al. 1973). Concomitantly, shifts in the pattern of fatty acids of lipids in the white matter (Wender et al. 1975) and in the pattern of free fatty acids of the cerebral white matter can be noticed (Wender et al. 1985).

Our studies on cerebral myelin lipids after hypoxia referred heretofore have shown deviations similar only in part to those found at the predemyelinating stage of cyanide intoxication. In acute hypoxia, as in many other myelin lesions (Wender et al. 1976; Norton, Cammer 1984), marked enhancement of cholesterol esterification took place, with a relative decrease in free cholesterol content. In contrast to the observations made in cyanide intoxication, concerning a marked decrease in cerebroside content, in experiments with hypoxia we found no changes in the myelin galactolipids. However, similarly as in myelin alterations of other etiology, in the late period after the action of hypoxia an increase in lysophosphatidylcholine content occurred. After hypoxia, a slight increase in some phospholipid fractions has also been observed. The results may be explained by a reciprocal shift between the lipid and nonlipid components of myelin, from which those compounds which are less sensitive to the action of hypoxia, when related to the total dry myelin mass, show some increase.

Human diseases and experimental processes in which typical demyelination is observed are characterized biochemically by a decrease in the lipid-protein ratio, pronounced loss of cholesterol, phosphatidyle-

thanolamine and cerebrosides as well as by an increase in cholesterol ester content. In the floating fraction of myelin there occurs also a great quantity of cholesterol esters, differing in their pattern of fatty acids from that found in minute amounts in the normal brain. The different pattern, which may be interpreted as an intermediary one between that of normal and completely disintegrated myelin, was observed in some cases of SSPE (Norton, Cammer 1984). This pattern is characterized by a normal content of cholesterol, and low content of cerebrosides, sulfatides, phosphatidylethanolamine and plasmalogens.

The pattern of myelin lipids found by us in animals subjected to hypoxia, in the face of unaltered cerebrosides and phosphatide contents, cannot indicate progressing or accomplished demyelination. However, the observation concerning increased cholesterol esterification in the myelin as well as the increased content of lysophosphatidylcholine require consideration. In our opinion, hypoxia induces lesions of myelin molecular structure, but fails to provoke the lymphocyte and macrophage reaction and, therefore, does not lead to induction of myelinolytic factors and, subsequently, does not evoke demyelination. This seems to be in agreement with clinical observations showing that marked demyelination occurs in sporadic cases only, despite of the high frequency of ischemic brain lesions.

CONCLUSIONS

1. Acute hypoxia leads to enhancement of cholesterol esterification, production of lysophosphatidylcholine, marked decrease in free cholesterol content and some shifts of single phospholipid fractions in the myelin sheaths.

2. Acute hypoxia induces lesions of the myelin molecular structure without leading to marked demyelination in the central nervous system.

WPLYW OSTREGO NIEDOTLENIENIA NA LIPIDY MIELINY

Streszczenie

Badano skład lipidów mieliny izolowanej z mózgow sznurów uśmiercanych w 4 i 24 godziny, 14 dni oraz 2 miesiące po ostrym krótkotrwałym (3 min) niedotlenieniu.

Stwierdzono, że ostre niedotlenienie prowadzi do zwiększonej estryfikacji cholesterolu, produkcji lizofosfatydylocholiny, znacznego obniżenia zawartości wolnego cholesterolu i przesunięć ilościowych w zakresie pojedynczych frakcji fosfolipidowych.

Z przeprowadzonych badań wynika, że ostre niedotlenienie powoduje uszkodzenie struktury molekularnej mieliny bez histologicznie uchwytnej demielinizacji istoty białej.

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ГИПОКСИИ НА ЛИПИДЫ МИЕЛИНА

Резюме

Исследовалось содержание липидов миеллина, изолированного из мозгов крыс 4 и 24 часа, 14 дней и 2 месяца после острой кратковременной (3 минута) гипоксии.

Обнаружено, что острая гипоксия ведет к увеличенной этерификации холестерина, продукции лизофосфатидилхолина, значительному понижению содержания свободного холестерина и изменениям в единичных фосфолипидных фракциях.

С проведенных исследований следует, что острая гипоксия ведет к повреждениям молекулярной структуры миеллина без гистологически видимой демиелинизации белого вещества мозга.

REFERENCES

1. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466—468.
2. Bass N.: Pathogenesis of myelin lesions in experimental cyanide encephalopathy. *Neurology*, 1968, 18, 167—177.
3. De Medio G., Goracci G., Horrocks L., Łazarewicz J., Mazzari S., Porcellati G., Strosznajder J., Trovarelli G.: The effect of transient ischemia on fatty acid and lipid metabolism in the gerbil brain. *Ital. J. Biochem.*, 1980, 29, 412—432.
4. Domańska-Janik K., Strosznajder J., Zalewska T.: Effect of ischemia and hypoxia on rat brain glycolipids. *J. Neurosci. Res.*, 1982, 7, 363—370.
5. Folch-Pi J., Less M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—511.
6. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy. Electron microscopic observation of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 200—213.
7. Kosow D., Schwarz H., Harmolejo A.: Lipid biosynthesis in anoxic-ischemic rat brain. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 1139—1142.
8. Levine S., Stypulkowski W.: Experimental cyanide encephalopathy. *A.M.A. Arch. Pathol.*, 1959, 67, 306—323.
9. Norton N., Poduslo S.: Myelination in rat brains: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—758.
10. Norton W., Cammer W.: Chemical pathology of diseases involving myelin. In: *Myelin*. Ed. P. Morell, Plenum Press, New York, London 1984, 369—403.
11. Plum F., Posner J., Hein R.: Delayed neurological deterioration after anoxia. *Arch. Intern. Med.*, 1962, 110, 18—25.
12. Plum F., Posner J.: *Stupor and Coma*. Ed. F. A. Davis, New York 1972.
13. Porcellati G., De Medio G., Fini G., Floridi A., Goracci G., Horrocks L., Łazarewicz J., Palmerini C., Strosznajder J., Trovarelli G.: Phospholipids and its metabolism in ischemia. In: *Proceeding of the European Society for Neurochemistry*. Ed. V. Neuhoff, Verlag Chemie, Weinheim 1978, 285—302.
14. Radin N., Levin F., Brown J.: Determination of cerebroside. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789—796.
15. Raine C.: The neuropathology of myelin diseases. In: *Myelin*, Ed. P. Morell, Plenum Press, New York, London 1984, 259—310.
16. Singh H., Spritz M., Geyer B.: Studies of brain myelin in the "quaking mouse". *J. Lipid Res.*, 1971, 12, 473—483.
17. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97—106.

18. Strosznajder J., Gromek A., Łazarewicz J.: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 447—455.
19. Strosznajder J., Domańska-Janik K.: Effect of anoxia and hypoxia on brain lipid metabolism. *Neurochem., Res.*, 1980, 5, 583—589.
20. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 839—859.
21. Traugott U., Raine C.: The neurology of myelin disease. In: *Myelin*, Ed. P. Morell, Plenum Press, New York, London 1984, 311—335.
22. Wender M.: Studies of cerebral lipids in a relapsing case of carbon monoxide poisoning. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1963, 2, 371—377.
23. Wender M., Jurczyk W., Stengert K.: Cerebral lipids in myelinopathy caused by cardiac arrest. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1964, 4, 238—244.
24. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Wajgt A.: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 417—425.
25. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z.: Fatty acid pattern of cerebral lipids in cyanide encephalopathy. *Exp. Path.*, 1975, 41, 233—238.
26. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 153—162.
27. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Knitter B., Talkowska D., Pankrac J.: Influence of cyanide intoxication on the composition of myelin lipids in rats fed during development on a diet containing various amounts of lipids. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 43—56.
28. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Sroczyński E., Żórawski A.: The effect of cyanide intoxication on free fatty acid pattern in the brain of rats developing on a diet with various amounts of lipids. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 341—350.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

Na wniosek Rad obu Wydziałów Lekarskich Senat Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie nadał 23 maja 1987 r. doktorat Honoris Causa profesorowi dr. hab. med. Jerzemu Kulczykiemu.

*

5 czerwca 1987 r. w czasie VII Konferencji Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, odbyło się w Gdańsku Walne Zgromadzenie SNP, na którym wybrano nowe władze na kolejną 3-letnią kadencję w następującym składzie:

Prezes — prof. Józef Kałuża (Kraków),

Viceprezes — doc. Tadeusz Majdecki (Warszawa),

Sekretarz — dr hab. Agnieszka Jędrzejewska (Warszawa),

Skarbnik — dr med. Wielisław Papierz (Łódź).

Członkowie Zarządu — doc. Zofia Adamczewska-Gonczewicz (Poznań),
dr hab. Przemysław Nowacki (Szczecin).

Redaktor Naczelny „Neuropatologii Polskiej” — prof. Mirosław J. Mossakowski.

Delegatami SNP do Rady Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego pozostali prof. Maria Dąmbska i prof. Mieczysław Wender.

ANNA ZARĘBA-KOWALSKA, JERZY BOROWICZ

EFFECT OF TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA
ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE GIGANTOCELLULAR REGION
OF THE MEDULLARY RETICULAR FORMATION IN THE RAT

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

It has been established on various experimental models that brain ischemia produces metabolic alterations and cerebral microcirculation disturbances. These changes last many hours after the ischemic incident and are an essential factor damaging nervous tissue (Klatzo 1975, 1985). A significant factor is also the phenomenon of "maturation" of the pathological process leading to the appearance of ultrastructural changes in brain tissue at various times after ischemia, indirectly proportional to the duration of blood circulation arrest (Klatzo 1975).

The experimental ischemia model described by Korpaczew et al. (1982) is very useful for analysis of the pathomorphology of ischemic encephalopathy and the dynamics of pathological changes occurring in its case. This model was characterized in detail in respect to its physiopathology (Korpaczew et al. 1982) and the general pathomorphology of the central nervous system (Mossakowski et al. 1986). Mossakowski et al. discovered a selective vulnerability of some brain regions in this model of ischemia at the light microscopic level, and showed that the nucleus gigantocellularis of the reticular formation of the brain stem belongs to the regions particularly sensitive to ischemia.

The functional morphology of the gigantocellular region (GCR) of the medullary reticular formation is practically unknown despite the obvious fundamental physiological importance of this brain structure (Bowsher et al. 1968). The neurons of GCR are receptive to numerous central and peripheral inputs, particularly those of multisensory nature (Guilbaud et al. 1973; Siegel 1979). These findings suggest that neurons of GCR monitor the total input and global level of neuronal activity, while effecting specific motor responses and behavioral stages (Casey 1971). The gigantocellular region forms a relay for somatic impulses between the spinal cord and higher brain areas (Bowsher et al. 1968).

Evidence from electro-physiological techniques (Burton 1968) and autoradiographic studies (Basbaum et al. 1976, 1978) has led to the suggestion that the GCR constitutes a generator or center of pain transmission. From the anatomical, physiological and behavioral studies of Casey (1969, 1971) it also appears that the GCR has diverse function related to signalling of pain.

The significant physiological role of the GCR, its selective vulnerability to ischemia as well as the lack of information on its functional morphology led us to study the fine structural changes in the GCR following transient, complete ischemia of short-duration.

MATERIAL AND METHODS

Studies were performed on 12 male Wistar rats weighing 160—180 g. Ten animals were subjected to experimentally evoked ischemia (method described by Korpaczew et al. 1982). Under slight ether anaesthesia, a special needle clip was inserted into the animals chest and the vascular bundle of the heart was constricted. This operation led to cardiac arrest and cessation of blood circulation and respiration. In these experimental conditions clinical death, as revealed by disappearance of the bioelectric potential of the brain, occurs several seconds after cardiac arrest and cessation of respiratory function (Mossakowski et al. 1986). However, release of constriction after 2.5 min and application of external heart massage allowed for return of the heart function, blood circulation and respiration within 1—3 min. Immediately after recovery of blood circulation five animals were sacrificed (exp. group I), while the remaining five were kept for an additional three days and then killed (exp. group II). Two animals not subjected to the experiment served as a control.

The tissue samples containing the gigantocellular region of the brain stem were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2, and postfixed in 2% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2. After dehydration in a graded series of ethanols the tissue samples were embedded in Epon 812. Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEM 7 A electron microscope.

RESULTS

The ultrastructure of the GCR of the brain stem has been previously described in the rabbit (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1985). In general, it does not differ in rats so details will not be repeated here. In the

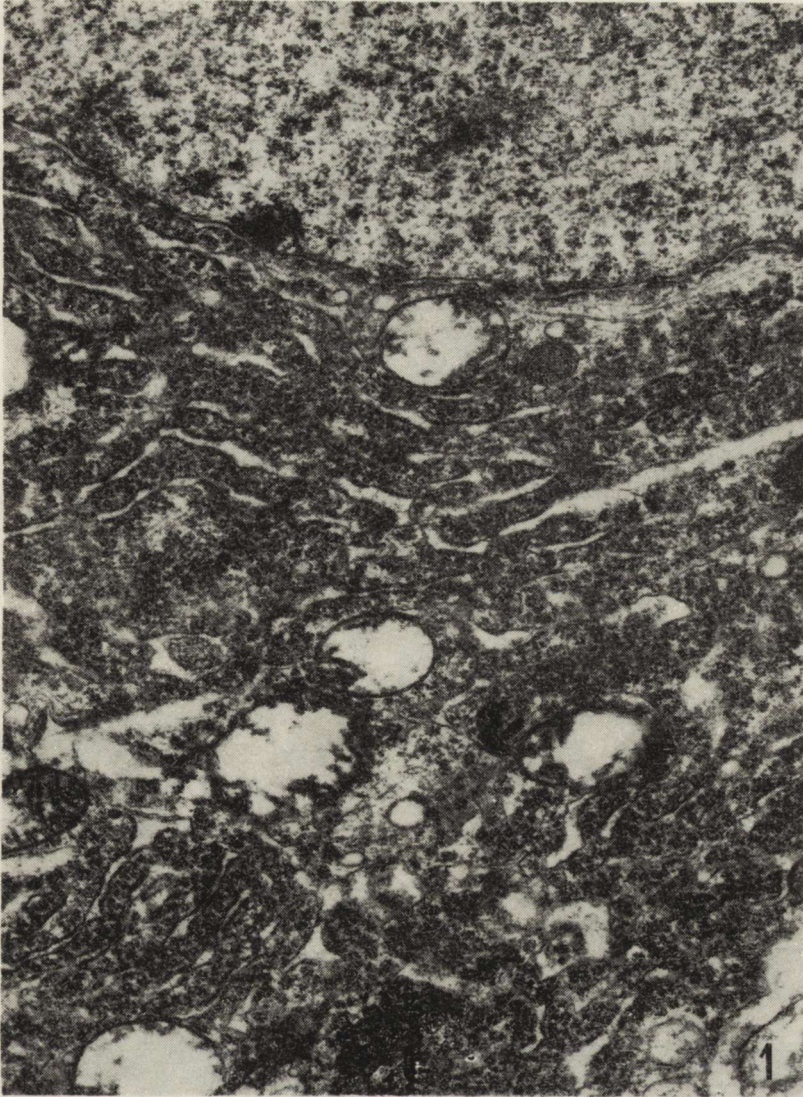


Fig. 1. Experimental group I. Large neuron. Fragment of the GCR. Agglomerations of rough endoplasmic reticulum with concomitant numerous ribosomes and polyribosomes. Note the swollen mitochondria with electron-translucent matrix and disrupted, rudimentary cristae. Neurotubules and neurofilaments are visible. $\times 10\ 875$

Ryc. 1. I grupa doświadczalna. Neuron olbrzymi. W cytoplazmie obecne są liczne skupienia siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, liczne rybosomy, polirybosomy, neurotubule i neurofilamenty. Uwagę zwracają obrzmiałe mitochondria o elektronowo-przeziernej macierzy ze skróconymi, szczątkowymi grzebieniami. Pow. $10\ 875 \times$

gigantocellular region of the rat we also observed two types of neurons. Neurons of the first type were large and had several dendritic branches. They were characterized by a round or oval, centrally placed nucleus poor in dispersed chromatin. Some nuclei showed invaginations of the nuclear envelope. The most characteristic feature of the cytoplasm was the abundance of rough endoplasmic reticulum (RER) often consisting of several cisternae running parallel throughout the cytoplasm. The Golgi complex was moderately developed. Neurons of the second type were small and exhibited a spherical shape with few primary dendrites. They had a centrally placed nucleus rich in heterochromatin aggregated beneath the nuclear envelope and a moderately developed rough endoplasmic reticulum and Golgi complex. The two types of neurons were easily identified in the GCR of rats.

Experimental group I. Electron microscopic observations performed immediately after blood recirculation revealed changes affecting mostly

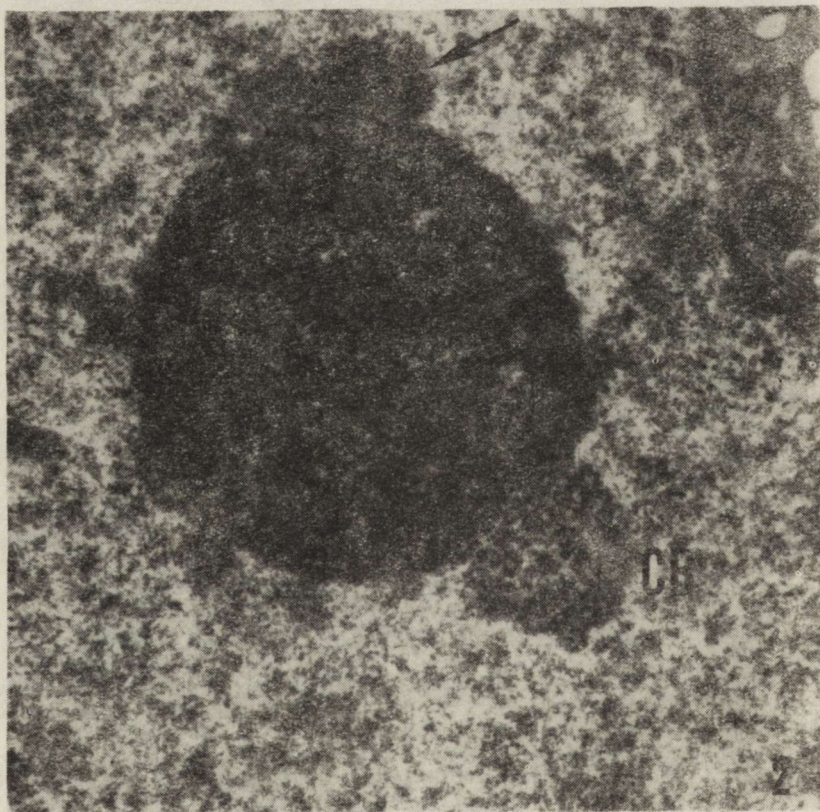


Fig. 2. Experimental group I. Nuclear profile of large neuron of GCR. Note nucleolus with a concomitant coiled body (CB). Aggregation of perinucleolar chromatin (arrow). $\times 20\ 750$

Ryc. 2. I grupa doświadczalna. Fragment jądra neuronu olbrzymiego. Widoczne jąderko z przylegającym „coiled body” (CB) oraz skupienie chromatyny przyjąderkowej (strzałka). Pow. $20\ 750 \times$

the large neurons of GCR of the medullary reticular formation. A striking feature was the presence of numerous large and swollen mitochondria throughout the neuronal cytoplasm, some of which had a balloon-like shape. The great majority of mitochondria had a translucent matrix and disrupted, rudimentary cristae. Other cytoplasmic organelles did not show any abnormalities (Fig. 1). Coiled bodies were occasionally observed in the vicinity of the nucleoli (Fig. 2).

Small neurons, in comparison with those of the control group, exhibited dilatation of some RER spaces and some slightly swollen mitochondria while other cellular organelles seemed to be unchanged (Fig. 3).

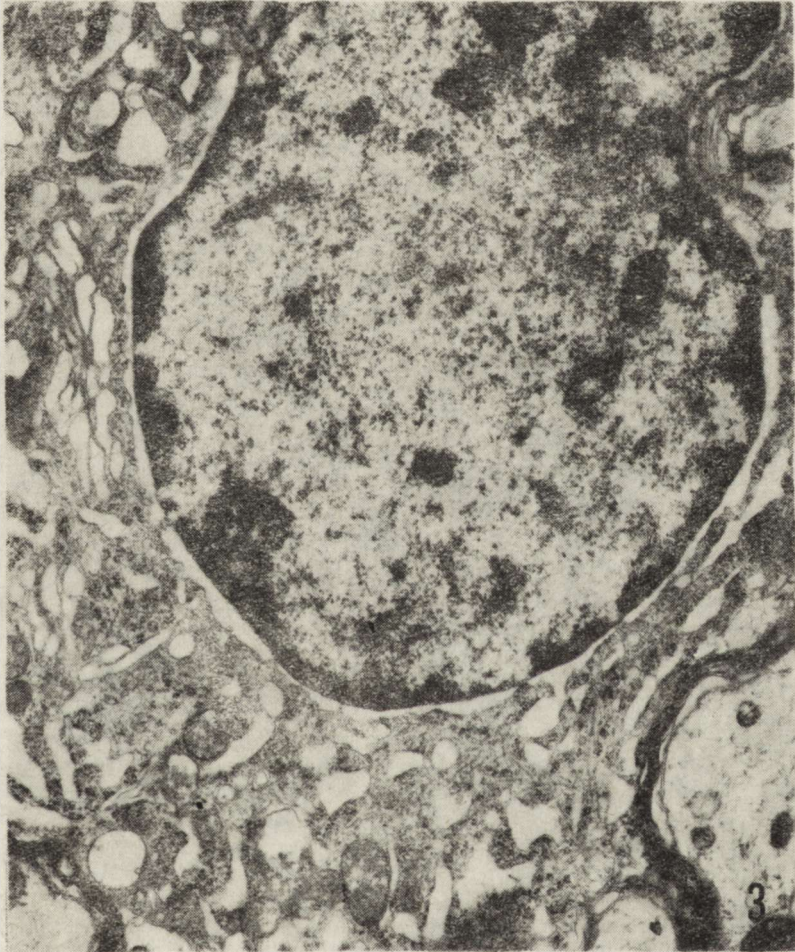


Fig. 3. Experimental group I. Small neuron. Dilated RER spaces and Golgi cisternae. Numerous neurotubules are visible in the cytoplasm. $\times 10\ 375$

Ryc. 3. I grupa doświadczalna. Mały neuron. W cytoplazmie neuronu widoczne są poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej szorstkiej oraz cysterny układu Golgiego. Widoczne są liczne neurotubule. Pow. $10\ 375 \times$

In the neuropil, the occasionally observed astrocytes, especially their processes, were slightly swollen (Fig. 4). They displayed an electron-lucent cytoplasm with few organelles. The tissue surrounding the capillaries had a normal structure.

Experimental group II. Three days after transient, complete cerebral ischemia the ultrastructural alterations were more pronounced. Large neurons of the GCR revealed a dilatation of RER spaces and distended cisternae of the Golgi complex. Free ribosomes and polyribosomes were

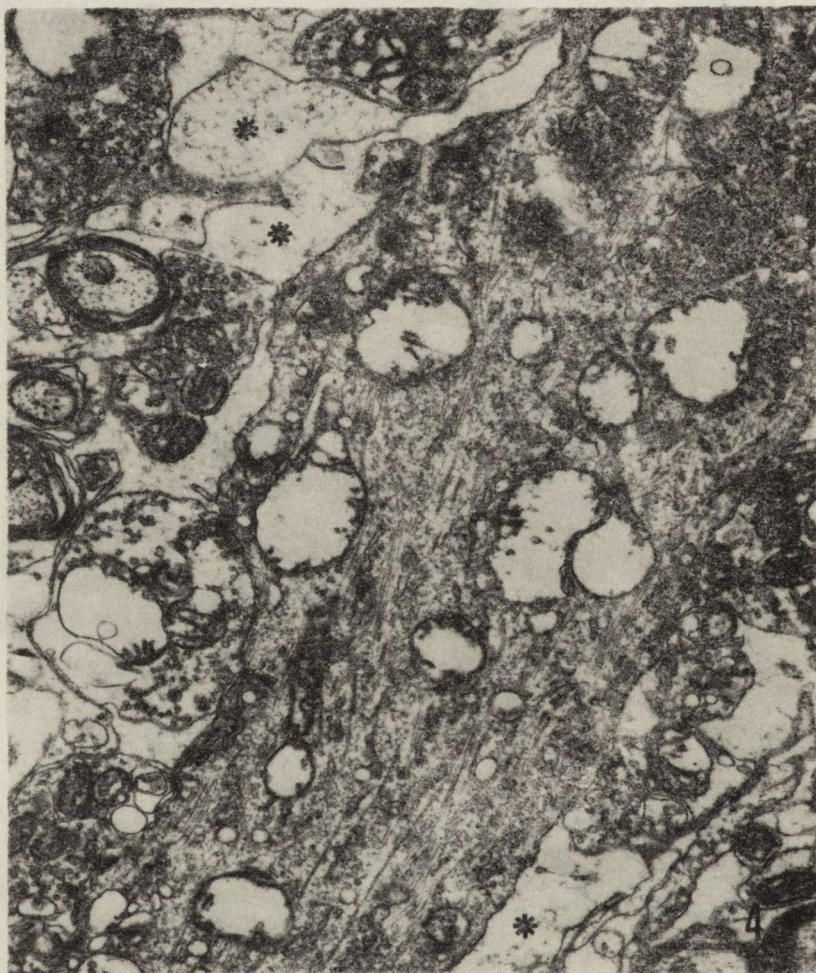


Fig. 4. Experimental group I. Fragment of dendrite of a large neuron of GCR. Note swollen mitochondria. Other organelles are well preserved. Presynaptic end feet on a dendrite contain numerous spherical vesicles. Astrocytic processes are swollen (asterisks). $\times 10\ 875$

Ryc. 4. I grupa doświadczalna. Fragment dendrytu neuronu olbrzymiego. Widoczne są obrzmiałe mitochondria przy dobrze zachowanych pozostałych strukturach wypustki. W neuropilu widoczne są kolbkowate zakończenia, zawierające liczne, kuliste pęcherzyki w kontakcie synaptycznym z dendrytem. Wypustki astrocytów są obrzmiałe (gwiazdki). Pow. $10\ 875 \times$

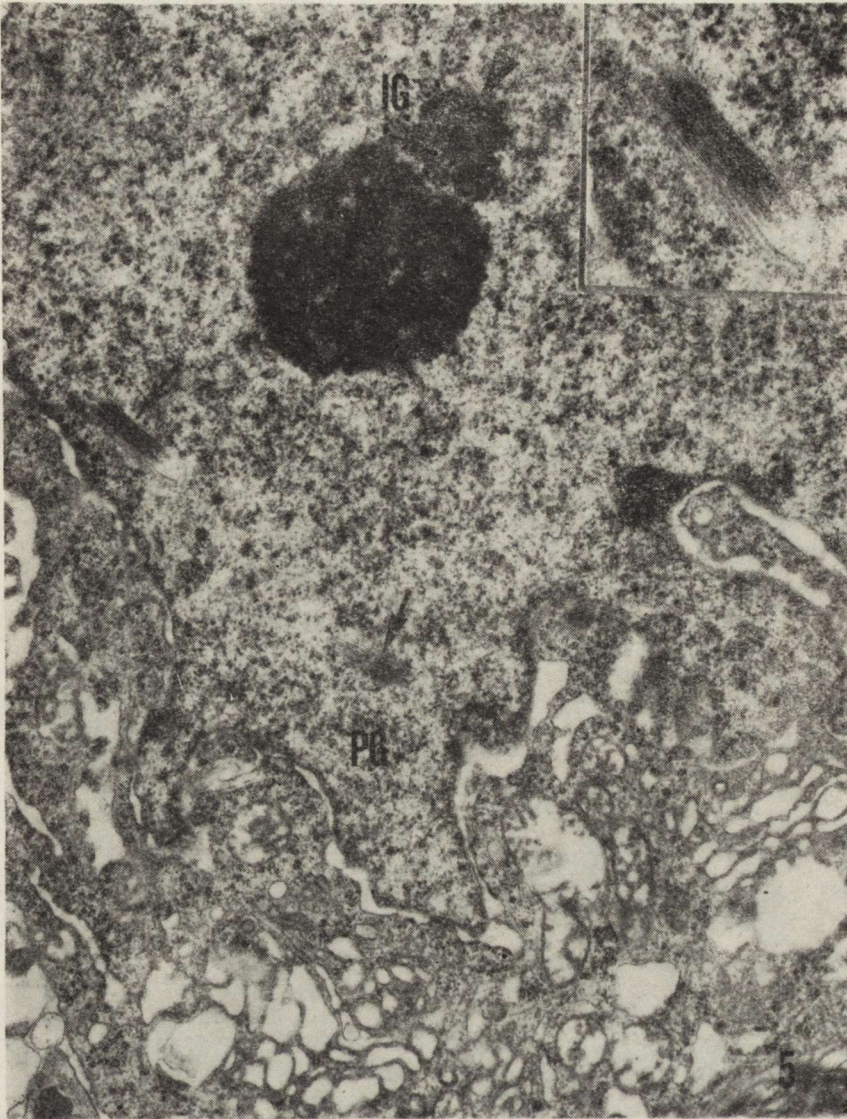
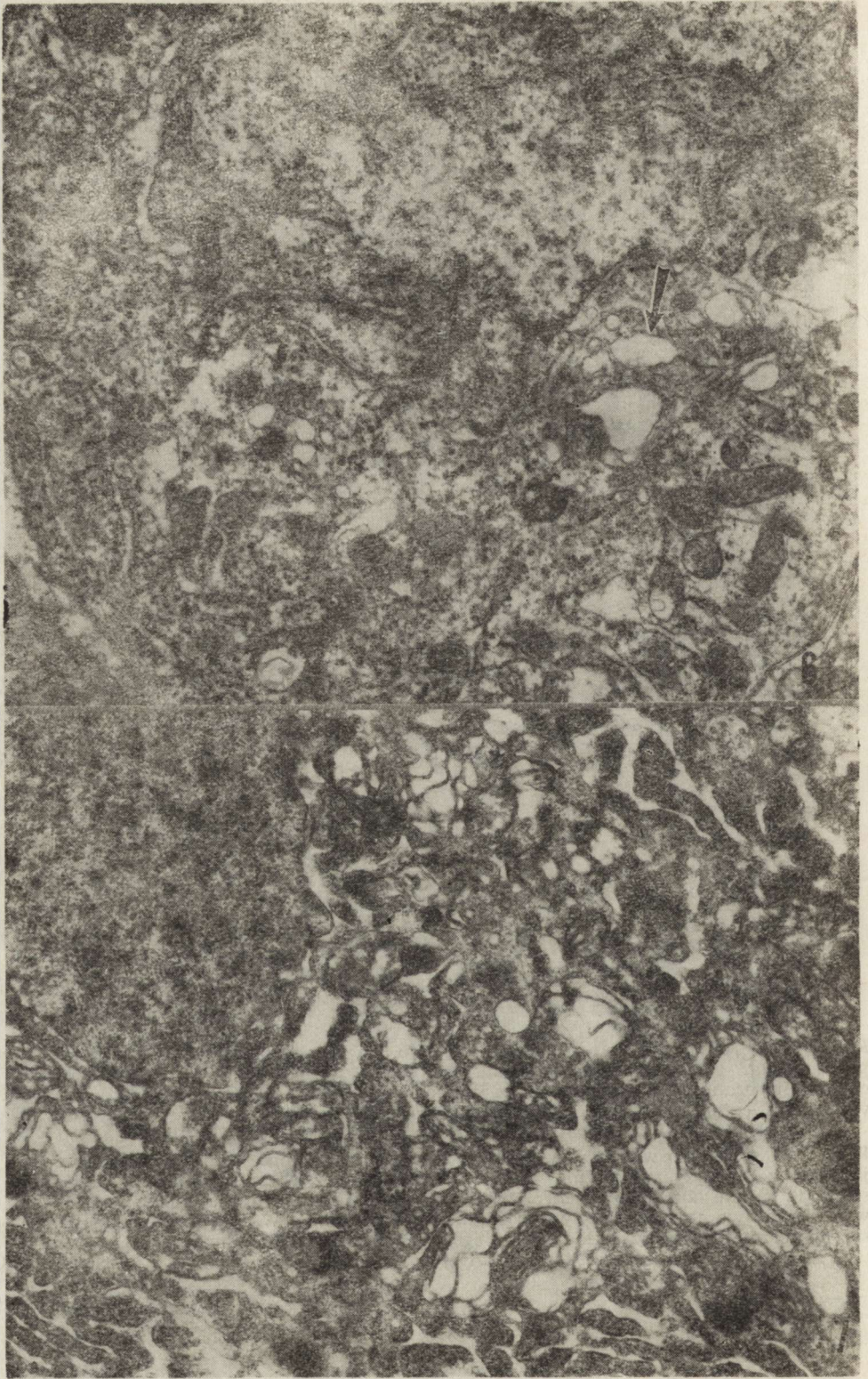


Fig. 5. Experimental group II. Large neuron. In the nucleus an aggregation of perinucleolar chromatin (arrow head) numerous perichromatin (PG) and interchromatin granules (IG) as well as nuclear filamentous inclusions (arrows) are visible. In cytoplasm dilated cisternae and RER channels are present. $\times 10\ 375$.
 Insert. Higher magnification of a filamentous nuclear inclusion. $\times 20\ 750$

Ryc. 5. II grupa doświadczalna. Neuron olbrzymi. W jądrze neuronu widoczne są jąderko z towarzyszącym mu skupieniem chromatyny przyjąderkowej (głównka strzałki), liczne ziarna perychromatynowe (PG) i interchromatynowe (IG) oraz wtręty jądrowe zbudowane z mikrofilamentów (strzałki). W cytoplazmie obserwuje się poszerzone cysterny układu Golgiego oraz kanały RER. Pow. $10\ 375 \times$ Insert. Większe powiększenie wtrętu jądrowego. Pow. $20\ 750 \times$



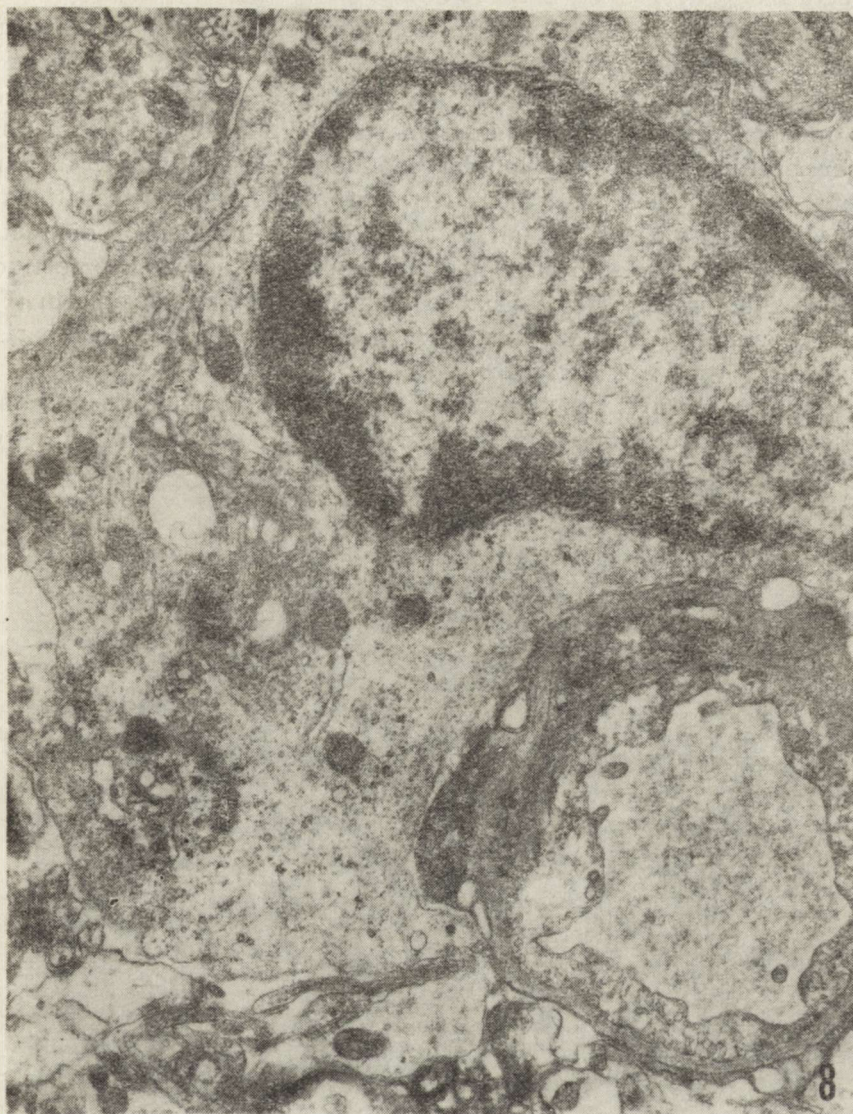


Fig. 8. Experimental group II. Small neuron of GCR exhibiting a normal ultra-structure. A capillary attached to its surface. $\times 10\ 375$

Ryc. 8. II grupa doświadczalna. Mały neuron o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Do jego powierzchni przylega naczynie krwionośne. Pow. $10\ 375 \times$

Fig. 6. Experimental group II. Large neuron of GCR. Nucleus of multi-lobular shape. The majority of mitochondria seem normal. Note dilated Golgi cisternae (arrow). $\times 10\ 375$

Ryc. 6. II grupa doświadczalna. Neuron olbrzymi. Jądro neuronu jest kształtu wielopłatowego. Większość mitochondriów o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Zwracają uwagę poszerzone cysterny układu Golgiego (strzałka). Pow. $10\ 375 \times$

Fig. 7. Experimental group II. Large neuron with „dark” electron-dense cytoplasm containing increased number of lysosomes. $\times 10\ 375$

Ryc. 7. II grupa doświadczalna. Neuron olbrzymi o elektronowo-gęstym cytoplazmie zawierającej liczne lizosomy. Pow. $10\ 375 \times$

numerous. The great majority of mitochondria had a normal ultrastructure, and only some of them were slightly swollen. Some large neurons with electron-dense cytoplasm had the appearance of "dark" cells. Neuronal nuclei showed deep invaginations of the nuclear envelope. Some nuclear profiles were multi-lobular in shape. In the nuclei of large neurons, coiled bodies were more frequently observed. Aggregations of perinucleolar chromatin and an increase in the number of distinctive perichromatin and interchromatin granules were observed. Some nuclei contained filamentous, spindle-shaped inclusions in the karyoplasm (Figs 5, 6 i 7). Small neurons did not show any abnormalities in comparison with those of the control group (Fig. 8).

A common feature was the swelling of the astroglia cells and their processes around capillaries (Fig. 9). Some swollen astroglia cells were



Fig. 9. Experimental group II. Perivascular region with swollen astrocytic processes is visible (asterisks). $\times 10\ 375$

Ryc. 9. II grupa doświadczalna. W neuropilu widoczna jest okolica okołonaczyniowa z obrzmiałymi wypustkami astrocytów (gwiazdki). Pow. $\times 10\ 375$

also observed in close contact with the occasionally observed "dark" neurons.

DISCUSSION

The gigantocellular region of the reticular formation of the brain stem of the rat exhibits several characteristics similar to those described in the cat (Bowsher, Westman 1970) and the rabbit (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1985). The two different types of neurons were easy to identify in the sections by their size, shape and ultrastructural features.

The presented results show that transient, complete cerebral ischemia resulted in ultrastructural changes in the GCR, affecting both neurons and glial cells. Ultrastructural alterations observed in large neurons were more pronounced three days after recovery. Distinct edematous changes observed in the GCR three days after the experiment affected astroglia cells. They were clearly perceptible in perivascular tissue. The earliest changes observed immediately after blood recirculation affected the large neurons and consisted of mitochondrial swelling. In the second experimental group of animals, i.e., three days after recovery, numerous large neurons exhibited ultrastructural alterations in the cytoplasm and the nuclei. In the cytoplasm dilatations of RER channels and Golgi cisternae were observed. In the neuronal nuclei, coiled bodies were frequently noted. They were reported to occur in neurons of the spinal ganglia (Masurovsky et al. 1967), in the neurons of trigeminal (Hardin et al. 1969) and sympathetic ganglia (Grillo 1970), in those of the cerebellar cortex (Radouco-Thomes et al. 1971) and in hypothalamic secretory neurons (Le Beux 1971). On the basis of ultrastructural and some cytochemical properties, the neuronal coiled bodies were considered to be the ultrastructural counterpart of the "accessory body" of Cajal (Hardin et al. 1969; Lafarga et al. 1983). Fibrillar parts of the neuronal nucleolar apparatus undergo distinct cytomorphic changes, accompanied by coiled bodies formation, in response to stress or to axon sectioning (Kinderman, La Velle 1976). Coiled bodies participate in rRNA transport and metabolism, and are widespread in different neuronal cells characterized by active protein synthesis (Lafarga et al. 1983).

Some nuclei of large neurons showed the presence of filamentous, spindle-shaped inclusions. Similar nuclear inclusions were previously described in the nervous system, e.g., in sympathetic neurons of the celiac and superior cervical ganglia of the cat (Seite et al. 1977). The latter authors reported that these nuclear inclusions are common in the cat stellate ganglion and their frequency is related to the neuronal activity level.

Some of the changes observed in this experiment correspond to earlier findings described in ischemia of the nervous tissue. For example "dark"

neurons were frequently observed in various areas of the central nervous system during or after severe cerebral ischemia (Brown, Brierley 1972; Schneider, Dralle 1973). These authors suggested that the appearance of "dark" neurons is probably associated with different stages of cellular dehydration which reflect different dynamics of the necrobiotic changes (Schneider, Dralle 1973). The edematous changes affecting astroglial cells found in the present study correspond well with previous findings (Chiang et al. 1968; Hossmann, Sato 1970). In the light of recent studies of Shigeno et al. (1966), the early development of brain edema after cerebral ischemia is of cytotoxic nature. This is considered to be a consequence of glial response to increased extracellular K^+ after depolarization of neuron membrans. On the other hand, there is evidence of the blood-brain barrier, i.e., brain capillary function, in ischemic edema formation. The authors postulate that brain capillaries also contribute to the regulation of ionic homeostasis in the central nervous system via several ion transport channels.

In conclusion, a transient, complete cerebral ischemia of short-duration resulted in striking ultrastructural changes affecting the large neurons of the gigantocellular region of the medullary reticular formation. Ultrastructural alterations in neurons persisted and were more pronounced three days after the ischemic incident. They were accompanied by edematous changes of astroglia cells especially pronounced in the perivascular tissue.

WPŁYW PRZEJŚCIOWEGO NIEDOKRWIENIA MÓZGU NA ULTRASTRUKTURĘ OBSZARU OLBRYMIOKOMÓRKOWEGO W TWORZE SIATKOWATYM RDZENIA PRZEDŁUŻONEGO SZCZURA

Streszczenie

Badania przeprowadzono na dorosłych szczurach Wistar, u których przez ucisk całego pęczka naczyniowego serca (metoda Korpaczewa i wsp. 1982) doprowadzono do zatrzymania krążenia krwi i śmierci klinicznej. Po 2,5 minutach ucisk pęczka naczyniowego zwalniano i przywracano czynność serca za pomocą jego zewnętrznego masażu. Materiał do badania pobierano bezpośrednio po reanimacji (I grupa doświadczalna) oraz w 3 dni po zabiegu (II grupa doświadczalna).

W I grupie doświadczalnej stwierdzono w neuronach olbrzymich obrzmienie mitochondriów. U szczurów II grupy obserwowano w cytoplazmie neuronów olbrzymich poszerzenie zbiorników układu Golgiego oraz kanałów siateczki śródplazmatycznej szorstkiej. W jądrach neuronów olbrzymich stwierdzono częstsze występowanie „coiled bodies”, skupień chromatyny jądrowej oraz występowanie wrętów jądrowych zbudowanych z filamentów, których obecność wiąże się ze stanem hiperaktywności. Ziarna perichromatynowe i interchromatynowe były liczne i wyraźnie widoczne. Stwierdzono również występowanie „ciemnych” neuronów, o cechach zwyrodnienia. Zmianom neuronalnym towarzyszyło obrzmienie komórek astrogleju, szczególnie widoczne w okolicach okołonaczyniowych.

ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕННОЙ ИШЕМИИ МОЗГА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ
ГИГАНТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ ОБЛАСТИ РЕТИКУЛЯРНОГО ВЕЩЕСТВА
ПРОДОЛГОВАТОГО МОЗГА КРЫС

Резюме

Эксперименты велись на взрослых крысах, у которых доводилось до задержки кровообращения и клинической смерти (по методу Корпачева и соавторов, 1982), удавляя 2,5 мин. весь сосудистый пучок сердца. Материал для ультраструктурных исследований побирался непосредственно после восстановления деятельности сердца и дыхания (I группа) и спустя 3 дня переживания (II группа).

У крыс I группы в гигантских нейронах обнаружен отек митохондрии. У крыс II группы в цитоплазме этих нейронов найдено расширение цистерн системы Golgi и канальцев зернистого эндоплазматического ретикулум. В ядрах гигантских нейронов обнаружено более частое появление „coiled bodies”, накопление перинуклеолярного хроматина и ядерные включения, построенные из филаментов, присутствие которых связано с состоянием гиперактивности клетки. Перихроматинные и интерхроматинные зерна были многочисленными и отчетливыми. Были также обнаружены „темные” нейроны с признаками дегенерации. Неврональным изменениям сопутствовало набухание астроцитов особенно отчетливые вблизи сосудов.

REFERENCES

1. Basbaum A. I., Clanton C. H., Fields H. L.: Ascending projections of nucleus gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the cat: an autoradiographic study. *Anat. Res.*, 1976, 184, 354—357.
2. Basbaum A. I., Clanton C. H., Fields H. L.: Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *J. comp. Neurol.*, 1978, 178, 209—224.
3. Bowsher D., Mallart A., Petit D., Albe-Fessard D.: A bulbar relay to the centre median. *J. Neurophysiol.*, 1968, 21, 288—300.
4. Bowsher W., Westman J.: The gigantocellular reticular region and its spinal afferents: a light and electron microscopic study in the cat. *J. Anat. (Lond.)*, 1970, 106, 23—36.
5. Brown A. W., Brierley J. B.: Anoxic-ischemic change in rat brain. Light microscopic and fine structural observations. *J. Neurol., Sci.*, 1972, 16, 49—56.
6. Burton H.: Somatic sensory properties of caudal bulbar reticular neurons in the cat (*Felis domestica*). *Brain Res.*, 1968, 11, 357—372.
7. Casey K. L.: Somatic stimuli spinal pathways, and size of cutaneous fibers influencing unit activity in the medial medullary reticular formation. *Exp. Neurol.*, 1969, 25, 35—56.
8. Casey K. L.: Responses of bulbotreticular units to somatic stimuli eliciting escape behavior in the cat. *Int. J. Neurosci.*, 1971, 2, 15—28.
9. Chiang J., Kowada M., Ames A., Wright R. L., Majno G.: Cerebral ischemia. III. Vascular changes. *Am. J. Path.*, 1968, 52, 455—476.
10. Grillo M.: Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J. Cell Biol.*, 1970, 45, 100—117.
11. Guilbaud G., Besson J. M., Oliveras J. L.: Modifications of the firing rate of bulbar reticular units (nucleus gigantocellularis) after intra-arterial injection of bradykinin into the limbs. *Brain Res.*, 1973, 63, 131—140.
12. Hardin J. H., Spicer S. P., Greene W. B.: The paranucleolar structure, accessory body of Cajal, sex chromatin, and related structures in nuclei of rat trige-

- minal neurons: A cytochemical and ultrastructural study. *Anat. Res.*, 1969, 164, 403—432.
13. Hossmann K.-A., Sato K.: The effect of ischemia on sensimotor cortex of cat. Electrophysiological, biochemical and electronmicroscopical observations. *Neurology*, 1970, 198, 33—45.
 14. Kinderman N. B., La Velle A.: A nucleolus associated coiled body. *J. Neurocytol.*, 1976, 5, 545—550.
 15. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. In: *Nervous system. Vol. 1. The basic neuroscience.* Ed. D. B. Tower, Raven Press, New York, 1975, 313—322.
 16. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17—19 October 1985. p. 16.
 17. Korpaczew W. G., Łysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie kliniczjeskiej smierti i postreanimatornoj bolezni u krysz. *Patolog. Fizjel. i Eksper. Tierapia*, 1982, 3, 78—80.
 18. Lafarga M., Hervas J. P., Santa-Cruz M. C., Villegas J., Crespo D.: The accessory body of Cajal in the neuronal nucleus. A light and electron microscopic approach. *Anat. Embryol.*, 1983, 166, 19—30.
 19. Le Beux Y. J.: An ultrastructural study of the neurosecretory cells of the merial vascular prechiasmatic gland, the preoptic recess, and the anterior part of the suprachiasmatic area. I. Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli. *Z. Zellforsch.*, 1971, 114, 404—440.
 20. Masurovsky E. B., Bunde M. B., Bunge R. P.: Cytological studies of organotypic cultures of rat dorsal root ganglia following X-irradiation in vitro. I. Changes in neurons and satellite cells. *J. Cell Biol.*, 1967, 32, 467—496.
 21. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471—489.
 22. Radouco-Thomas C., Nosal G. L., Radouco-Thomas S.: The nuclear ribosomal system during neuronal differentiation and development. In: *Chemistry and brain development.* Eds. R. Paoletti, A. N. Davison. Plenum Press, New York, 1971, 291—308.
 23. Schneider H., Dralle J.: Ultrastructural changes in the rat spinal cord after temporary occlusion of the thoracic aorta. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1973, 26, 301—312.
 24. Seite R., Zerbib R., Vuillet-Luciani J., Vio M.: Nuclear inclusions in sympathetic neurons: A quantitative and ultrastructural study of the superior cervical and celiac ganglia of the cat. *J. Ultrast. Res.*, 1977, 61, 254—259.
 25. Siegel J. M.: Behavioral functions of the reticular formation. *Brain Res. Rev.*, 1979, 1, 69—105.
 26. Shigeno T., Hanamura T., Mina T., Kaneko M., Asano T., Takanura K.: Mechanisms of ischemic brain edema: Aspects from brain capillary and glial function for ion transport. *Brain Microcirculation: Pathology, Diagnosis, Therapy.* An Ervin Riesch Symposium, Berlin, September 2—5, 1986.
 27. Zaręba-Kowalska A., Borowicz J.: The effect of hyperthermia on the ultrastructure of the gigantocellular reticular region in the rabbit. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 335—352.

Authors' address: Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

BARBARA GAJKOWSKA

WPŁYW KRÓTKOTRWAŁEGO NIEDOKRWIENIA MÓZGU
NA JĄDRO NADWZROKOWE I JĄDRO PRZYKOMOROWE
PODWZGÓRZA SZCZURA

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

Ośrodkowy układ nerwowy jest jednym z najwrażliwszych i najszybciej reagujących na niedokrwienie narządów. Istnieją obszary mózgowia szczególnie wrażliwe na niedokrwienie (Brierley 1976; Pulsinelli, Brierley 1979; Wieloch 1985). Ustalono szczegółowo, że w niektórych warstwach kory mózgowej (III, V i VI), w gałce bladej, w prążkowie, w hipokampie (sektor CA₁ i CA₅) we wzgórzu oraz w warstwie komórek Purkiniego kory mózdzku wiele neuronów ulega nieodwracalnym zmianom niedokrwicznym, podczas gdy komórki nerwowe innych struktur są bardziej odporne (Kirino 1982, 1985; Suzuki i wsp. 1985). Można przypuszczać, że jednym z mechanizmów patogennych w przejściowym niedokrwieniu mózgu jest uszkodzenie poperfuzyjne (Hekmatpanah, Hekmatpanah 1986). Mechanizm ten, obok samego niedokrwienia, odgrywa zapewne zasadniczą rolę w patogenezie nieodwracalnych uszkodzeń tkanki nerwowej (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984). Zmiany rozwijające się w mózgu po przywróceniu krążenia krwi zostały opisane przez Ito i wsp. (1975) i określone jako tzw. „maturation phenomenon”, polegający na nasilaniu się nieprawidłowości wraz z upływem czasu po niedokrwieniu. Wydaje się, że istnieje bezpośrednia zależność między intensywnością niedokrwienia i narastaniem procesu patologicznego (Yamaguchi i wsp. 1985). Niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego w zależności od jego intensywności może prowadzić do odwracalnych zmian patomorfologicznych, lecz prowadzi również do zwyrodnienia i rozpadu neuronów.

Celowa wydawała się ocena obrazów ultrastrukturalnych jąder neurosekrecyjnych podwzgórza szczura. U zwierząt wywoływano krótkotrwałe, całkowite niedokrwienie mózgowia. Obserwacje morfologiczne jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego prowadzono bezpośrednio po przywróceniu krążenia krwi oraz po 3 dniach od wykonania zabiegu.

MATERIAŁ I METODY

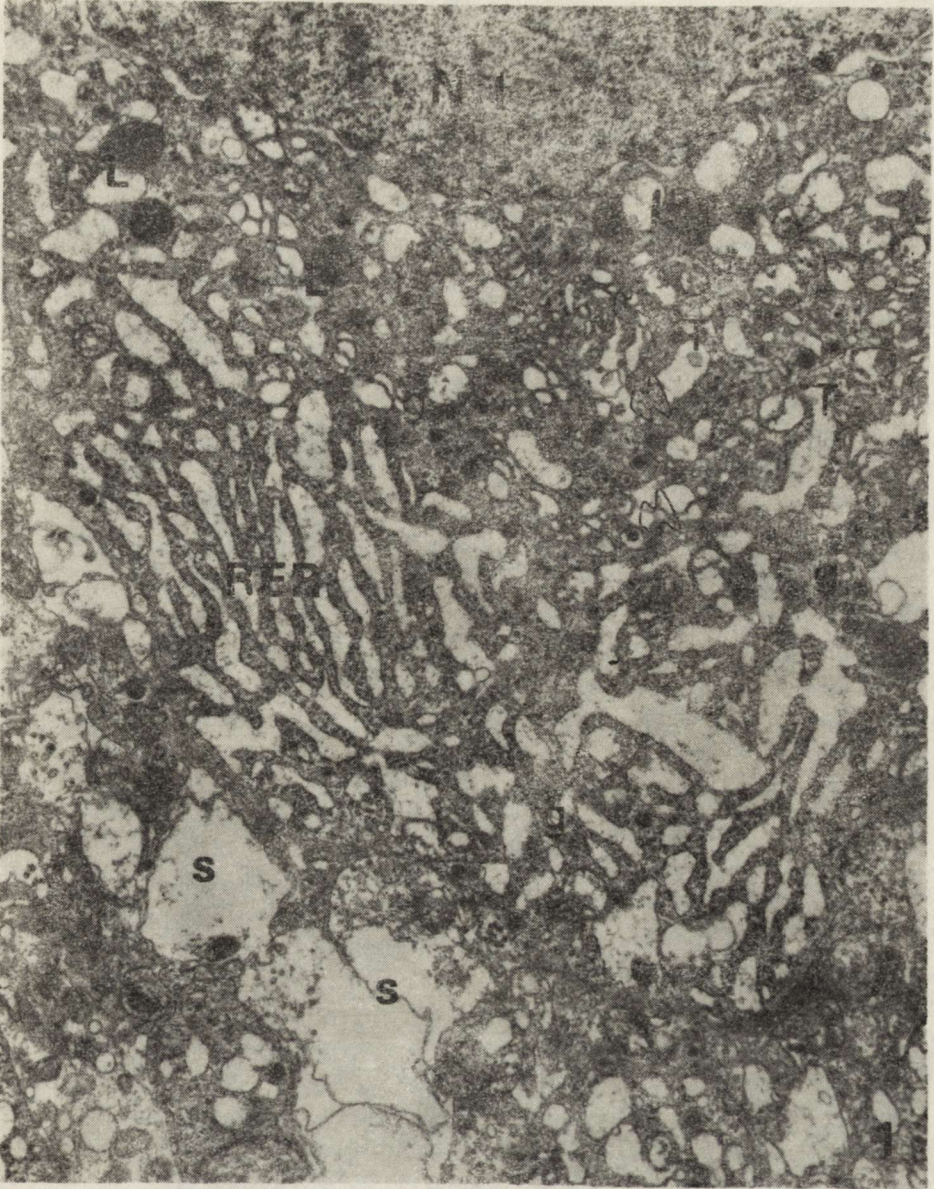
Badania przeprowadzono na 14 dorosłych szczurach, samcach rasy Wistar z hodowli losowej, o masie ciała 160—180 g. Zwierzętom w lekkiej narkozie eterowej wprowadzano do klatki piersiowej drogą wkłucia (bez konieczności jej otwierania i prowadzenia kontrolowanej wentylacji płuc) igłowy zacisk według modelu Korpaczewa i wsp. (1982), którym zaciskano pęczek naczyniowy serca przez 2,5 minuty. Prowadziło to do zatrzymania czynności serca i wystąpienia bezdechu oraz powodowało całkowite zatrzymanie krążenia krwi. Uwolnienie ucisku pęczka naczyniowego oraz zastosowanie zewnętrznego masażu serca pozwalało na przywrócenie czynności serca i oddechu. Pięć zwierząt dekapitowano natychmiast po wykonanym zabiegu, 5 szczurów pozostawiono na okres 3 dni. Zwierzęta doświadczalne dekapitowano łącznie ze zwierzętami kontrolnymi, nie poddanymi żadnym zabiegom, po 2 szczury w obu grupach czasowych.

Do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano wycinki z jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza szczura. Utrwalało je w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w buforze kakodylanowym o pH 7,4 przez 1 godz., a następnie w 1% OsO₄ w buforze kakodylanowym, pH 7,4 również przez 1 godz. Po odwodnieniu w roztworach alkoholu etylowego i tlenku propylenu wycinki zatapiało w Eponie 812. Półcienkie skrawki barwiono 1% błękitem toluidyny w celu ustalenia dokładnej lokalizacji neuronów badanych jąder podwzgórza. Ultracienkie skrawki kontrastowano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianu ołowiu. Preparaty oglądano i zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A na kliszach ORWO EU-2.

WYNIKI

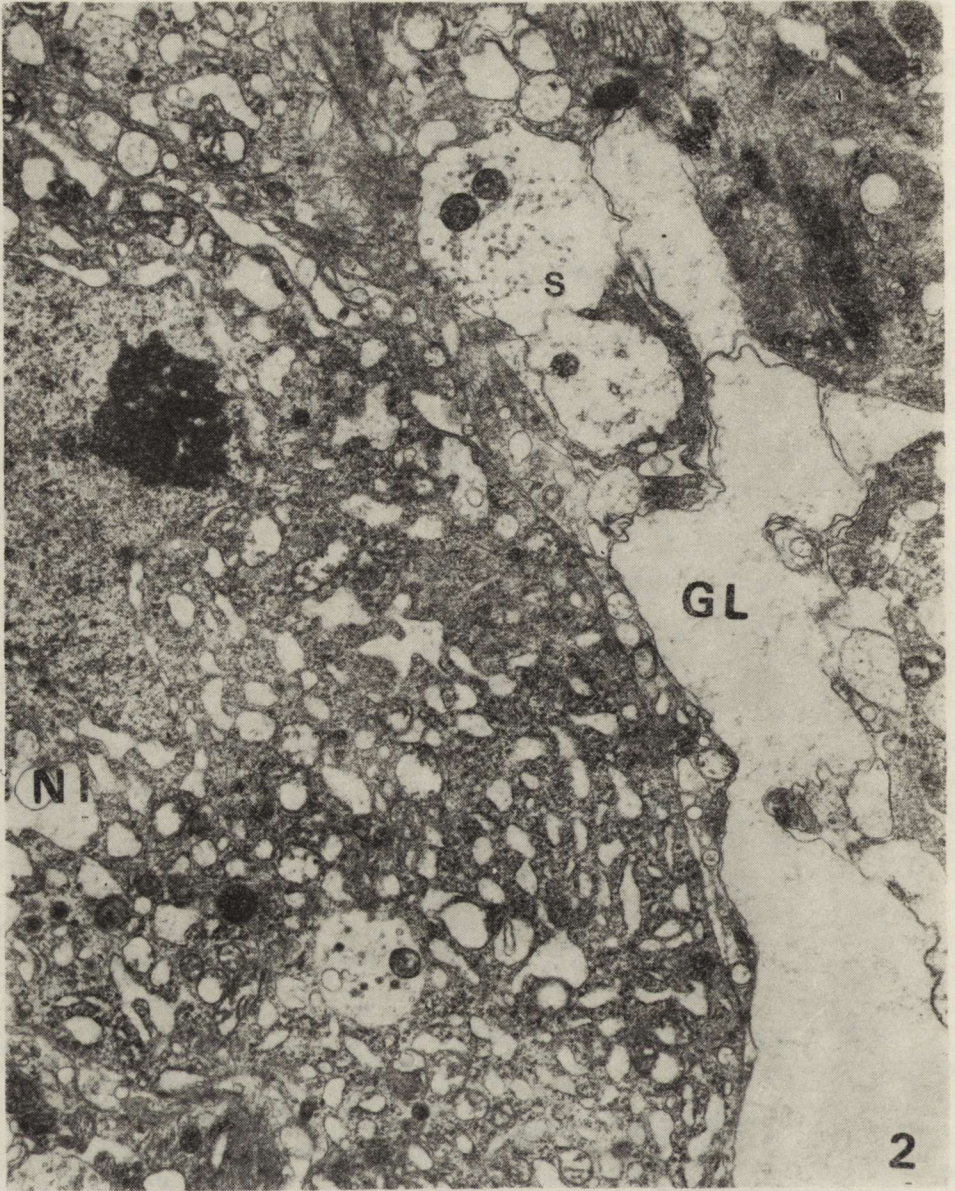
I grupa doświadczalna

W tej grupie prowadzono obserwacje neuronów jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) natychmiast po wykonaniu doświadczenia. Zaobserwowano podobną reakcję w obu badanych jądrach. Krótkotrwałe niedokrwienie spowodowało zmiany w neuronach i astrocytach. Zróżnicowane obrazy ultrastrukturalne pozwoliły określić trzy ich typy. Pierwszy typ ultrastruktury neuronów sekrecyjnych przejawiał wyraźne cechy wzmożonej aktywności metabolicznej. Charakteryzował się on bardzo znacznie rozbudowaną siateczką śródplazmatyczną ziarnistą (RER) oraz nagromadzeniem dużej ilości ziarnistości neurosekrecyjnych (ryc. 1). RER zajmowała znaczne obszary cytoplazmy i była równomiernie pokryta rybosomami. Kanały RER zachowywały równoległy układ. Większość z nich była poszerzona. We wszystkich kanałach RER widoczna była niewielka ilość zawartości o średniej gęstości elektro-



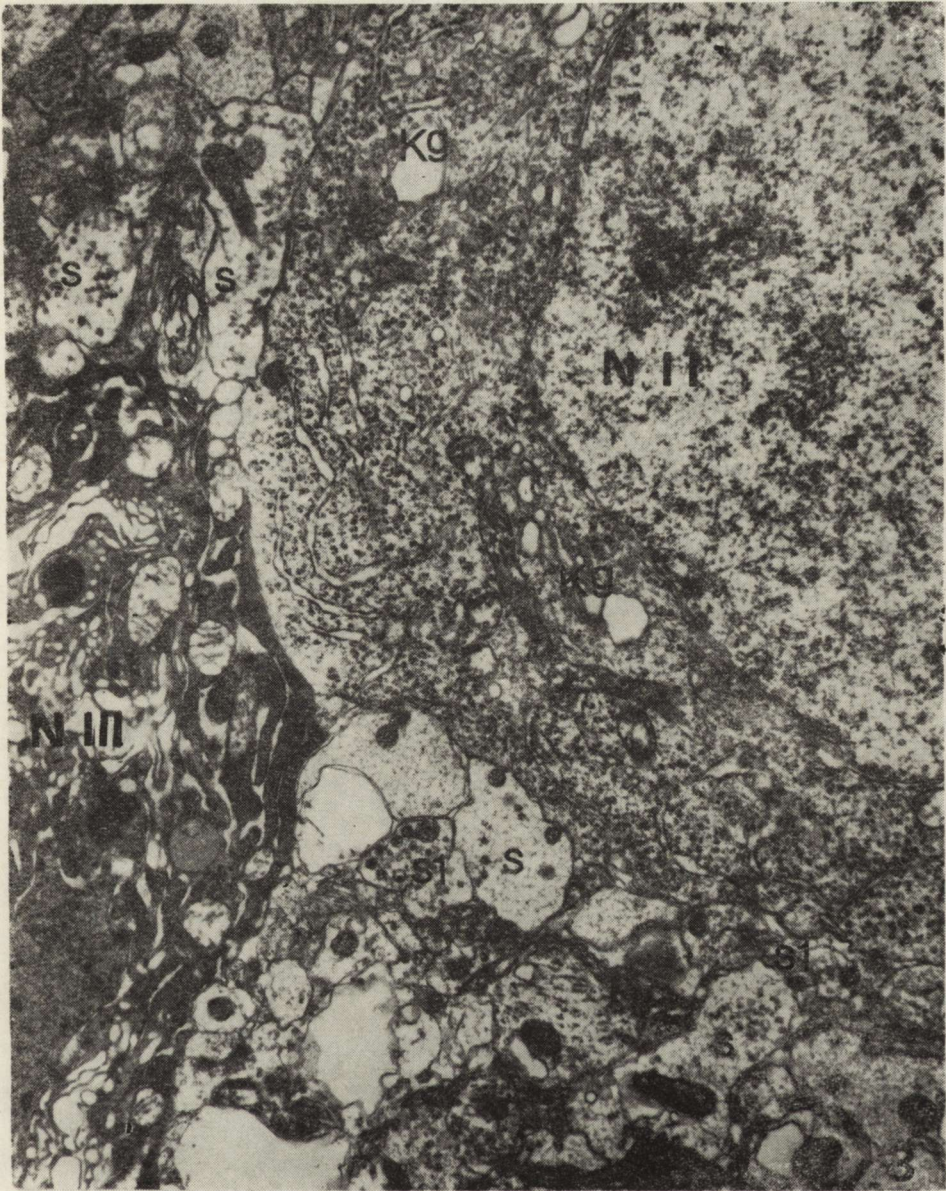
Ryc. 1. I grupa doświadczalna. Jądro nadwzrokowe. Fragment neuronu typu I (NI) z rozbudowaną siateczką śródplazmatyczną szorstką (RER) i dużą ilością ziarnistości neurosekrecyjnych (g). W cytoplazmie widoczne neurotubule (T) oraz lizosomy (L) i dobrze rozwinięty kompleks Golgiego, w niektórych jego zbiornikach — ziarnistości neurosekrecyjne (strzałki). Niektóre synapsy (S) są obrzmiałe. Pow. 13 650 \times

Fig. 1. Experimental group I. Supraoptic nucleus. Fragment of type I neuron (NI) with hypertrophic RER and numerous neurosecretory granules (g). Neurotubules (T), lysosomes (L) and well developed Golgi complex with neurosecretory granules within the cisternae (arrows) are present. Some of the synapses (S) are swollen. $\times 13\ 650$



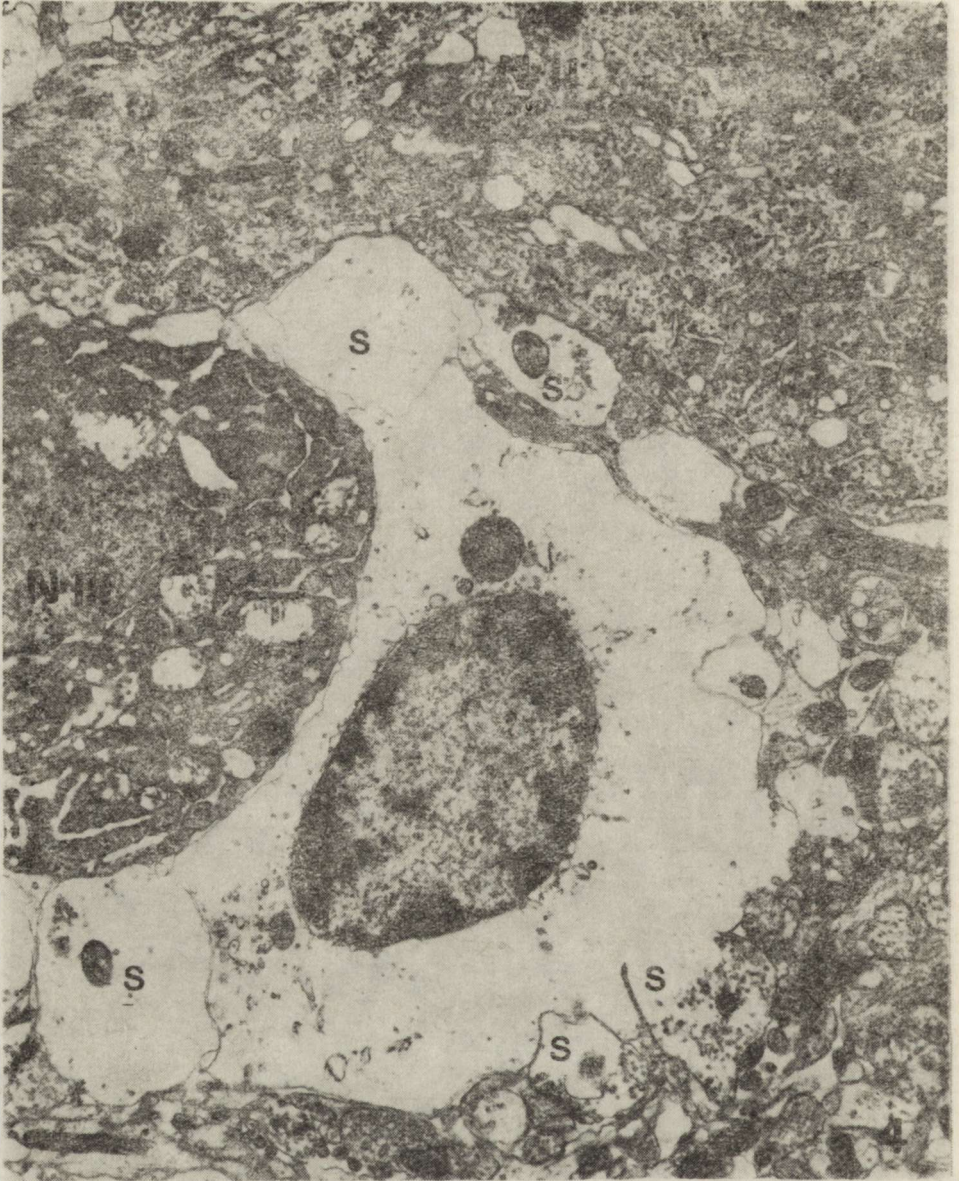
Ryc. 2. I grupa doświadczalna. Jądro przykomorowe. Fragment neuronu typu I (NI) i obrzmiałej wypustki astrocytarnej (GL). Synapsa w odcinku presynaptycznym: obrzmiała aksoplazma i niewielka ilość pęcherzyków synaptycznych (S). Pow. 13 650 \times

Fig. 2. Experimental group I. Paraventricular nucleus. Fragment of type I neuron (NI) and swollen astrocytic processes (GL). Pre-synaptic bouton of synapse with swollen axoplasm and not numerous synaptic vesicles (S). \times 13 650



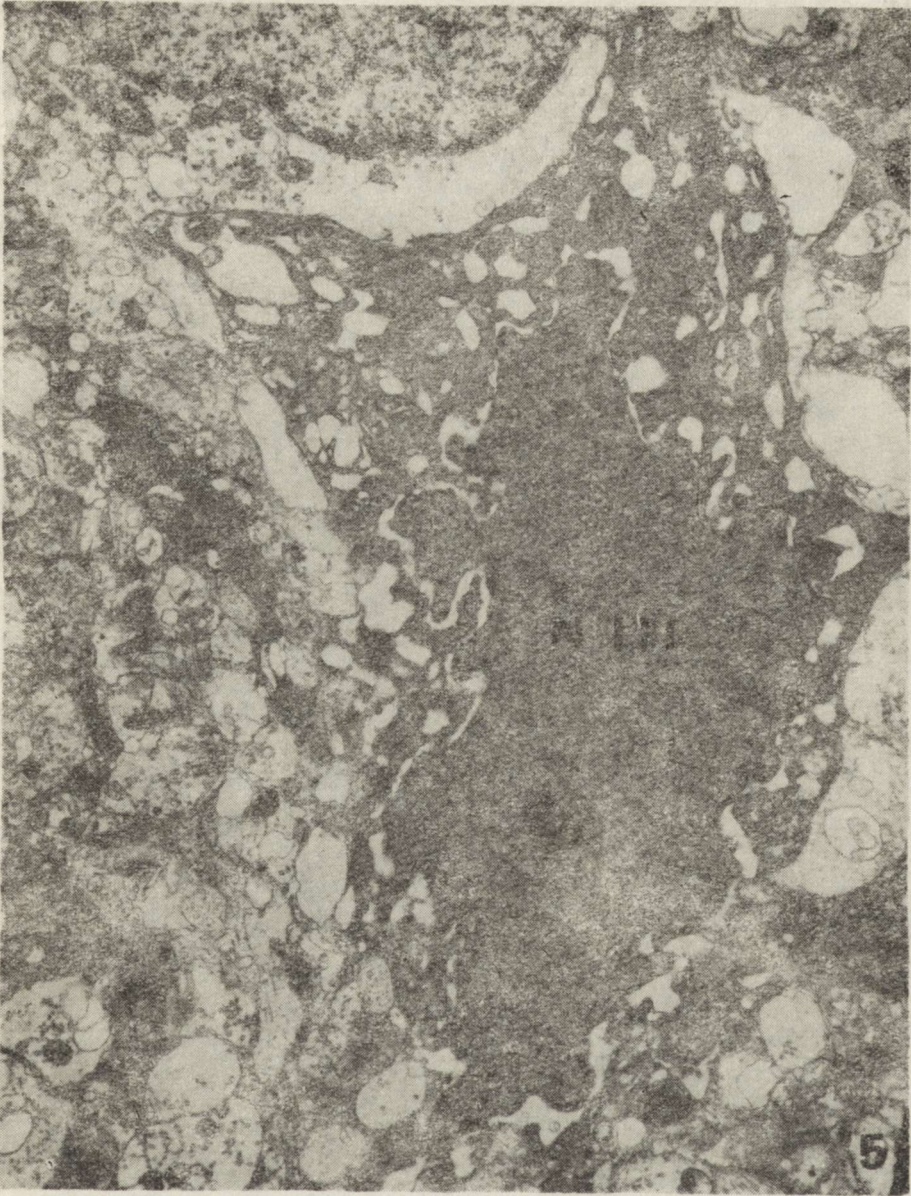
Ryc. 3. I grupa doświadczalna. Jądro nadwzrokowe. Neuron typu II (NII) z poszerzonymi zbiornikami kompleksu Golgiego (Kg). Fragment obkurzonego neuronu o ciemnej zagęszczonej cytoplazmie (typ III). Niektóre synapsy o obrzmiałej akso-plazmie z nielicznymi pęcherzykami synaptycznymi (S), niektóre o prawidłowej bu-dowie ultrastrukturalnej (S1). Pow. 13 650 ×

Fig. 3. Experimental group I. Supraoptic nucleus. Type II neuron (NII) with dilated Golgi cisternae (Kg) and fragment of shrunken type III neuron (NIII) with dark and condensed cytoplasm. Some synapses with swollen axoplasm and not numerous synaptic vesicles (S). Ultrastructurally unchanged synapses (S1) also are visible.
× 13 650



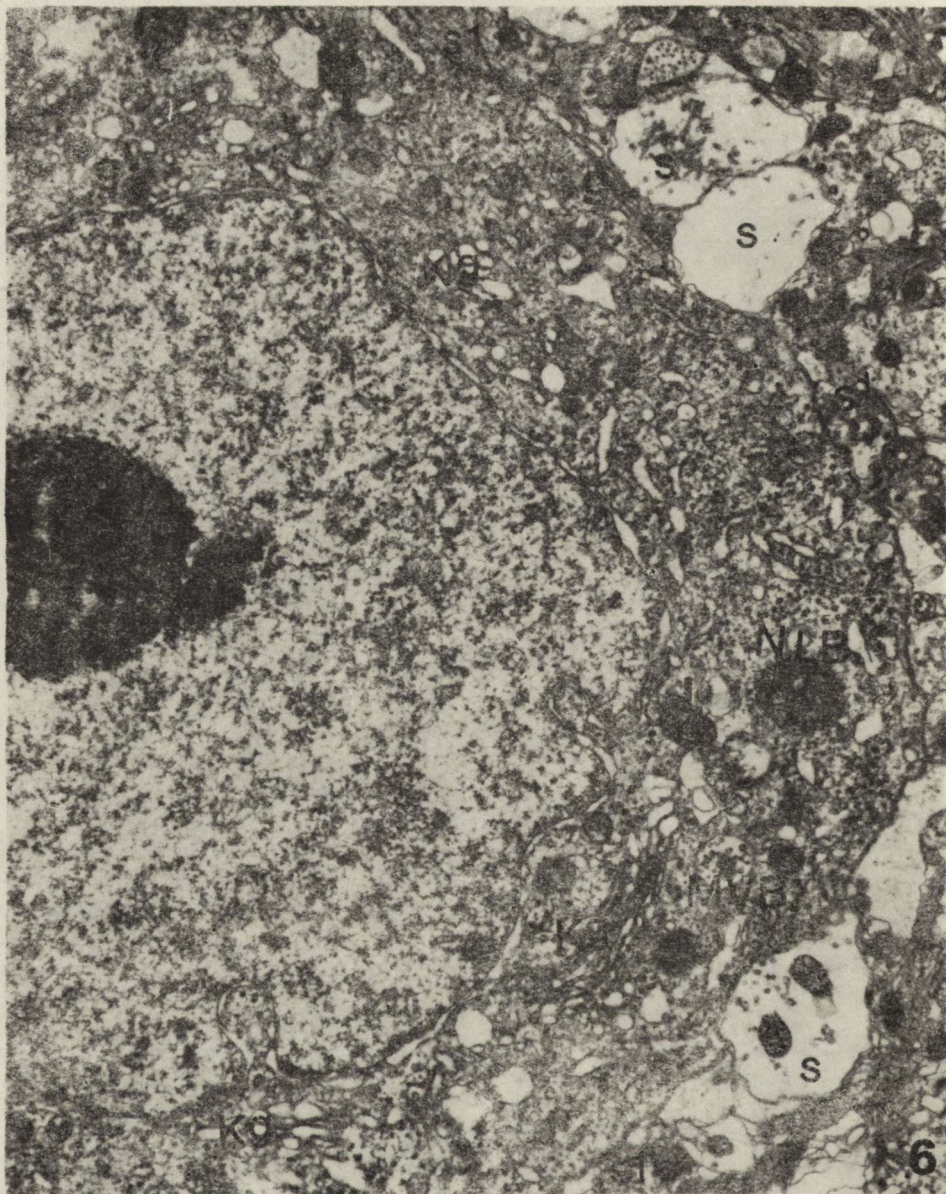
Ryc. 4. I grupa doświadczalna. Jądro nadwzrokowe. Fragmenty dwóch neuronów: typu II (NII) i typu III (NIII). W neuronie typu III o obkurczonej cytoplazmie widoczne jądro, obrzmiałe mitochondria, kompleks Golgiego, lizosomy i kanały RER. W pobliżu obrzmiałe synapsy (S) oraz znacznie obrzmiały astrocyt. Pow. 13 500 \times

Fig. 4. Experimental group I. Supraoptic nucleus. Fragment of two neurons: type II (NII) and type III (NIII). Neuron of type III with shrunken cell body and condensed cytoplasm; nucleus, RER, swollen mitochondria, Golgi complex and lysosomes are visible. An astrocytic cell and synapses are swollen. $\times 13\ 500$



Ryc. 5. I grupa doświadczalna. Jądro nadwzrokowe. Neuron typu III (NIII) ciemny, o skondensowanej cytoplazmie, otoczony obrzmiałymi wypustkami astrocytów. Obok fragment obrzmiałego astrocytu. Pow. 13 500 \times

Fig. 5. Experimental group I. Supraoptic nucleus. Neuron of type III (NIII) with condensed cytoplasm, surrounded by swollen astrocytic processes. Fragment of swollen astrocytic cell is visible. $\times 13\,500$



Ryc. 6. II grupa doświadczalna. Jądro przykomorowe. Komórka neurosekrecyjna o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej, z dużym jądrem komórkowym i elektronowo gęstym jąderkiem. W cytoplazmie bardzo dobrze rozwinięty kompleks Golgiego (Kg) i siateczka śródplazmatyczna szorstka (RER). Widoczne również ziarnistości neurosekrecyjne (g), neurotubule (T), lizosomy (L), ciała wielopęcherzykowe (MVB) oraz ciało jąderkopodobne (NLB). Na powierzchni neuronu liczne kontakty synaptyczne zmienione (S) i prawidłowe (S1). Pow. 13 500 \times

Fig. 6. Experimental group II. Paraventricular nucleus. Ultrastructurally normal neurosecretory cell with large nucleus and electron-dense nucleolus. Very well developed Golgi complex (Kg) and RER. In cytoplasm neurosecretory granules (g) neurotobules (T), lysosomes (L), multivesicular bodies (MVB) and nucleolus-like body (NLB) are visible. At the cell some many synapses abnormal (S) and unchanged (S1). \times 13 500

nowej. W cytoplazmie, również pomiędzy równolegle układającymi się kanałami RER, znajdowała się znaczna ilość polirybosomów, pojedyncze mitochondria, stosunkowo duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych oraz neurotubule (ryc. 2). Zwykle w pobliżu jądra komórkowego znajdował się dobrze rozwinięty, rozczłonowany kompleks Golgiego. W jego okolicy przede wszystkim gromadziły się obłonione ziarnistości neurosekrecyjne. Często spotykano ziarnistości neurosekrecyjne w zbiornikach kompleksu Golgiego. W sąsiedztwie kompleksu Golgiego spotykano także neurotubule, lizosomy i mitochondria. Wiele mitochondriów miało jasną macierz i skrócone lub fragmentaryczne grzebienie.

Drugi typ ultrastruktury neuronów występował rzadziej, a jego cechą charakterystyczną była obecność poszerzonych zbiorników kompleksu Golgiego i brak ziarnistości neurosekrecyjnych. Pozostałe organelle komórkowe, ich rozmieszczenie, ilość i budowa odpowiadały komórkom neurosekrecyjnym w materiale kontrolnym (ryc. 3, 4 i 5).

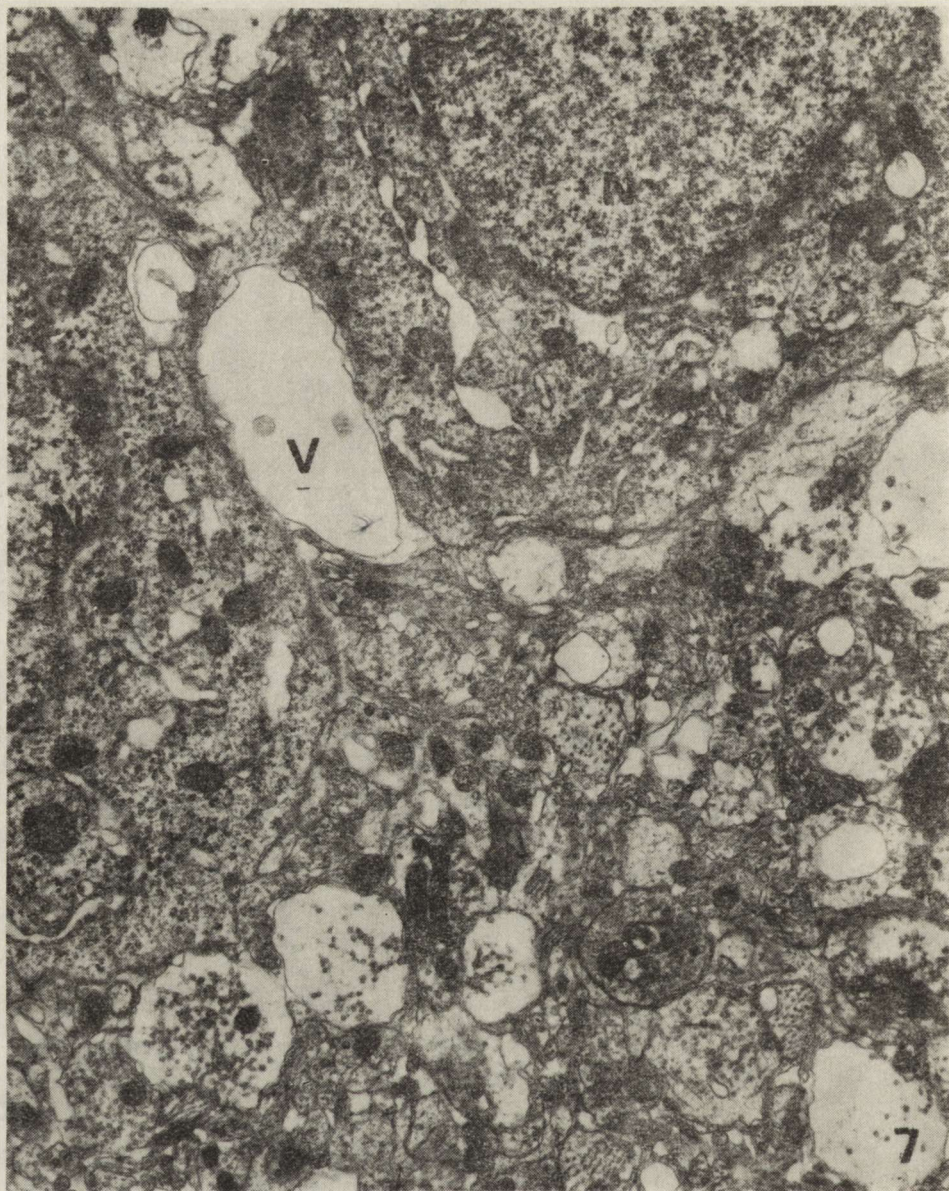
Trzeci typ ultrastruktury neuronów charakteryzował się różnym stopniem obkurczenia neuronów sekrecyjnych („neuronal shrinkage”). Neuronów te charakteryzowały się ciemną, zagęszczoną cytoplazmą. Ich jądra znacznie obkurczone miały liczne wręby. Karioplazma była równomiernie gęsta elektronowo.

Większość synaps znajdujących się w sąsiedztwie zmienionych neuronów sekrecyjnych wykazywała również duże zmiany, zwłaszcza w odcinku presynaptycznym (ryc. 1—5). Wiele synaps tworzących połączenia na perykarionach neuronów typu I, II i III miało bardzo obrzmiałe kolbki presynaptyczne z nielicznymi pęcherzykami synaptycznymi. Niekiedy pęcherzyki synaptyczne występowały w skupieniach. Wszystkie pęcherzyki były typu sferoidalnego z nienaruszoną błoną otaczającą. Sporadycznie obserwowano pęcherzyki z gęstym rdzeniem.

W tej grupie doświadczalnej astrocyty były w różnym stopniu obrzmiałe. Wypustki astrocytarne wokół zmienionych neuronów, a zwłaszcza w pobliżu neuronów typu III wykazywały znaczne obrzmienie i były prawie całkowicie pozbawione organelli.

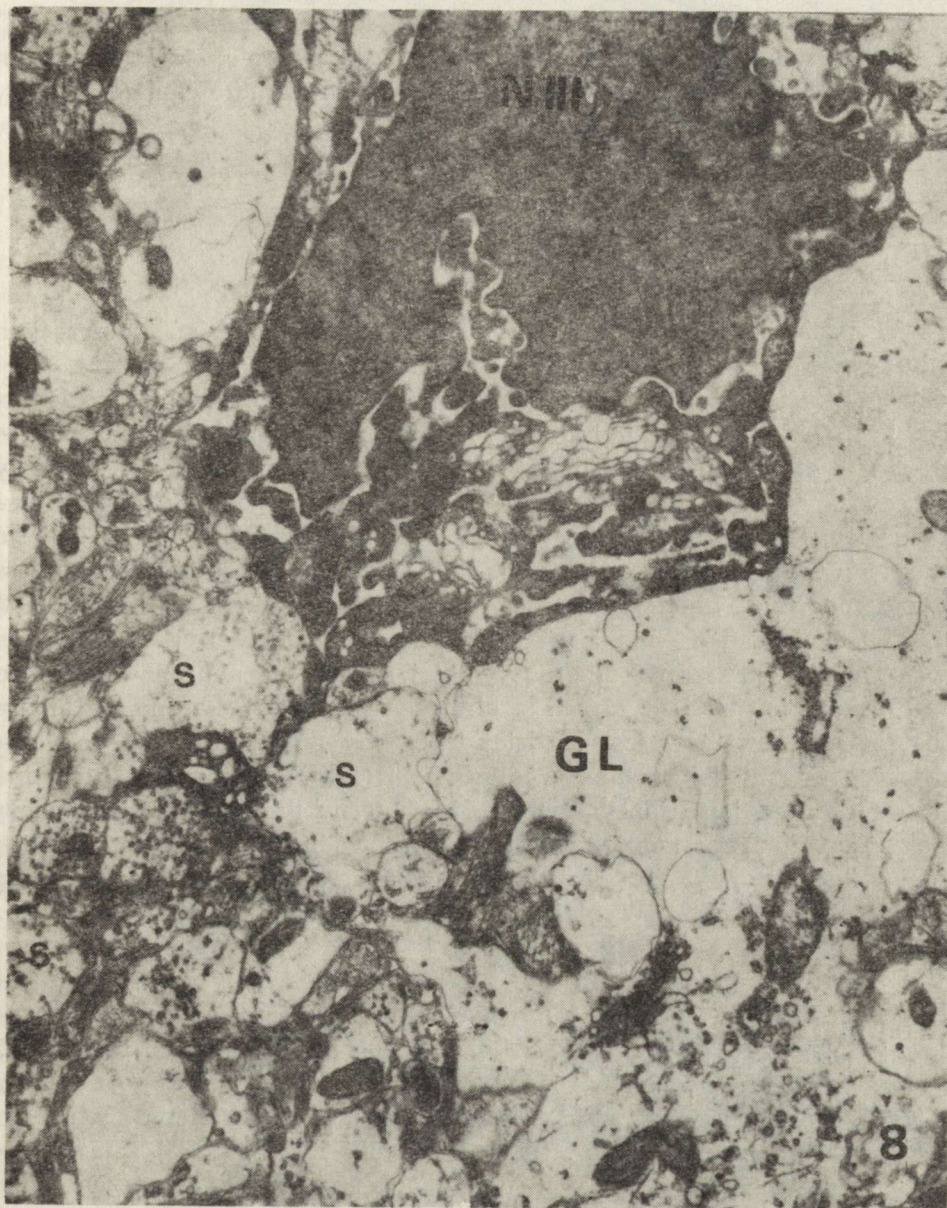
II grupa doświadczalna

Obserwacje jąder SO i PV były prowadzone w 3 dni po wykonaniu doświadczenia. Neurony obydwu badanych jąder wykazywały podobną reakcję. W większości były to neurony o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Charakterystyczną cechą neuronów sekrecyjnych był rozbudowany kompleks Golgiego cytoplazmy okołojądrowej. W strefie Golgiego widoczne były ziarnistości neurosekrecyjne, ciała wielopęcherzykowe, lizosomy i struktury włóknikowe cytoskeletonu. RER zajmowała pozostałe obszary cytoplazmy. Pomiedzy jej wąskimi kanałami równomiernie pokrytymi rybosomami znajdowała się znaczna ilość polirybosomów oraz mitochondria, niektóre z nich z cechami obrzmienia (ryc. 6 i 7).



Ryc. 7. II grupa doświadczalna. Jądro nadwzrokowe. Pomiedzy dwoma fragmentami komórek neurosekrecyjnych (N) widoczna obrznięta wypustka astrocytarna z wakuolą (V). W neuropilu znaczna ilość synaps z obrzniętą aksoplazmą. Pow. 13 650 ×

Fig. 7. Experimental group II. Supraoptic nucleus. Between two neurosecretory cells (N) a swollen astrocytic process with vacuole (V) is visible. In the neuropil a great number of synapses with swollen axoplasm. × 13 650



Ryc. 8. II grupa doświadczalna. Jądro przykomorowe. Obkurczony neuron typu III o znacznie zagęszczonej cytoplazmie, otoczony obrzniętymi wypustkami astrocytarnymi (GL) i synapsami (S) o obrzniętej aksoplazmie i pojedynczych pęcherzykach.
Pow. 13 650 ×

Fig. 8. Experimental group II. Paraventricular nucleus. A shrunken type III neuron surrounded by swollen astrocytic processes (GL) and synapses (S) with swollen axoplasm and small number of vesicles. × 13 650

Poza wyżej opisanymi komórkami w populacji komórek nerwowych SO i PV nie napotymano innych neuronów obserwowanych w I grupie doświadczalnej. Sporadycznie tylko zanotowano pojedyncze ciemne neurony ("dark neurons") zwykle otoczone obrzmiałymi wypustkami astrocytów (ryc. 8).

OMÓWIENIE

W piśmiennictwie jest stosunkowo niewiele doniesień dotyczących skutków krótkotrwałego całkowitego niedokrwienia mózgu szczura. Między innymi Pulsinelli i wsp. 1982 oraz Kirino i wsp. 1984, a także Petito i Pulsinelli 1984 opisali dość szczegółowo obumieranie neuronów w sektorze CA₁ hipokampa u szczurów. Mechanizm odpowiedzialny za powstawanie zmian patologicznych w neuronach podczas trwania niedokrwienia oraz w okresie recyrkulacji krwi, doprowadzający do śmierci neuronów, nie jest dotychczas w pełni wyjaśniony, istnieje natomiast wiele odnośnych hipotez. Diemer i Siemkowicz (1980) oraz Choki (1983) na podstawie badań elektrofizjologicznych i morfologicznych opisali zjawisko poniedokrwiennej hiperaktywności niektórych neuronów zarówno w hipokampie, jak i w innych strukturach mózgu. Wykazano, że hipermetabolizm neuronów jest bardziej wyrażony po krótkim niż po dłuższym okresie niedokrwienia. Według Siejö (1981) do komórek tych dopływa znaczna ilość jonów wapnia. Nadmierne gromadzenie się jonów Ca²⁺ w cytoplazmie komórek nerwowych powoduje hiperaktywność neuronów, która doprowadza do załamania ich metabolizmu (Meldrum 1981; Griffiths i wsp. 1982). Wyniki te są zgodne z badaniami Simona i wsp. (1984) prowadzonymi na szczurach, w których wykazano, że gromadzenie jonów wapnia występuje nie tylko w neuronach wybiórczo wrażliwych na niedokrwienie, ale także w wielu innych neuronach. Przypuszcza się także, że GABA może odgrywać ważną rolę w inhibicji neuronów. Hiperaktywność neuronów może spowodować wyczerpanie GABA. GABA-ergiczne neurony są bardzo wrażliwe na niedokrwienie (Johansen i wsp. 1983; Pulsinelli 1985). Ostatnio Suzuki i wsp. (1985) zaproponowali mechanizm odpowiedzialny za powstawanie poniedokrwiennej zmian doprowadzających do nieodwracalnego uszkodzenia neuronów. Stosownie do wysuniętej przez nich hipotezy niedokrwienie powodowałoby zwiększony przepływ jonów wapnia do wybiórczo wrażliwych neuronów, natomiast recyrkulacja krwi powodowałaby odwrócenie tego procesu. Po krótkim okresie regeneracji, w czasie którego następuje prawdopodobnie wyczerpanie się GABA, dochodzi do ponownego wnikania jonów Ca²⁺ do neuronów, co powoduje ich hiperaktywację i masywne gromadzenie się jonów wapnia w mitochondriach. Być może gromadzący się w cytoplazmie i w mitochondriach wapń stymuluje je do wzmożonej produkcji

ATP doprowadzając do ich niewydolności (Nichols 1985) i w ostatecznym efekcie do dezintegracji neuronów.

W trakcie niedokrwienia i w okresie poniedokrwiennym występuje zaburzenie homeostazy wodno-elektrolitowej, powodując wzrost osmolalności tkanki (Hossmann, Takagi 1976; Bandaranayake i wsp. 1978) zahamowanie pompy jonowej odpowiedzialnej za procesy energetyczne (Astrup 1982) i zmiany w przepuszczalności błon. Są to również jedne z istotnych czynników odpowiedzialnych za pojawianie się obrzęku mózgu.

Badany przez nas obszar podwzgórza, a mianowicie jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe, syntetyzuje wazopresynę, hormon antydiuretyczny związany z regulacją gospodarki wodno-mineralnej, oprócz oksytocyny i wielu jeszcze neuropeptydów. Morfologiczne obserwacje wykazały wrażliwość neuronów SO i PV na 2,5 minutowe niedokrwienie mózgu szczura. Bezpośrednio po recyrkulacji krwi w badanych jądrach neurosekrecyjnych można było wyróżnić opisane przez nas uprzednio trzy typy zmian neuronalnych. Pierwszy typ zmian, najczęściej obserwowany, odpowiadał neuronom hiperaktywnym (obfita RER i aparat Golgiego, duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych). Neurony ciemne (dark neurons) obserwowano w tej grupie sporadycznie. W trzy dni po wykonaniu doświadczenia ultrastruktura większości neuronów sekrecyjnych nie różniła się od kontroli, zmiany były odwracalne. Natomiast obecne były stosunkowo liczne neurony ciemne. Można przeto sądzić, że wśród populacji neuronów o cechach hiperaktywności, występujących w I grupie doświadczalnej, znajdują się komórki ulegające nieodwracalnemu uszkodzeniu, co manifestuje się obecnością neuronów ciemnych.

Bezpośrednio po krótkotrwałym niedokrwieniu wiele wypustek astrocytarnych znajdujących się w pobliżu perykarionów komórek neurosekrecyjnych oraz naczyń krwionośnych wykazywało nieznaczne obrzmienie. W miarę upływu czasu po przebytych niedokrwieniu (3 dni) zmiany te miały tendencję do nasilania się. Nieprawidłowości w obrazie ultrastrukturalnym synaps, polegające na obrzmieniu odcinków presynaptycznych i zanikaniu lub koncentracji pęcherzyków synaptycznych, były obserwowane zarówno bezpośrednio, jak i w 3 dni po recyrkulacji krwi z równą częstotliwością.

Wyniki przedstawionych badań wskazują, że krótkotrwałe niedokrwienie mózgowia wywołuje zmiany w neuronach SO i PV podwzgórza szczura. Obrazy ultrastrukturalne neuronów sekrecyjnych podlegają pewnemu zróżnicowaniu i można je podzielić na trzy typy. Zmiany te mają na ogół charakter czynnościowy, bowiem po trzech dniach znaczna większość neuronów nie różni się swym obrazem ultrastrukturalnym od komórek neurosekrecyjnych grupy kontrolnej. Nie mniej jednak pozostaje pewna liczba komórek, które uległy nekrobiozie. Doszło do niej zapewne w okresie perfuzji.

EFFECT OF SHORT-TERM CEREBRAL ISCHEMIA
ON THE SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR
HYPOTHALAMIC NUCLEI OF THE RAT

Summary

The neurons of supraoptic (SO) and paraventricular (PV) nuclei of rats exposed to relatively short (2.5 min) complete cerebral ischemia by cardiac arrest were studied.

Immediately after blood recirculation three basic types of neuronal changes were found within the neuronal population of SO and PV nuclei. Type I of neuronal response was most frequent and consisted of RER hypertrophy and abundance of neurosecretory granules, and indicated cells hyperactivity. Type II changes represented neurons with some swollen mitochondria and dilated Golgi saccules, only. Type III neurons displayed varying degree of neuronal shrinkage. Three days after resuscitation majority of the SO and PV neurons was ultrastructurally normal, however, there were some cells which underwent necrobiosis, probably in the period of reperfusion.

In the SO and PV region many astrocytic processes were swollen and large part of synapses with swollen axoplasm was devoid of synaptic vesicles or had not numerous clumped synaptic vesicles. These changes were observed directly after experiment as well as 3 days after resuscitation.

ВЛИЯНИЕ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ПОЛНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА НА
N. SUPRAOPTICUS И N. PARAVENTICULARIS
ГИПОТАЛАМУСА КРЫСЫ

Резюме

Исследовалась ультраструктура нейронов n. supraopticus (SO) и n. paraventricularis (PV) у крыс с полной ишемией мозга в течение 2,5 минут клинической смерти, вызванной по методу Корпачева и соавторов (1982).

Сразу же после рециркуляции в популяции исследуемых нейронов обнаружены 3 типа изменений. Первый тип, появляющийся наиболее часто, с гипертрофией шероховатого эндоплазматического ретикулум и обильем невросекреторных гранул, свидетельствовал о увеличенной активности невросекреторных нейронов. Второй тип изменений проявлялся набуханием митохондрий и расширенными цистернами комплекса Golgi. К третьему типу поврежденных относились „темные” нейроны, в разной степени уменьшенные. Три дня после реанимации большинство нейронов SO и PV было нормальное. Однако осталось определенное количество некробиотических клеток, вероятно с периода реперфузии.

В обоих экспериментальных группах в ядрах SO и PV наблюдалось набухание многочисленных астроцитов и также синапсов полностью или почти полностью лишенных синаптических пузырьков.

PIŚMIENNICTWO

1. Astrup J.: Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J. Neurosurg.*, 1982, 56, 482—497.
2. Bandaranayake N. M., Nemoto E. M., Stezoski S. W.: Rat brain osmolality during barbiturate anaesthesia and global brain ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 249—254.

3. Brierley J. B.: *W Greenfield's neuropathology*. Red. W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. E. Arnold, London, 1976, 41—85.
4. Choki J., Greenberg J., Reivich M.: Regional cerebral glucose metabolism during and after bilateral cerebral ischemia in the gerbil. *Stroke*, 1983, 14, 568—574.
5. Diemer H. N., Siemkowicz E.: Increased 2-deoxyglucose uptake in hippocampus, globus pallidus and substantia nigra after cerebral ischemia. *Acta Neurol. Scand.*, 1980, 61, 56—63.
6. Griffiths T., Evans M. C., Meldrum B. S.: Intracellular sites of early calcium accumulation in the rat hippocampus during status epilepticus. *Neurosci. Lett.*, 1982, 30, 329—334.
7. Hekmatpanah F. F., Hekmatpanah C. R.: Microvascular alteration in cerebral contusion and correlation with neural damage. E. Riesch Symposium: Brain microcirculation pathology, diagnosis, therapy. Berlin Zach., 2-5 September, 1986. Abstract.
8. Hossman K. A., Takagi S.: Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 1976, 51, 124—131.
9. Ito U., Spatz M., Walker J. E., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1975, 320, 209—223.
10. Johansen F. F., Jorgensen M. B., Diemer H. N.: Resistance of hippocampal CA₁ interneurons to 20-min of transient cerebral ischemia in the rat. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983, 61, 135—140.
11. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, 1982, 239, 57—69.
12. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia — reversible and irreversible type ischemic cell damage. *Progr. Brain Res.*, 1985, 63, 39—58.
13. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1984, 64, 739—747.
14. Korpaczew W. G., Łysenkow S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie klinicznej śmierci i postreanimacyjnej choroby u krysa. *Patol. Fizjef. Exp. Terapia*, 1982, 3, 78—80.
15. Meldrum B. S.: Metabolic effects of prolonged epileptic seizures and causation of epileptic brain damage. W: *Metabolic disorders of the nervous system*. Red. F. C. Rose, Pitmann, London, 1981, 175—187.
16. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287—301.
17. 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.
18. Nicholls D. G.: A role for the mitochondrion in the protection of cells against calcium overload. *Progr. Brain Res.*, 1985, 63, 97—106.
19. Petit C. K., Pulsinelli W. A.: Delayed neuronal recovery and neuronal death in the rat hippocampus following severe cerebral ischemia: possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 194—208.
20. Pulsinelli W. A.: Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Progr. Brain Res.*, 1985, 63, 29—37.
21. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10, 267—272.

22. Pulsinelli W. A., Levy D. E., Duffy T. E.: Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient ischemia. *Ann. Neurol.*, 1982, 11, 499—509.
23. Siesjö B. K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1981, 1, 155—185.
24. Simon R. P., Griffiths T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: an electron microscopy study in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1984, 4, 350—361.
25. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba Y., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Progr. Brain Res.*, 1985, 63, 59—68.
26. Wieloch T.: Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. *Progr. Brain Res.*, 1985, 63, 69—85.
27. Yamaguchi T., Wagner H. G., Klatzo I.: Observations on the post-ischemic parhophysiology in the gerbil brain including K^+ and Ca^+ changes. W: *Proc. of NATO Advised Research Workshop on Mechanism of Secondary Brain Damage*. Plenum Press, New York, 1986 (w druku).

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

ANDRZEJ LOESCH

AKSONY SEKRECYJNE PRZYSADKI NERWOWEJ SZCZURA
PO REANIMACJI W ZWIĄZKU Z INCYDENTEM
ŚMIERCI KLINICZNEJ

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

Prawidłowa czynność aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej ssaków jest związana z przechowywaniem i wydzielaniem do krwi kilku biologicznie aktywnych peptydów, w tym przede wszystkim wazopresyny i oksytocyny. Oba te hormony występują w wewnątrzaksonalnych organellach zwanych pęcherzykami sekrecyjnymi lub ziarnistościami neurosekrecyjnymi (NSG) o średnicy 0,1—0,3 μm ; NSG są zarazem najbardziej charakterystycznymi organellami aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej. Należy tutaj wspomnieć, że wazopresyna i oksytocyna są syntetyzowane w odrębnych neurocytach jądra nadwzrokowego i jądra przykomórkowego podwzgórza, skąd oba te hormony są następnie transportowane (głównie w postaci NSG) do przysadki nerwowej odrębnymi aksonami sekrecyjnymi (Swaab i wsp. 1975; Vandesande, Dierickx 1975, 1976). Zatem w zjawisku syntezy, transportu i wydzielania do krwi obu wspomnianych hormonów przysadki nerwowej uczestniczą dwie populacje wyżej wymienionych neuronów sekrecyjnych; neurony te stanowią tak pod względem anatomicznym, jak i fizjologicznym istotę neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego.

Ze względu na to, że czynność aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej ssaków jest związana z zabezpieczaniem prawidłowego przebiegu podstawowych procesów fizjologicznych organizmu (np. utrzymywanie homeostazy wodno-elektrolitowej), patologicznie lub doświadczalnie wywołane zmiany w aksonach, o których mowa, mogą wtórnie prowadzić do poważnych zaburzeń czynnościowych organizmu o zasięgu ogólnoustrojowym.

Przedmiotem obecnej pracy jest próba scharakteryzowania ultrastrukturalnej organizacji aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej szczurów, które przeżyły incydent śmierci klinicznej spowodowany doświad-

czalnym zatrzymaniem akcji serca i czynności oddechowej; zgodnie z poziomem współczesnej wiedzy biologiczno-medycznej taki incydent powinien wywołać m.in. zjawisko niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Zagadnienie incydentu śmierci klinicznej związanej z niedokrwieniem i ultrastruktura aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej szczura stanowią zatem przedmiot niniejszej pracy.

Pomimo bogatej literatury na temat niedokrwienych i poniedokrwienych zmian ultrastrukturalnych w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego u różnych przedstawicieli ssaków poddawanych rozmaitym eksperymentom, dane dotyczące organizacji neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego (w skład którego wchodzi i sprawują czynność wykonawczą aksony sekrecyjne przysadki nerwowej) nie są wystarczające. Tylko w jednej pracy opisano ultrastrukturalną organizację tego układu neurosekrecyjnego u chomika mongolskiego, u którego wywoływano 10-minutowe niedokrwienie mózgowia poprzez podwiązanie tętnic wspólnych szyjnych (Loesch 1983a, b).

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 12 szczurach szczepu Wistar, samcach o masie ciała 160—180 g, pochodzących z normalnych warunków hodowlanych. U 10 szczurów sprowokowano śmierć kliniczną według metody Korpaczewa i wsp. (1982). W skrócie, metoda ta polega na wprowadzeniu w narkozie eterowej do klatki piersiowej po prawej stronie mostka zwierzęcia haczykowato wyprofilowanej igły i następnie na uciśnięciu tą igłą pęczka naczyniowego serca. Zabieg taki nie pociąga za sobą konieczności otwarcia klatki piersiowej, wymaga jedynie wykonania około 1—2 cm długości nacięcia skóry wzdłuż mostka. W obecnej pracy ucisk na pęczek naczyniowy serca trwał 2,5 min w każdym przypadku. Prowadził on do ustania akcji serca, zatrzymania krążenia krwi i zaniku czynności oddechowej. Według Mossakowskiego i wsp. (1986) już po kilkunastu sekundach od chwili ustania akcji serca i czynności oddechowej dochodzi w tych warunkach doświadczalnych do śmierci klinicznej szczura, co objawia się zanikiem czynności bioelektrycznej mózgu. Po 2,5 min zwalniano ucisk, wyjmowano igłę, a następnie stosowano krótkotrwały zewnętrzny masaż serca poprzez kilkakrotne uderzenie palcem w klatkę piersiową zwierzęcia. Wszystkie te czynności prowadziły do niemal natychmiastowego przywrócenia akcji serca oraz czynności oddechowej. Należy tutaj wspomnieć, iż w omawianym modelu doświadczalnym okres 2,5 min był krytycznym dla utrzymania zwierząt przy życiu po reanimacji. Zastosowanie tego samego ucisku igłowego przez okres 3 min uniemożliwiało w omawianych warunkach doświadczalnych przywrócenie akcji serca i czynności oddechowej, co w konsekwencji prowadziło do śmierci zwierząt. Organizację ultrastrukturalną aksonów sekrecyjnych

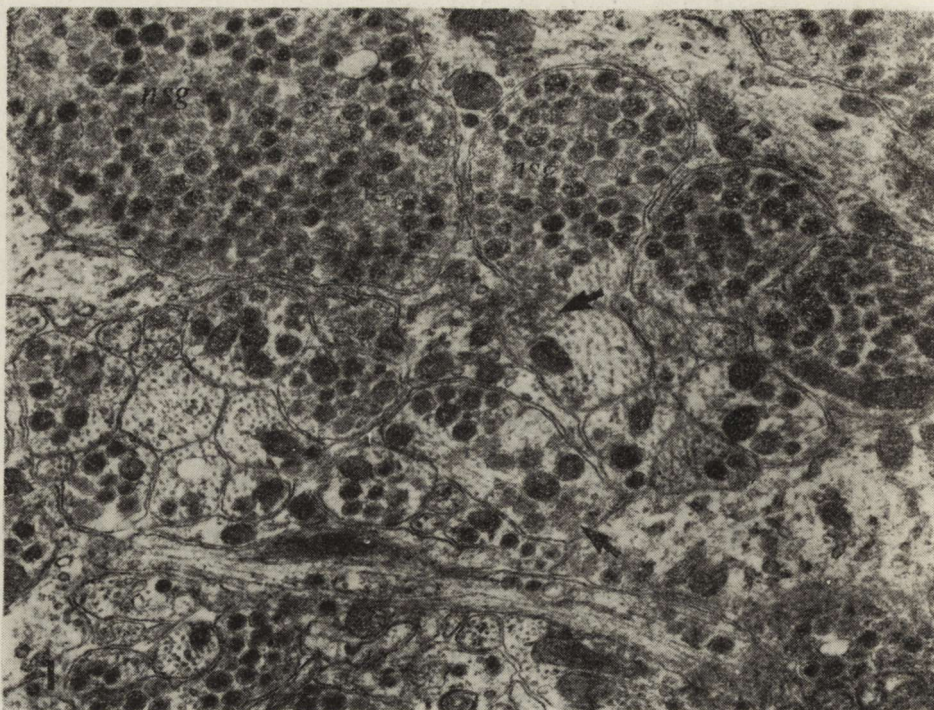
przysadki nerwowej szczurów badano: a) bezpośrednio po reanimacji w chwili pojawienia się akcji serca i czynności oddechowej (5 zwierząt), i b) 3 dni po reanimacji (5 zwierząt); w tym przypadku, po wykonanym doświadczeniu, zaszywano nacięcie skóry na klatce piersiowej zwierzęcia. Kontrolę obecnych badań stanowiły 2 szczury, które nie były poddane żadnym zabiegom. We wszystkich przypadkach, przysadkę nerwową szczurów pobierano po ich dekapitacji i utrwalano w 2,5% aldehydzie glutarowym, dotrwalano 1% czterotlenkiem osmu, odwadniano w alkoholu etylowym i zatapiano w Eponie. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu, a następnie badano je i fotografowano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

WYNIKI

Szczury kontrolne. Prawidłowa organizacja ultrastrukturalna aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej szczura została podana już ponad 20 lat temu (Palay 1955, 1957). Dlatego też dokumentacja dotycząca prawidłowej organizacji aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej szczura kontrolnego została w obecnej pracy ograniczona do niezbędnego minimum. Zatem, spośród 240 obserwowanych profili aksonów pochodzących z różnych obszarów przysadki nerwowej, zdecydowana większość (ok. 82%) charakteryzowała się obfitą zawartością NSG; profile te również wykazywały obecność mikropęcherzyków i mitochondriów (ryc. 1). Pozostałe profile posiadały przede wszystkim mikrotubule.

Szczury badane bezpośrednio po przebytych incydencie śmierci klinicznej. Podobnie jak u zwierząt kontrolnych większość obserwowanych profili aksonów sekrecyjnych (698 profili objęto badaniami) zawierała liczne NSG (ryc. 2). Jednak w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi profile te występowały w przysadce w mniejszej proporcji (ok. 76%). Pozostałe aksony, występujące w mniejszości, wykazywały cechy ultrastrukturalne nie notowane u zwierząt kontrolnych. Obserwowano mianowicie profile aksonów, w których dominowały mikropęcherzyki, obrzmiałe mitochondria, wakuole, polimorficzne pęcherzyki lub tubularne struktury gładkiej siateczki aksoplazmatycznej (ryc. 3). Niektóre aksony, a szczególnie ich zakończenia przylegające do ścian naczyń krwionośnych, wykazywały wyraźne cechy obrzęku i charakteryzowały się elektronowo-przezierną aksoplazmą oraz ubogością NSG (ryc. 4, 5). Cechą charakterystyczną wszystkich omawianych aksonów sekrecyjnych była obecność obrzmiałych mitochondriów.

Obok zmian aksonalnych obserwowano również zmiany naczyniowe w postaci obrzęku okołonaczyniowego pokładu warstwy śródmiąższowej oraz wewnątrznaczyniowej obecności leukocytów (ryc. 4, 5, 6).



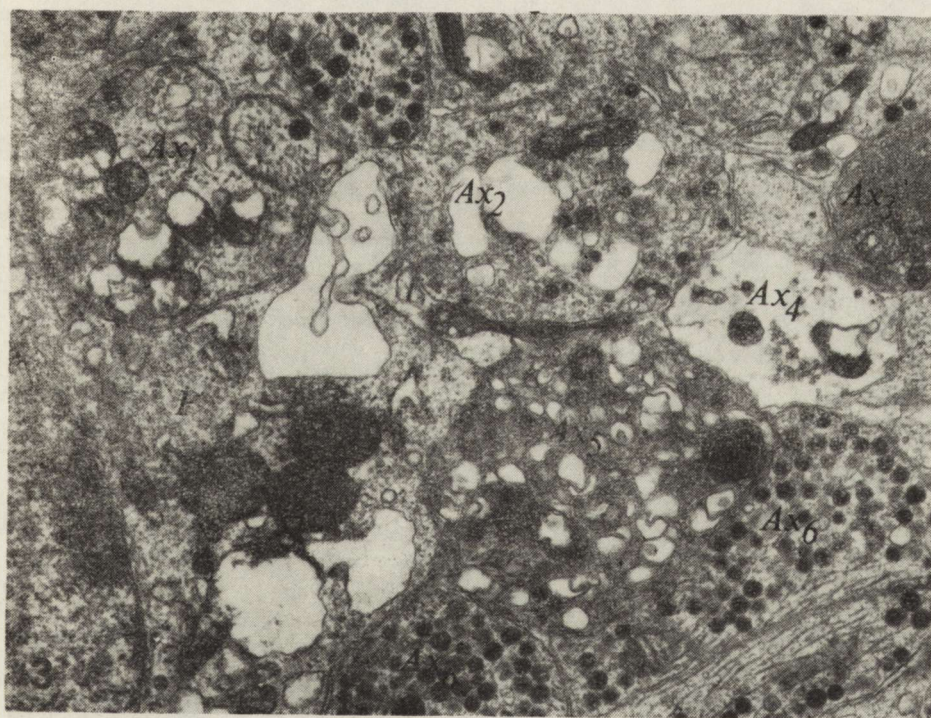
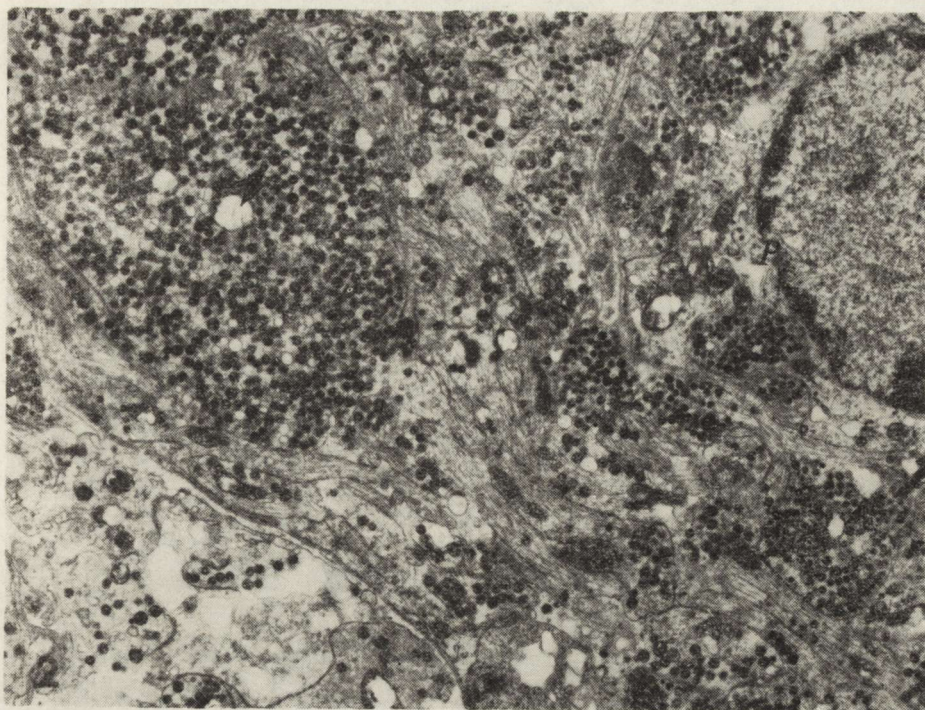
Ryc. 1. Szczur kontrolny. Aksony obfitujące w ziarnistości neurosekrecyjne (nsg); widoczne są również mikropęcherzyki (strzałki) i neurotubule. Pow. 15 000 ×
Fig. 1. Control rat. Axon profiles contain numerous neurosecretory granules (nsg); neurotubules and microvesicles (arrows) can also be seen. × 15 000

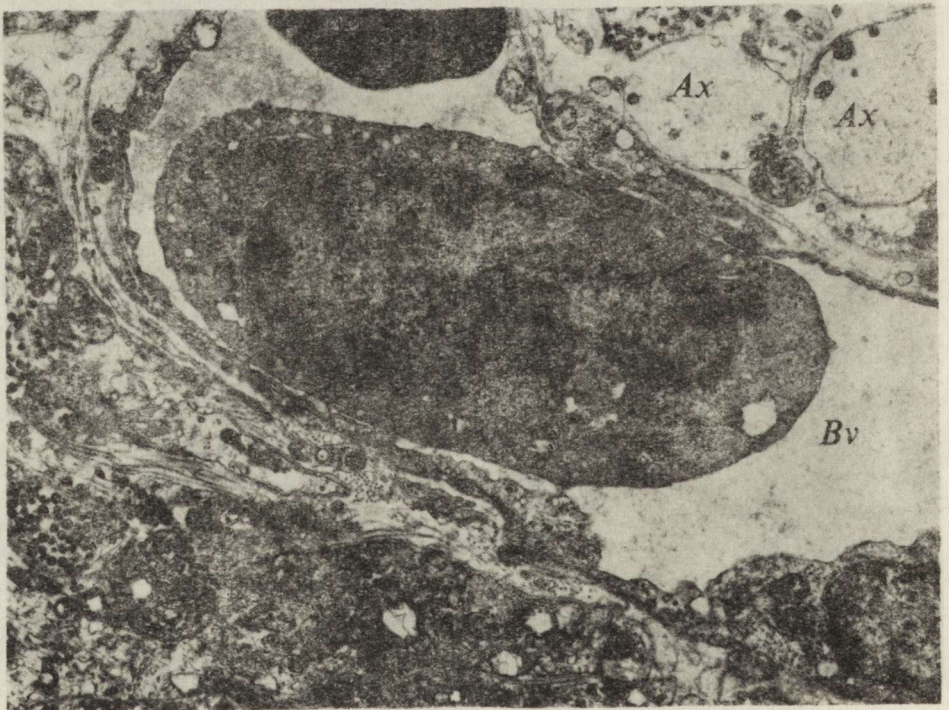
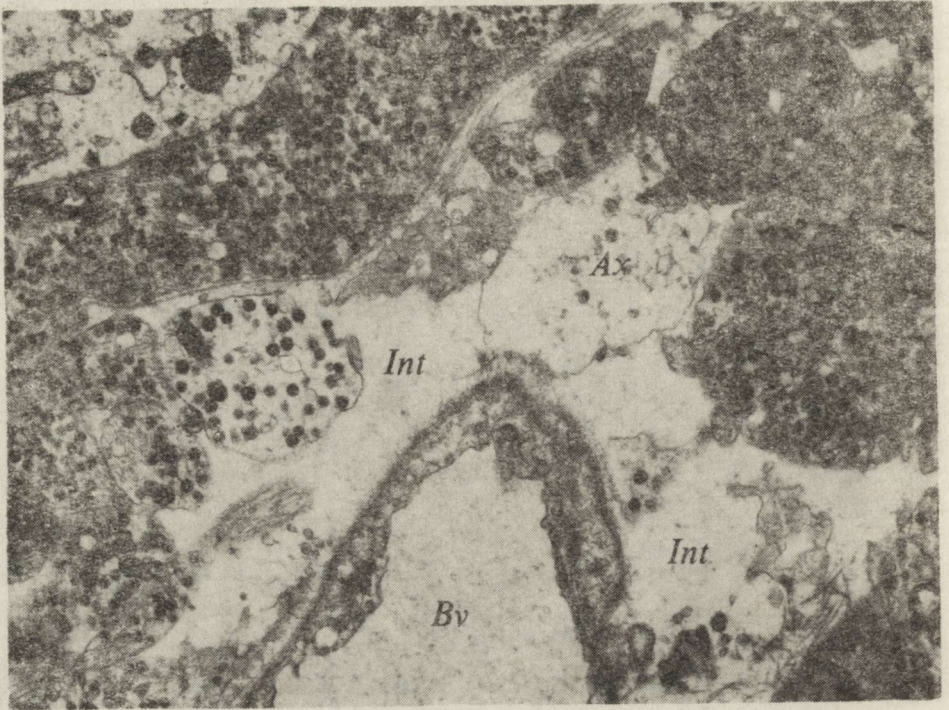
Ryc. 2. Szczur bezpośrednio po reanimacji. Większość profili aksonów zawiera liczne ziarnistości neurosekrecyjne. Widoczne są obrzmiałe mitochondria (strzałki). P — pituicyt. Pow. 7 000 ×

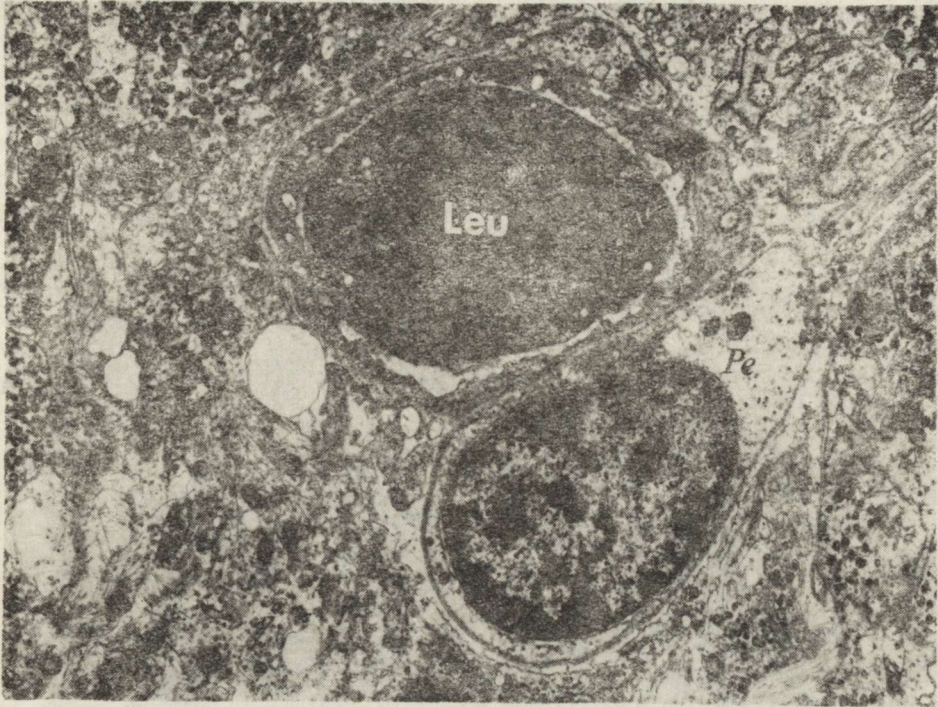
Fig. 2. Rat directly after resuscitation. Most of the axon profiles display numerous neurosecretory granules. Note swollen mitochondria (arrows). P — pituicyte, × 7 000

Ryc. 3. Szczur bezpośrednio po reanimacji. Zróżnicowanie ultrastrukturalne profili aksonów (Ax₁—Ax₆). Obrzmiałe mitochondria w Ax₁, wakuole w Ax₂, obfitość mikropęcherzyków w Ax₃, skąpa ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w Ax₄, pleomorficzne pęcherzyki, proliferująca gładka siateczka aksoplazmatyczna i figura mielinowa w Ax₅, liczne ziarnistości neurosekrecyjne w Ax₆. P — pituicyt. Pow. 12 000 ×

Fig. 3. Rat directly after resuscitation. Diverse ultrastructural pictures of the axon profiles (Ax₁—Ax₆). Swollen mitochondria in Ax₁, some vacuoles in Ax₂, abundance of microvesicles in Ax₃, scarcity of neurosecretory granules in Ax₄, pleomorphic vesicles, proliferation of axoplasmic reticulum and one myelin figure in Ax₅, numerous neurosecretory granules in Ax₆. P — pituicyte. × 12 000







Ryc. 6. Szczur bezpośrednio po reanimacji. W świetle naczynia widoczny leukocyt (Leu). Pe — pericyt. Pow. 4000 ×

Fig. 6. Rat directly after resuscitation. Note the presence of leukocyte (Leu) in the blood vessel lumen. Pe — pericyte. × 4000

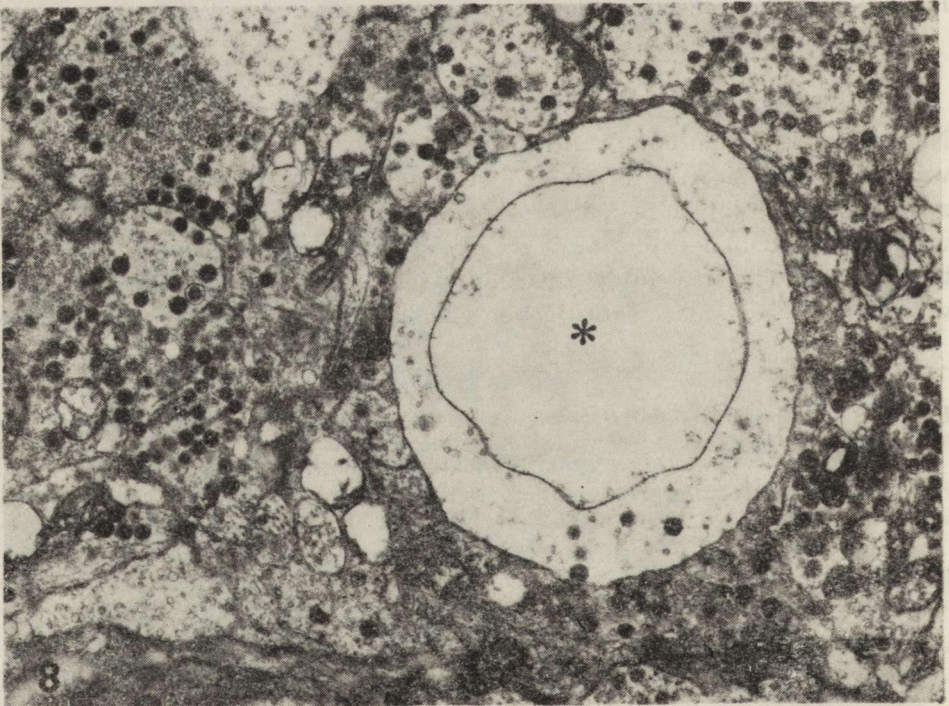
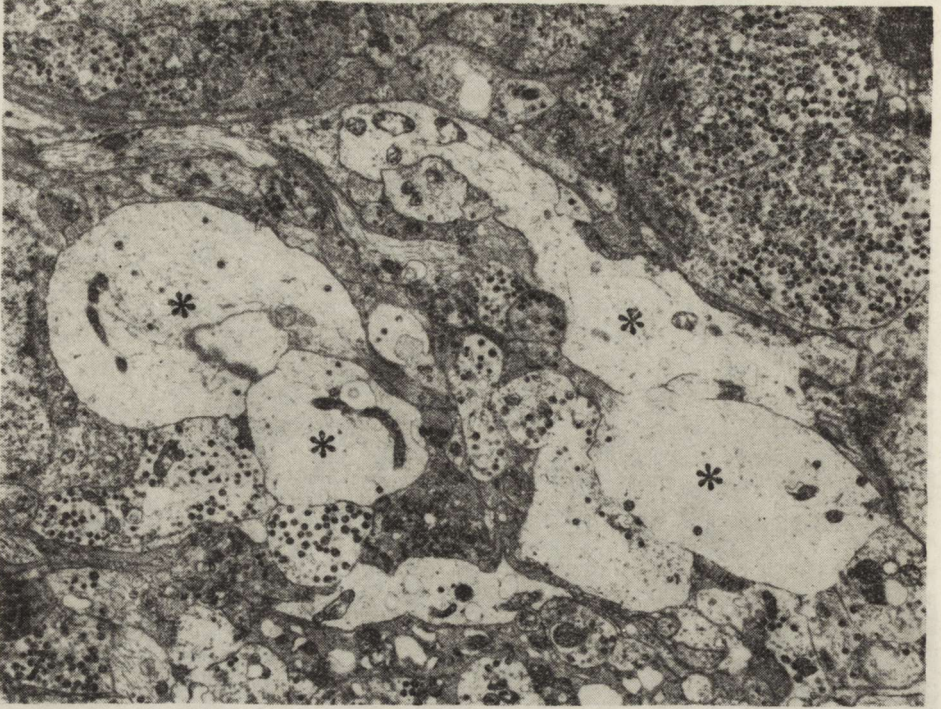
Szczury badane 3 dni po przebytych incydencie śmierci klinicznej. Na podstawie badań 664 profili aksonów przysadki nerwowej zaobserwowano nasilenie się niektórych zmian w porównaniu z poprzednią grupą zwierząt. Niemniej jednak, ilość aksonów obfitujących w NSG utrzymywała się na podobnym poziomie (ok. 74%), co w grupie poprzedniej. Natomiast pojawiło się tutaj znacznie więcej profili (ok. 11%) ubogich w NSG lub nawet nie wykazujących obecności tych organelli cytoplazma-

Ryc. 4. Szczur bezpośrednio po reanimacji. Okołonaczyniowy obrzęk warstwy śródmiąższowej (Int). Widoczne również obrzmiałe zakończenie aksonalne (Ax). Bv — światło naczynia krwionośnego. Pow. 7000 ×

Fig. 4. Rat directly after resuscitation. Note swelling of perivascular interstitium (Int). A swollen axon terminal (Ax) is also seen. Bv — lumen of blood vessel. × 7000

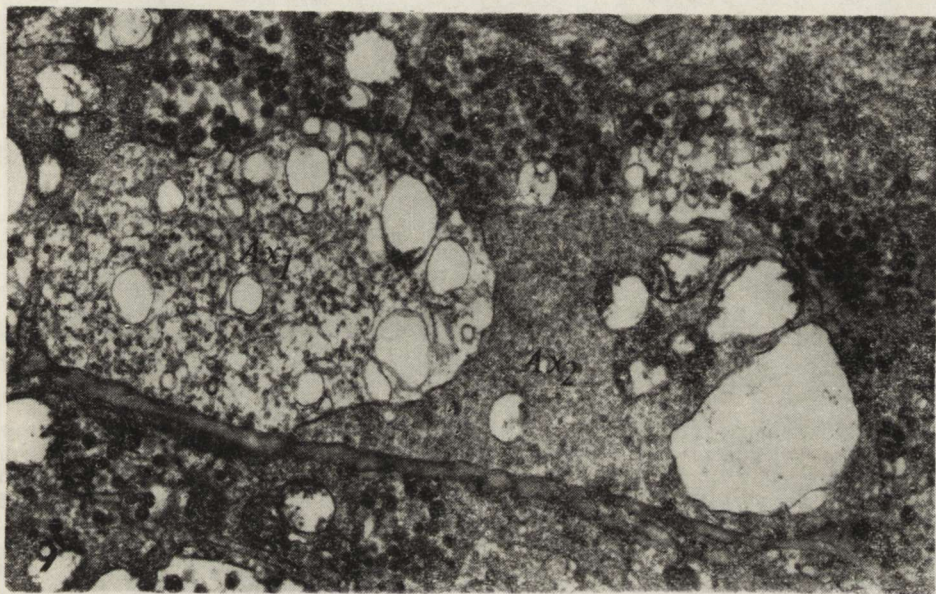
Ryc. 5. Szczur bezpośrednio po reanimacji. Dwa obrzmiałe zakończenia aksonalne (Ax) przylegają do ściany naczynia krwionośnego (Bv). W naczyniu widoczny jest leukocyt. Pow. 5000 ×

Fig. 5. Rat directly after resuscitation. Two swollen axon terminals (Ax) are close to the blood vessel (Bv). Note the presence of leukocyte in the vessel lumen. × 5000



tycznych (ryc. 7, 8). Pozostałe profile aksonów, obserwowane w różnych obszarach przysadki nerwowej, charakteryzowały się obfitością mikropęcherzyków i obrzmiałych mitochondriów, proliferującej gładkiej siateczki aksoplazmatycznej lub obecnością wakuol (ryc. 8, 9, 10). Powyższe zmiany były zatem podobne do uprzednio opisanych, z tą tylko różnicą, że obejmowały one nieco większą niż bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej, grupę aksonów.

Przysadka nerwowa szczurów 3 dni po przebytych incydencie śmierci klinicznej charakteryzowała się również zmianami okołonaczyniowymi. W tym przypadku zmiany te wyrażały się obfitą obecnością drobnowłóknikowego materiału w pokładzie warstwy śródmiaższowej niektórych naczyń krwionośnych (ryc. 10).



Ryc. 9. Szczur z 3-dniowym przeżyciem po przebytej śmierci klinicznej. W aksonie Ax₁ tubularna formacja gładkiej siateczki aksoplazmatycznej, widoczne również wakuole. W aksonie Ax₂ widoczne mikropęcherzyki, obrzmiałe mitochondria i duża wakuola. Pow. 10 000 ×

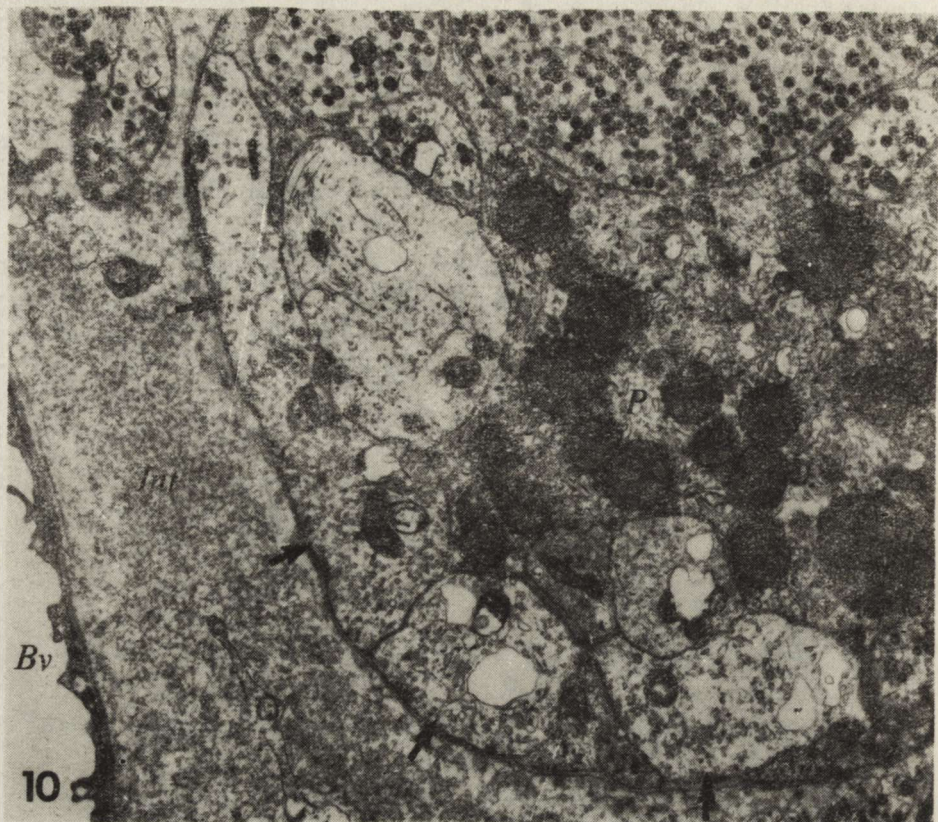
Fig. 9. Rat, 3 days survival after resuscitation. In Ax₁ axon microtubules and some vacuoles, in Ax₂ axon abundance of microvesicles, swollen mitochondria and one vacuole. × 10 000

Ryc. 7. Szczur z 3-dniowym przeżyciem po przebytej śmierci klinicznej. Widoczne obrzmiałe aksony, ubogie w ziarnistości neurosekrecyjne (gwiazdki). Pow. 4000 ×

Fig. 7. Rat, 3 days survival to clinical death. Swollen axon profiles (asterisks) with scarce neurosecretory granules. × 4 000

Ryc. 8. Szczur z 3-dniowym przeżyciem po przebytej śmierci klinicznej. W profilu obrzmiałego aksonu widoczna znacznych rozmiarów wakuola (gwiazdka). Profil ten zawiera tylko kilka ziarnistości neurosekrecyjnych. Pow. 11 000 ×

Fig. 8. Rat, 3 days survival to clinical death. Swollen axon profile exhibits vacuole (asterisk). In the axon profile only few neurosecretory granules are seen. × 11 000



Ryc. 10. Szczur z 3-dniowym przeżyciem po przebytej śmierci klinicznej. Aksony (strzałki) przylegające do ściany naczynia krwionośnego (Bv) są ubogie w ziarnistości neurosekrecyjne, natomiast posiadają mikropecherzyki, obrzmiałe mitochondria lub wakuole. W warstwie śródmiąższowej (Int) obfitość drobnowłóknienkowego materiału. P — pituicyt. Pow. 7 000 ×

Fig. 10. Rat, 3 days survival after resuscitation. The axon profiles (arrows) lying at the perivascular area are free of neurosecretory granules and display the presence of microvesicles, swollen mitochondria or some vacuoles. In the interstitium (Int) fine fibrillar material. Bv — blood vessel, P — pituicyte. × 7 000

OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują na powstawanie zmian ultrastrukturalnych w aksonach sekrecyjnych przysadki nerwowej szczura po przeżytym incydencie śmierci klinicznej wywołanej całkowitym zatrzymaniem akcji serca, krążenia krwi i czynności oddechowej. Zmiany zaobserwowano zarówno bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej (bezpośrednio po dokonanej reanimacji), jak też 3 dni po tym incydencie. Wyniki obecnej pracy umożliwiają zatem postawienie kilku istotnych pytań dotyczących zachowania się neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego w warunkach śmierci klinicznej (umownie

zwanej tutaj niedokrwieniem) oraz w okresie poreanimacyjnym (umownie zwanym tutaj poniedokrwiennym), a mianowicie:

1) czy zaobserwowane zmiany aksonalne są wyrazem bezpośredniej reakcji układu neurosekrecyjnego na zatrzymanie krążenia krwi, czy też odzwierciedlają one pewne ogólne procesy fizjologiczne charakterystyczne dla niedokrwionego ośrodkowego układu nerwowego?

2) jeżeli zmiany aksonalne występują również po pewnym okresie czasu od incydentu śmierci klinicznej (po 3 dniach od chwili reanimacji), a nawet ulegają nasileniu, to czy te poniedokrwiennie zmiany odzwierciedlają pewne procesy zwyrodnieniowe („dojrzewanie procesu patologicznego”, Mossakowski i wsp. 1986), czy też są one związane z odnową biologiczną aksonów sekrecyjnych zmierzającą do przywrócenia im prawidłowej czynności sekrecyjnej.

Wiadomo, że niedokrwienie czy niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego ssaków powoduje liczne zmiany fizjologiczne, biochemiczne i morfologiczne zarówno w komponencie nerwowym, jak i glejowym (Bakay, Lee 1968; Yu i wsp. 1972a, b; Hossmann i wsp. 1973; Hossmann, Zimmermann 1974; Klatzo 1975, 1985). Stąd też duże zainteresowanie klinicystów wpływem incydentu niedokrwienia (w tym przypadku śmierci klinicznej) i rozwojem zmian poniedokrwiennych na czynność tkanki nerwowej, a szczególnie tych jej obszarów, które są związane z wysoko wyspecjalizowanymi czynnościami ośrodkowego układu nerwowego. Jest zjawiskiem znamionym, że właśnie takie obszary mózgowia (np. kora mózgu), które mają udział w rozwoju wyższych czynności nerwowych, są jednocześnie najbardziej wrażliwe na wpływ czynników niedokrwiennych.

Wiadomym jest, że w badanym modelu śmierci klinicznej prowadzącej do niedokrwienia OUN już po 10—15 sekundach od momentu ustania akcji serca i oddechu zanika czynność bioelektryczna mózgu, co wyraża się wystąpieniem linii izoelektrycznej w zapisie elektrokortykograficznym (Mossakowski i wsp. 1986). Powrót czynności bioelektrycznej mózgu uzależniony jest od czasu, jaki upłynął od momentu zaniku akcji serca i oddechu, do chwili podjęcia niezbędnych czynności reanimacyjnych (Mossakowski i wsp. 1986).

W doświadczalnym modelu niedokrwienia, o którym mowa w obecnej pracy, zmianami morfologicznymi mogą w sposób wybiórczy być objęte prawie wszystkie zasadnicze formacje mózgowia (Mossakowski i wsp. 1986). Fakt istnienia złożonych połączeń wstępujących i zstępujących jądra nadwzrokowego oraz jądra przykomorowego (oba jądra dają początek układowi podwzgórzowo-przysadkowemu) z innymi obszarami mózgu czyni mało prawdopodobnym by w zastosowanych warunkach doświadczalnych tkanka nerwowa podwzgórza nie znajdowała się pod wpływem zmienionej fizjologii innych obszarów niedokrwionego mózgowia. Zapewne również samo podwzgórze ma pewien wpływ na funkcję tych obszarów ośrodkowego układu nerwowego, do których daje ono

projekcję. Zatem można przyjąć, że zaobserwowane zmiany ultrastrukturalne w aksonach sekrecyjnych przysadki nerwowej szczura współuczestniczą w ogólnej (choć najprawdopodobniej zróżnicowanej) odpowiedzi ośrodkowego układu nerwowego na niedokrwienie i niedotlenienie wywołane incydem śmierci klinicznej zwierzęcia.

Bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej, w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym szczura dominują perykariony obfitujące w NSG; m.in. dlatego wnioskuje się o hiperaktywności neuronów sekrecyjnych podwzgórza (Gajkowska 1987). Termin „hiperaktywności” stosuje się do określenia wzmożonych czynności fizjologicznych komórki. W przytoczonym przypadku trudno jest sprecyzować czy chodzi tutaj o zjawisko wzmożonej czynności neuronów prowadzące do: a) intensywnej syntezy materiału neurosekrecyjnego w perykarionach, b) zwiększonego wydzielania do krwi materiału sekrecyjnego zawartego w aksonach przysadki nerwowej i wreszcie c) czy chodzi tutaj o oba te procesy jednocześnie. Mimo użycia terminu „hiperaktywność” bezpośrednio odpowiedzi na te pytania nie są tutaj możliwe. Wynika to z braku dodatkowych badań fizjologicznych czy immunocytochemicznych, umożliwiających przypisanie odpowiednich zmian ultrastrukturalnych określonym neuronom sekrecyjnym podwzgórza, jak również oznaczenia poziomu odpowiednich hormonów przysadkowych we krwi, w szczególności poziomu wazopresyny i oksytocyny. Pomimo tych zasadniczych zastrzeżeń, wyniki przedstawionych badań nad aksonami sekrecyjnymi przysadki nerwowej można do pewnego stopnia korelować z zachowaniem się perykarionów sekrecyjnych jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego podwzgórza, skąd aksony się wywodzą. Stwierdzony zatem przez Gajkowską (1987) fakt znamiennego gromadzenia NSG w licznych perykarionach neuronów sekrecyjnych podwzgórza bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej oraz dominacja w przysadce nerwowej aksonów obfitujących w NSG są istotne w niniejszych rozważaniach. Powyższe obserwacje pozwalają bowiem wnioskować o zaburzeniu przepływu aksonalnego NSG z podwzgórza do przysadki nerwowej oraz o ograniczeniu wydzielania do krwi hormonów przysadkowych, co ma miejsce bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej zwierzęcia. Najprawdopodobniej mamy tu zatem do czynienia nie ze zjawiskiem „hiperaktywności” neuronów, ale przede wszystkim z obniżeniem ich czynności wydzielniczych, co może wynikać z wyczerpania się zapasów energetycznych w poszczególnych neuronach.

Z drugiej jednak strony, niektóre perykariony neuronów sekrecyjnych w podwzgórzu (Gajkowska 1987) oraz niektóre aksony w przysadce nerwowej charakteryzują się m.in. ubogością lub nawet brakiem NSG. Dotyczy to zwierząt badanych tak bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej, jak i po upływie 3 dni. Spostrzeżenia te mogą wskazywać na istotny udział właśnie tej populacji neuronów sekrecyjnych

(ubogich w NSG) w zjawisku wzmożonego wydzielania hormonów przysadkowych w omawianych warunkach doświadczalnych. Przytoczone dotychczas obserwacje świadczą jednoznacznie o zróżnicowanej wrażliwości neuronów sekrecyjnych na zaistniałe warunki niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. W odniesieniu do przysadki nerwowej należy jednak podkreślić, że aksony sekrecyjne, wykazujące cechy charakterystyczne dla wzmożonego wydzielania hormonów, występują w zdecydowanej mniejszości. Aksony te cechowały się obrzmieniem bądź też zawierały liczne mikropęcherzyki, wakuole lub proliferującą gładką siateczką akso-plazmatyczną. Wymienione cechy ultrastrukturalne mogą przemawiać za tym, że właśnie te aksony przebyły fazę wzmożonej czynności sekrecyjnej, co w konsekwencji mogło doprowadzić do ich uszkodzenia. Jest bardzo prawdopodobne, iż mamy tu do czynienia ze zjawiskiem tzw. „cyklicznego zwyrodnienia” aksonów, które według Dellmanna (1973) jest przede wszystkim wyrazem wzmożonych procesów sekrecyjnych, a nie procesów prowadzących do nieodwracalnych zmian zwyrodnieniowych. W odniesieniu do obecnej pracy za takim poglądem przemawia fakt braku aksonów o wyraźnych cechach zaburzenia struktury.

Niemniej jednak niektóre zmiany aksonalne obserwowane u zwierząt doświadczalnych są charakterystyczne dla niedokrwienia. Wyrażają się one znacznym obrzmieniem mitochondriów; dotyczy to ogółu obserwowanych aksonów bez względu na to czy zawierały one NSG, czy też nie. Zmiany naczyniowe i okołonaczyniowe można również wiązać ze zjawiskiem niedokrwienia.

Jest znamienne, że zmiany ultrastrukturalne aksonów sekrecyjnych przysadki nerwowej u szczurów obserwowane zarówno bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej, jak i po upływie 3 dni, są ubogie w porównaniu do zmian aksonalnych obserwowanych u chomika mongolskiego po 10-minutowym niedokrwieniu mózgowia wywołanym podwiązaniem tętnic szyjnych wspólnych (Loesch 1983b). Należy podkreślić jednak, iż podwiązanie tętnic szyjnych nie prowadziło do zatrzymania akcji serca, jak czynności oddechowej. Wydaje się przeto, że zachowanie lub brak czynności oddechowej podczas krótkotrwałego niedokrwienia nie ma istotnego wpływu na pojawienie się zmian ultrastrukturalnych neurosekrecyjnego układu podwzgórzowo-przysadkowego ssaków. Natomiast wpływ czynności oddechowej na ten układ ma istotne znaczenie w szeregu innych modeli doświadczalnych, chociażby u królików poddanych działaniu wysokiej temperatury otoczenia (Gajkowska i wsp. 1985; Loesch i wsp. 1985; Loesch 1986).

Podsumowując powyższe rozważania należy stwierdzić, że w omawianych warunkach doświadczalnych zaobserwowane zmiany dotyczą stosunkowo małej populacji aksonów. Zmiany te wydają się prowadzić do odnowy biologicznej aksonów prawdopodobnie w związku z ich wzmożoną czynnością sekrecyjną. Organizacja ultrastrukturalna większości akso-

nów przysadki nerwowej szczurów tak bezpośrednio po incydencie śmierci klinicznej, jak i 3 dni po tym incydencie nie różniła się (z wyjątkiem mitochondriów) od organizacji aksonów szczurów kontrolnych. Obserwacje te mogą więc wskazywać na utrzymywanie się w normie, a nawet na hamowanie wydzielania hormonów przysadkowych po incydencie śmierci klinicznej zwierzęcia. Na korzyść takiej hipotezy przemawia również charakterystyczne zachowanie się w omawianych warunkach doświadczalnych przysadkowych komórek glejopodobnych — pituicytów (obserwacje własne niepublikowane). Organizacja pituicytów i ich interakcja z aksonami sekrecyjnymi przysadki nerwowej szczura po incydencie śmierci klinicznej jest przedmiotem odrębnego opracowania.

Autor pragnie serdecznie podziękować Panu Sławomirowi Januszewskiemu za wprowadzenie w zagadnienia techniczne związane z wykonaniem doświadczenia opisanego w niniejszej pracy, jak również za wykonanie doświadczeń pokazowych.

ULTRASTRUCTURE OF NEUROHYPOPHYSIAL AXONS OF THE RAT AFTER REANIMATION IN CONNECTION WITH EXPERIMENTALLY INDUCED CLINICAL DEATH

Summary

This work has been done to elucidate ischemic and postischemic changes appearing in the neurohypophysis of a rat which underwent the incident of clinical death. The incident was experimentally induced by compression of the vascular bundle of the heart for 2.5 min according to the method described by Korpaczew et al. (1982). The ultrastructural organization of the neurohypophysial axons was investigated directly after resuscitation and 3 days after the incident.

Directly after resuscitation the majority of the neurohypophysial axon profiles displayed an abundance of neurosecretory granules, therefore, these profiles did not differ from those of controls. About 10% of the examined profiles showed scarce neurosecretory granules. Some of these profiles contained either numerous microvesicles, vacuoles or proliferating axoplasmic reticulum. It is suggested that only this small population of axons was involved in some processes that could lead to an increased release of the neurohypophysial hormone/s. At the same time, diverse ultrastructural pictures of the axons seem to express some degenerative and regenerative changes ("cyclic degeneration"). It is striking, that as time elapsed from the moment of resuscitation, there were more axon profiles displaying signs of cyclic degeneration. The general features of neurohypophysial axons of the rat 3 days after resuscitation suggest inhibition or restriction of release of the neurohypophysial hormones; this probably is connected with some disturbances of axonal flow of neurosecretory material.

A common feature of all axon profiles observed both directly and 3 days after resuscitation of the rat was mitochondrial swelling. This may strongly suggest some modifications of metabolic processes in the neurohypophysial axons under the ischemic and postischemic conditions, described in this paper.

СЕКРЕЦИОННЫЕ АКСОНЫ НЕРВНОЙ ЧАСТИ ГИПОФИЗА КРЫС
ПОСЛЕ РЕАНИМАЦИИ В СВЯЗИ С ИНЦИДЕНТОМ КЛИНИЧЕСКОЙ СМЕРТИ

Резюме

Исследовалась ультраструктура аксонов нервной части гипофиза крыс, у которых была вызвана на 2,5 минуты задержка циркуляции крови по методу Корпачева и соавторов (1982). Непосредственно после реанимации большинство аксонов (около 75%), кроме набухания митохондрий, не отличалось от контрольных. В место этого, в около 10% аксонов было обнаружено небольшое количество нейросекреторных гранул или многочисленные микропузырьки, вакуоли или пролиферирующее эндоплазматическое ретикулум. Кажется, что это небольшое количество аксонов могло участвовать в усиленных секреторных процессах нервной части гипофиза. У крыс с 3-дневным прожитием после реанимации увеличивалось количество аксонов с симптомами регенерации. Вероятно, в этом периоде процесс секреции гипофизарных гормонов приторможенный. Во всех аксонах, не зависимо от рода изменений, были набуханные или даже выразительно поврежденные митохондрия. Это позволяет предполагать, что как непосредственно после реанимации, так в 3 дня после клинической смерти, в секреторных аксонах нервной части гипофиза появляются метаболические изменения,

PIŚMIENNICTWO

1. Bakay L., Lee J.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697—706.
2. Dellmann H.-G.: Degeneration and regeneration of neurosecretory system. *Int. Rev. Cytol.*, 1973, 36, 215—315.
3. Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe podwzgórza szczura. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 131—146.
4. Gajkowska B., Loesch A., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 55—69.
5. Hossmann K.-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
6. Hossmann K.-A., Kobayashi K., Hossmann H., Kleihues O.: Recovery of cerebral energy metabolism after complete ischemia of one hour's duration. *Naturwissenschaften*, 1973, 60, 53.
7. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *Nervous System*. Vol. 1. The basic neuroscience. Red.: D. B. Tower. Raven Press, New York 1975, 313—322.
8. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17—19 October 1985, Abstr. p. 16.
9. Korpaczew W. G., Łysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie kliniczjeskiej smierti i postreanimationnej choroby u krysa. *Patolo. Fizjøl. i Eksp. Tierapia*, 1982, 3, 78—80.
10. 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.
11. 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.

12. Loesch A.: Effect of high ambient temperature on the neurohypophysis of the rabbit. Further evidence of ultrastructural alternations in neurohypophysial axons and pituicytes. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 273—283.
13. Loesch A., Gajkowska B., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 71—81.
14. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Doniesienie wstępne. Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471—489.
15. Palay S. L.: An electron microscopic study of the neurohypophysis in the normal, hydrated and dehydrated rat. *Anat. Rec.*, 1955, 121, 348—353.
16. Palay S. L.: The fine structure of the neurohypophysis. W: *Ultrastructure and Cellular Chemistry of Neural Tissue*. Red.: H. Wealsch, Harper (Hoeber), New York 1957, 31—49.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1972a, 22, 222—235.
21. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. II. Neuroglia and blood vessel. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1972b, 22, 235—244.

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

LECH IWANOWSKI

BADANIA ULTRASTRUKTURY WŁOŚNICZEK MÓZGU KRÓLIKA W OKRESIE OKOŁOPORODOWYM

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej, Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa

Celem pracy było przebadanie zmian zachodzących w budowie włóściczków mózgu królika w ostatnich pięciu dniach życia płodowego. Badania dotyczyły zarówno ultrastruktury włóściczków, jak i kształtowania się bariery krew—mózg dla peroksydazy chrzanowej, zwłaszcza we włóściczkach spłotu naczyniówki.

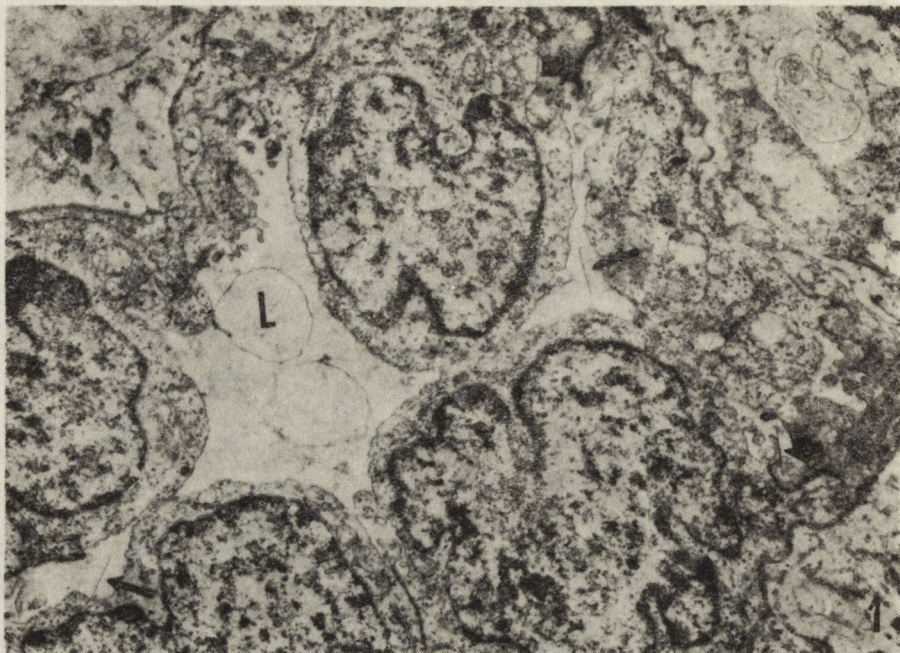
MATERIAŁ I METODY

Przebadano mózgi 3 płodów króliczych w 25 dniu rozwoju i 16 noworodków króliczych w pierwszym dniu życia. Płody były wydobywane drogą cięcia cesarskiego w uśpieniu nembutalowym. Wszystkie zwierzęta w uśpieniu perfundowano do łuku aorty metodą Karnowsky'ego w modyfikacji Gabryela (1973) i Topiłki (1970). Jeden płód i 2 noworodki królicze na 5 minut przed perfuzją otrzymały do sercowo 20 mg peroksydazy chrzanowej (Sigma II) w roztworze 0,5 ml soli fizjologicznej. Dalsze postępowanie było rutynowe. Wycinki pobierane z kory mózgu, spoidła wielkiego, pnia mózgu i spłotu naczyniówki zatapiano w Eponie 812, skrawano na mikrotomie LKB i oceniano w mikroskopie elektronowym Tesla 500 BS.

WYNIKI

Płody w 25 dniu rozwoju

Przekroje poprzeczne przez włóściczkę przebiegały przeważnie przez perykariony komórek śródbłonna. Dawało to gwiaździsty kształt światła wskutek wpuklania się komórek do światła naczynia (ryc. 1). Komórki śródbłonna niejednokrotnie przylegały odcinkowo do siebie tworząc pozornie dodatkowe kanały światła. Komórki śródbłonna tworzyły też wy-



Ryc. 1. Włośniczka kory mózgowej królika w 25 dniu rozwoju. Komórki śródbłonna o wrębiastych jądrach wpuklają się do światła naczynia (L). Odcinkowo przylegając do siebie tworzą pozornie dodatkowe kanały światła (strzałki). Wykształcone złącza na całej długości wypełnia gęsty elektronooptycznie materiał (grot strzałki). Obecne nieliczne mikrokosmki. Błona podstawna bardzo wąska. Pow. 8 000 ×

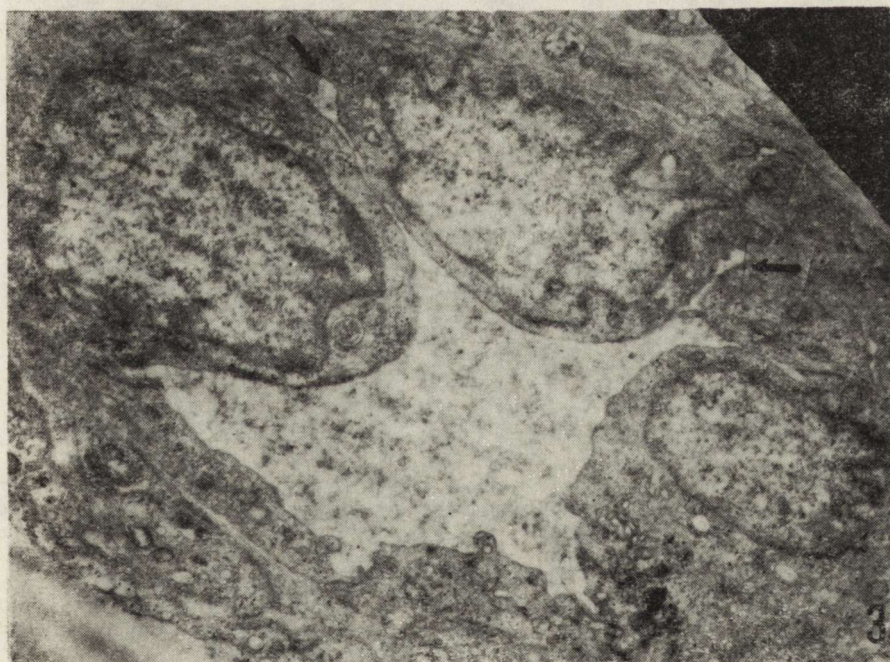
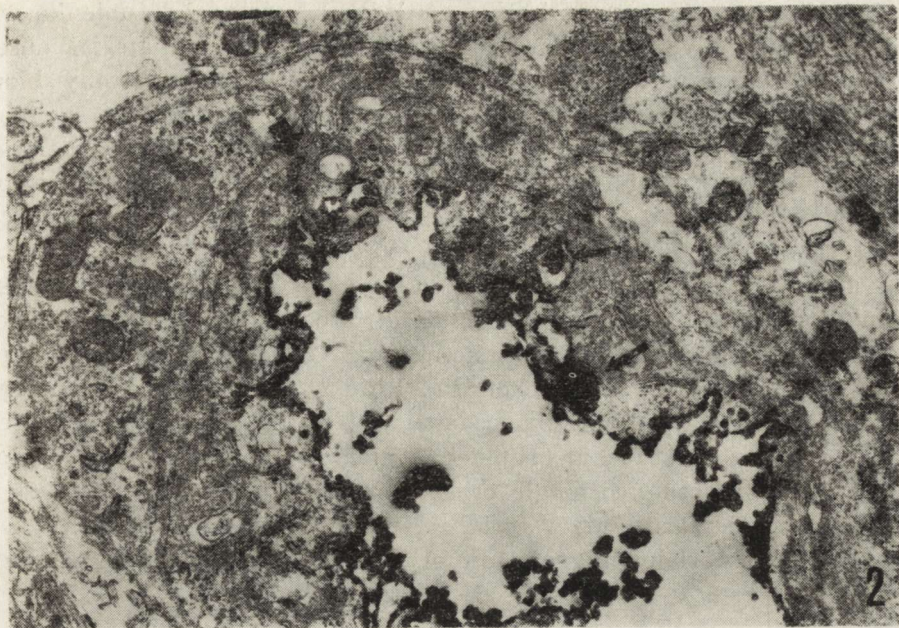
Fig. 1. Capillary of cerebral cortex. Rabbit foetus on 25th day of embryonal life. Endothelial cells with indented nuclei protruding into lumen (L). Their partial contact apparently forms pseudo-lumina (arrows). Terminal bars are filled along the whole length with dense material (arrow head). Several microvilli are present. Basement membrane very narrow. × 8 000

Ryc. 2. Królik, 25 dzień rozwoju płodowego. Włośniczka w pniu mózgu. Znacznik obecny w świetle naczynia, na powierzchni błony plazmatycznej oraz zamknięty w pęcherzykach cytoplazmy w pobliżu światła naczynia (strzałki). W szczelinie między komórkami znacznik jest blokowany przez złącza ściśle (grot strzałki). HRP. Pow. 9 000 ×

Fig. 2. Rabbit, 25th day of fetal development. Brain stem capillary. HRP in vessel lumen surface of plasmatic membrane and in cytoplasmic vesicles in the neighbourhood of vessel lumen (arrows) is seen. In intercellular cleft HRP is stopped by tight junction (arrow head). HRP. × 9 000

Ryc. 3. Włośniczka kory mózgu noworodka królika w 1 dniu życia. Wpuklające się do światła naczynia części perikaryalne komórek śródbłonna nie stykają się, tworzą one na przekroju zatoki (strzałki). Widoczne są pęcherzyki pinocytarne. Pow. 8 000 ×

Fig. 3. Capillary of cerebral cortex of newborn rabbit on the first day of life. Perikaryal parts of endothelial cells protrude into lumen without contact, forming fiord-shaped sinuses (arrows). Pinocytic vesicles are seen. × 8 000



dłużone fiordokształtne zatoki. Złącza między komórkami śródbłonka wypełniał niekiedy elektronowo gęsty materiał. Podobny materiał obserwowano również w przestrzeniach pozakomórkowych od strony błony podstawnej włóśniczki. Miejscami do światła naczyń wpuklały się fałdy wypustek protoplazmatycznych i mikrokosmki. Przekroje o gładkim, okrągłym zarysie światła bez fałd, mikrokosmków i wpuklających się perykarionów trafiały się rzadko. Niekiedy spotykało się obecność perycytów (ryc. 4).

Kanały siatki śródplazmatycznej komórek śródbłonka miały zwykłą szerokość i przeważnie nie były obłożone rybosomami. Natomiast dość często poszerzone były zbiorniki kompleksu Golgiego. Obficie występowały wolne rybosomy i mitochondria. Rzadko obserwowano pęcherzyki pinocytarne i ciała gęste. Błona podstawna była na ogół wąska, miejscami ulegała rozwarstwieniu. Niekiedy miała stosunkowo małą gęstość elektronowo-optyczną, co mogło przemawiać za jej niepełnym rozwojem. Wypustki astrocytarne, przeważnie obrzmiałe, przylegały do błony podstawnej. W materiale przygotowanym rutynowo nie udało się zaobser-



Ryc. 4. Włóśniczka pnia mózgu noworodka królika w 1 dniu życia. Części perykaryalne komórek śródbłonka nie wpuklają się do światła naczynia. Wręby jąder mniej wyraźne niż w naczyniach kory. Komórka perycyta (P) posiada rozbudowaną siatkę śródplazmatyczną (strzałka). Pow. 8 000 \times

Fig. 4. Capillary of brain stem of newborn rabbit on the first day of life. Perikaryal parts of endothelial cells do not protrude into lumen. Indentation of nuclei less marked than in cortical vessels. Pericyte (P) shows well developed endoplasmatic reticulum (arrow). \times 8 000

wować istotnej różnicy pomiędzy włóściczkami kory, spoidła i pnia mózgu obserwowanych bez podania znacznika. Wycinków ze spłotu naczyńki bez znacznika nie uzyskano.

Podanie peroksydazy chrzanowej (HRP) uczynniało pinocytozę. Liczne znaczone pęcherzyki pinocytarne obserwowano w naczyniach śródbłonka włóściczek pnia (ryc. 2). Było ich brak natomiast w śródbłonkach włóściczek kory mózgu i spoidła. Znacznik wypełniał szczeliny międzykomórkowe zatrzymując się na złączach. Nie obserwowano bezpośredniego przenikania HRP do błony podstawnej. Niemniej jednak jej gęstość elektronooptyczna miejscami wydawała się zwiększona.

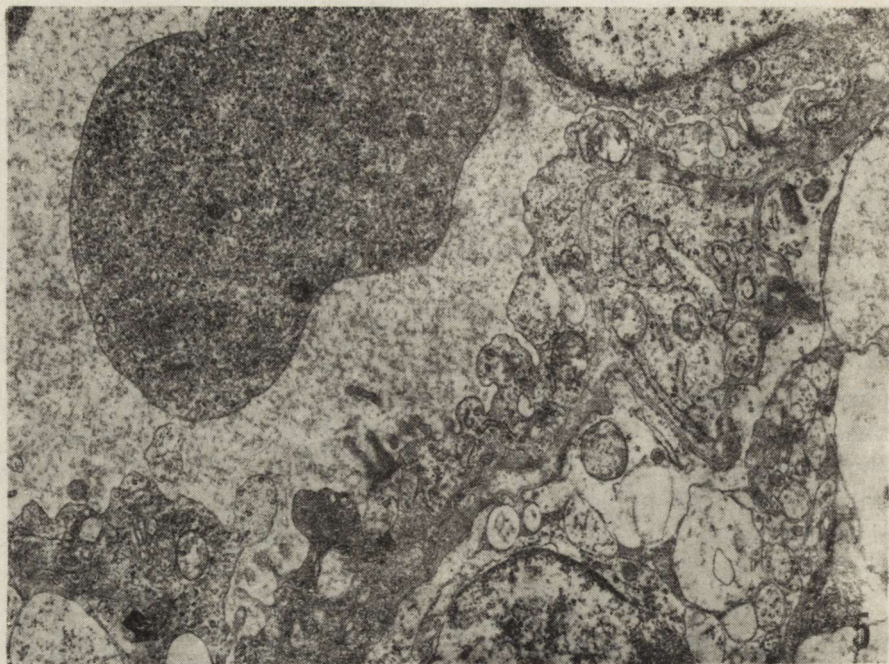
W pobranym materiale ze spłotu naczyńki znacznik występował zarówno w świetle naczyń, jak w szczelinach między komórkami śródbłonka oraz w pęcherzykach mikropinocytarnych. W postaci śladowej znajdował się w podłożu łącznotkankowym. Nie obserwowano natomiast przenikania jego do nabłonka spłotu. Nabłonek spłotu wydawał się nie w pełni wykształcony: komórki były niskie, jakby rozplaszczone, mikroskopki nieliczne, stosunkowo często miały one kształt buławkowaty.

Noworodki w pierwszym dniu życia

Podobnie jak w naczyniach płodów, w korze nadal przeważały przekroje poprzeczne o kształcie gwiaździstym światła. Wpuklające się do światła komórki śródbłonka nie tworzyły jednak wspomnianych uprzednio pozornych kanałów, a jedynie głębokie zatokowate wpuklenia (ryc. 3). W śródbłonkach włóściczek kory obserwowano pojedyncze pęcherzyki mikropinocytarne.

Obraz włóściczek pnia był odmienny. Na przekrojach poprzecznych zgrupowania części perykaryalnych komórek śródbłonka trafiały się rzadko, przy czym przeważnie nie wpuklały się one do światła naczynia (ryc. 4). Pojawiały się natomiast pofałdowania oraz stosunkowo duże pęcherzyki pinocytarne (ryc. 5). Liczebność jąder komórek śródbłonka ulegała wyraźnemu pomniejszeniu w stosunku do obrazów uzyskiwanych u płodów. Rozciągnięciu ulegały wygładzone cytoplazmatyczne blaszki, które stanowiły przeważający element obrzeżający światło naczynia (ryc. 6).

Podanie znacznika zdawało się uczynniać pinocytozę komórek śródbłonka. Pęcherzyki pinocytarne, przeważnie znaczone, występowały znacznie obficie niż w śródbłonkach u płodu (ryc. 7). Wolny znacznik wszędzie zatrzymywał się na złączach. W pniu mózgu wypustki astrocytów w otoczeniu włóściczek często nie miały cech obrzmienia (ryc. 8). W splocie naczyńkowym już w pełni wykształconym, znacznik obficie przenikał do błony podstawnej naczyń włosowatych. Obecny był również w tkance zrębu łącznotkankowego oraz w szczelinach między komórkami nabłonka spłotu (ryc. 9). Obecność znacznika podkreślała obfi-



Ryc. 5. Fragment włóścizki pnia mózgu noworodka królika w 1 dniu życia. Komórki śródbłonka bogate w organelle (mitochondria, Golgi, siatka szorstka), posiadają pojedyncze mikrokosmki oraz liczne kolbiaste uwypuklenia cytoplazmy do światła naczynia. Powstałe sfałdowania powierzchni zwróconej do światła tworzą zatokowate wypuklenia (groty strzałki). Pow. 14 000 ×

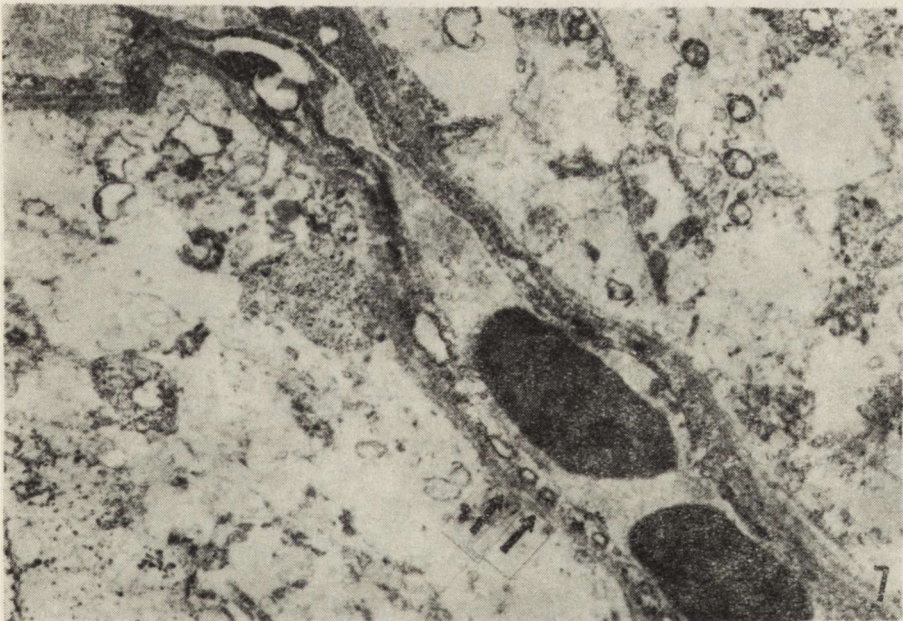
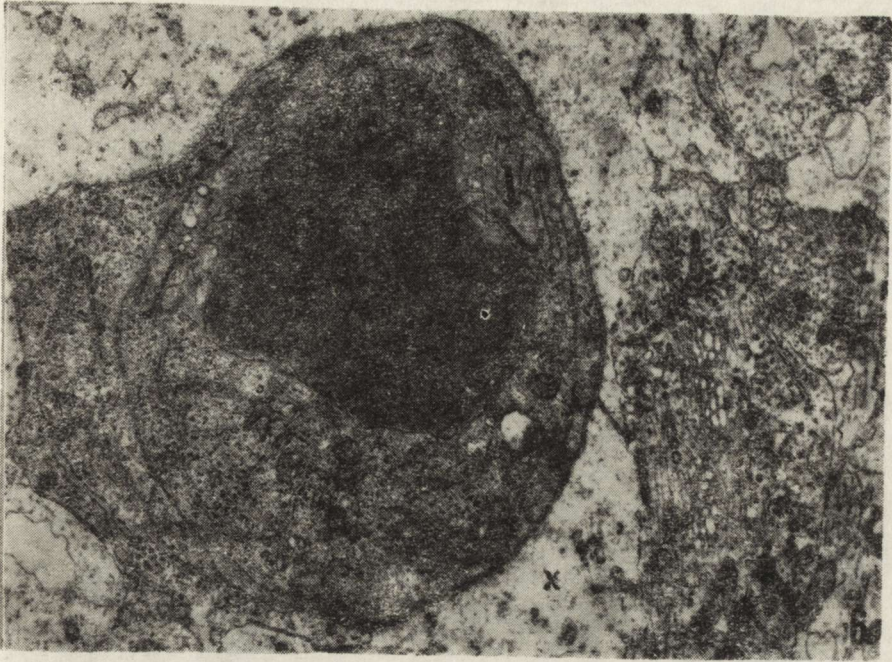
Fig. 5. Fragment of capillary brain stem of newborn rabbit on the first day of life. Endothelial cells rich in organelles. Single microvilli and sinus-like formations in lumen (arrow heads). × 14 000

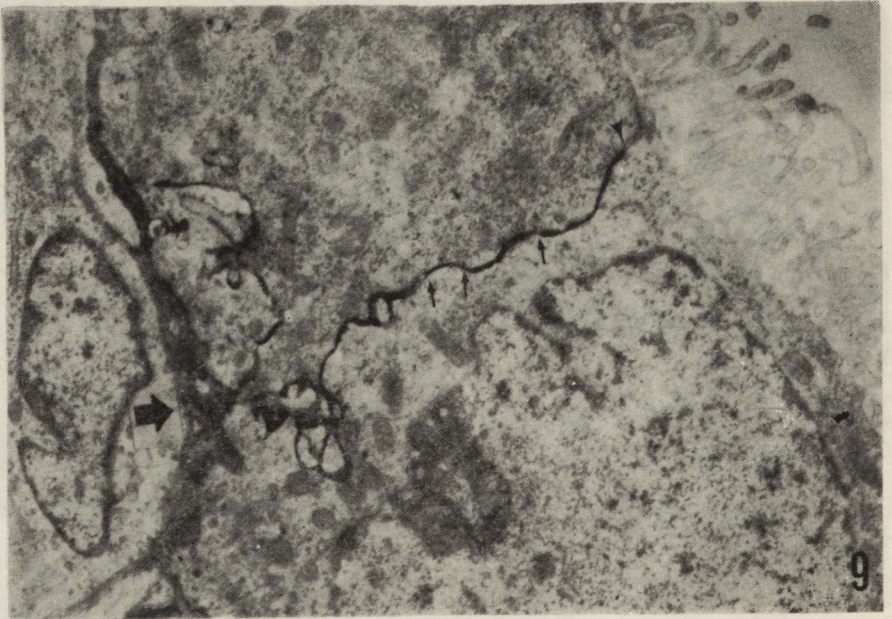
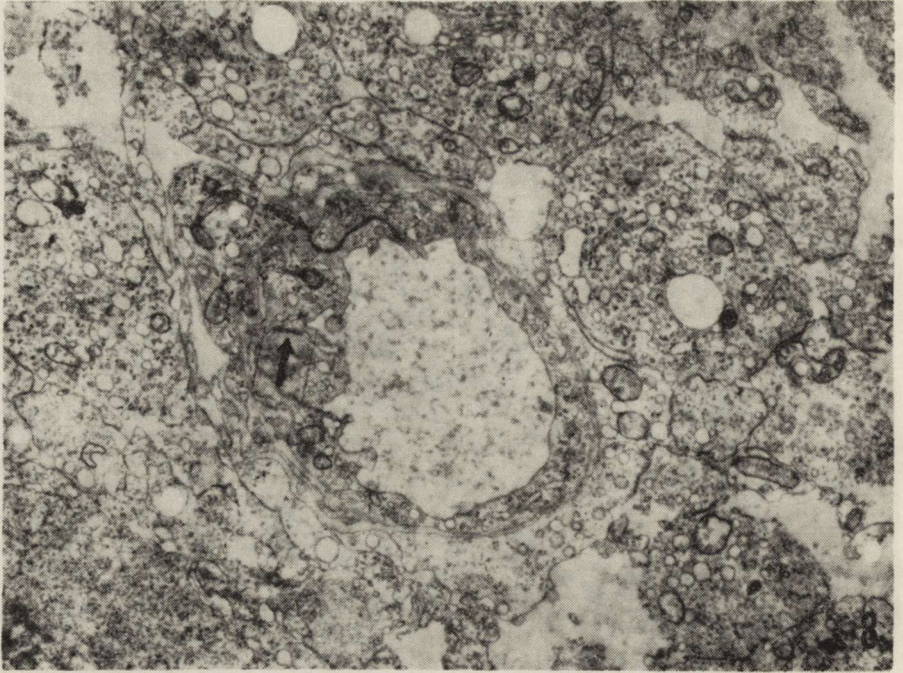
Ryc. 6. Włóścizka pnia mózgu noworodka królika w 1 dniu życia. Na przekroju niewidoczne są jądra komórek śródbłonka. Obrzeże światła jest gładkie, bez zatok i mikrokosmków. Złącza między komórkami śródbłonka (strzałka) odcinkowo wypełnia gęsty elektronooptycznie materiał. Pojedyncze pęcherzyki pinocytarne. Obrzmiałe wypustki astrocytarne (X) w najbliższym sąsiedztwie naczynia. Pow. 8 000 ×

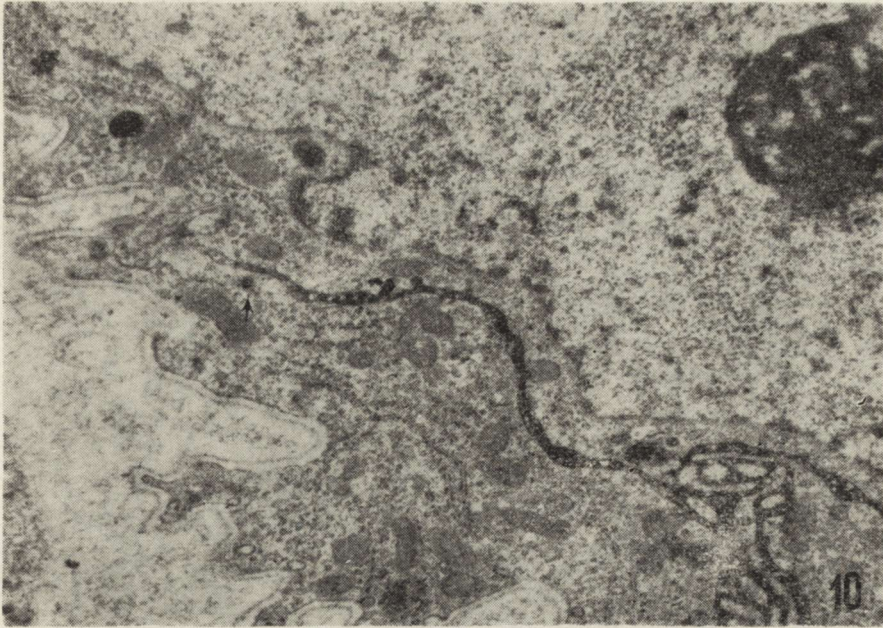
Fig. 6. Capillary of brain stem of newborn rabbit on the first day of life. On the cross section endothelial nuclei are not visible. Lumen outline is smooth without sinuses and flaps. Terminal bars are filled for some length with dense material. Several pinocytotic vesicles. Swollen astrocytic extensions next to the vessel (X). × 8 000

Ryc. 7. Królik, noworodek, 1 dzień życia. Włóścizka w korze mózgu. Znacznik w szczelinach między komórkami śródbłonka, blokowany w złączach ścisłych. Obecny jest również w pęcherzykach pinocytarnych (strzałki). HRP. Pow. 5 000 ×

Fig. 7. Newborn rabbit, first day of life. Cerebral cortex capillary. HRP in intercellular clefts blocked in tight junctions and in labeled pinocytotic vesicles (arrows). × 5 000







Ryc. 10. Królik, noworodek, 1 dzień życia. Nabłonek spłotu naczyńwłóskowego. Znacznik wypełnia szczelinę między komórkami nabłonka podkreślając pofałdowania jej części dolnej. Natomiast brak jest śladów znacznika od strony podstawy komórki nabłonka. Pojedyncze pęcherzyki pinocytarne zawierają znacznik (strzałka). HRP. Pow. 9 000 ×

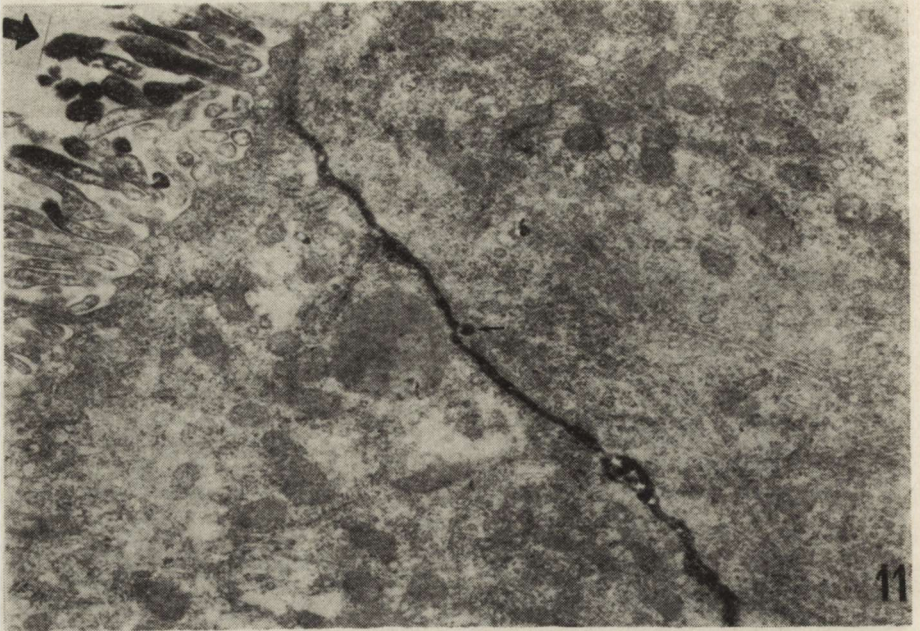
Fig. 10. Newborn rabbit, first day of life. Epithelial lining of arachnoid plexus. Reaction product fills intercellular cleft, enhances the folds of its lower part. However, HRP is not seen on epithelial basement membrane. Some pinocytotic vesicles are labeled (arrows). HRP. × 9 000

Ryc. 8. Włóściczka pnia mózgu noworodka w 1 dniu życia. Dobrze wykształcone i zamknięte złącza ściśle (strzałki). Liczne pęcherzyki pinocytarne. Przyległe do naczynia wypustki astrocytarne bez cech obrzmienia. Pow. 8 000 ×

Fig. 8. Capillary of brain stem of newborn rabbit on the first day of life. Tight junctions well formed and closed (arrows), pinocytotic vesicles numerous. Astrocytic processes in the closest vicinity of vessel wall without swelling. × 8 000

Ryc. 9. Królik, noworodek, 1 dzień życia. Splot naczyńwłóskowy. Znacznik pokrywa błonę podstawną (duży grot), przedostaje się pomiędzy wypustki części podstawnej komórki nabłonka oraz do szczeliny międzykomórkowej. Widoczne jest kilka kolejnych złączy, przez które znacznik przeniknął (strzałki). Ostatecznie zatrzymał się na złączy szczytowym (grot małej strzałki). HRP. Pow. 7 000 ×

Fig. 9. Newborn rabbit, first day of life. Choroid plexus. HRP covers basement membrane (large arrow head), penetrates between the extensions of the basal part of epithelium and into the intercellular cleft, on both sides of the junctions (arrows). HRP is finally stopped by apical junction (arrow head). × 7 000



Ryc. 11. Królik, noworodek, 1 dzień życia. Nabłonek spłotu naczyniówkowego. Znacznik odcinkowo wypełnia szczelinę między komórkami nabłonka. W bezpośredniej bliskości szczeliny znajduje się znaczone pęcherzyk pinocytarny (strzałka mała). Znacznik przeniknął na powierzchnię mikrokosmków (grot strzałki). HRP Pow. 9 000 ×

Fig. 11. Newborn rabbit, first day of life. Epithelial lining of arachnoid plexus. Reaction product fills intercellular cleft. Next to the lateral cell membrane a labeled vesicle is seen (small arrow). Free HRP penetrated to the microvilli top (arrow head). HRP × 9 000

tość pofałdowań szczelin znajdujących się między błonami plazmatycznymi sąsiadujących ze sobą komórek nabłonka (ryc. 10). Niekiedy znacznik poprzez szczeliny między komórkami nabłonka spłotu osiągał światło komory i był obecny na powierzchni mikrokosmków (ryc. 11). Przeważnie jednak zatrzymywał się na złączach ścisłych na różnej wysokości, najczęściej na złączu szczytowym. Nigdzie też nie udało się zaobserwować ciągłego wypełniania znacznikiem szczeliny międzykomórkowej od błony podstawnej po światło komory. Pojedyncze pęcherzyki mikropinocytarne obecne były w komórkach nabłonka tuż przy szczelinach międzykomórkowych (ryc. 11). Poza tym w komórkach nabłonka spłotu obserwowano różnej wielkości ciała gęste układające się w pobliżu błony plazmatycznej od strony bocznej powierzchni komórki. Obfita również w komórkach nabłonka spłotu była siatka śródplazmatyczna szorstka układająca się w równoległe szeregi (ryc. 12). Często tworzyła ona układ koncentrycznych kół. Niektóre kanały siatki były w bliskim kontakcie z błoną plazmatyczną bocznej powierzchni komórki nabłonka spłotu.



Ryc. 12. Królik, noworodek, 1 dzień życia. Nabłonek spłotu naczyńwkwowego. Kanały ziarnistej siateczki śródplazmatycznej o szeregowym układzie znajdują się w bezpośredniej bliskości wypełnionego znacznikiem odcinka szczeliny między komórkami nabłonka. Widoczna rzęska. HRP. Pow. 16 000 ×

Fig. 12. Newborn rabbit, first day of life. Epithelial lining of arachnoid plexus. Ordered pattern of granular endoplasmic reticulum next to the intercellular cleft filled with reaction product. A cilium is visible. HRP × 16 000

OMÓWIENIE

Obraz morfologiczny włóściczek mózgu płodu na 5 dni przed urodzeniem, w badaniu rutynowym, nie wykazywał wyraźnych cech zróżnicowania naczyń pobranych z różnych okolic mózgowia. Podanie HRP uczyniło mikropinocytozę. Była ona niewielka we włóściczkach kory i spoidła wielkiego, a bardziej nasilona w naczyniach pnia mózgu. Mikropinocytoza najwyraźniej występowała we włóściczkach mózgu noworodka. Wskazywało to, że intensywność mikropinocytozy w śródbłonkach włóściczek wzrastała w miarę rozwoju struktur mózgowia. Farkas-Bargeton i Arsenio-Nunes (1970) opierając się na badaniach histochemicznych enzymów ustaliły podobną kolejność dojrzewania naczyń mózgowych. W opracowanym materiale już u płodu stwierdzono pełne wykształcenie złączy ścisłych, które zatrzymywały znacznik. Należy przypuszczać, że obserwowane zmiany kształtu przekrojów naczyń były następstwem zwiększania się pojemności naczyń, postępującego równoległe do rozwoju poszczególnych struktur mózgowia. Rozbudowa łożyska naczyniowego pociągała za sobą powiększanie się poszczególnych komórek śródbłonna, a zwłaszcza rozciągania się ich cytoplazmy w postaci cienkich

blaszek. Dawało to wydłużenie odległości pomiędzy jądrami sąsiadujących komórek. Zmiany te wydawały się mieć wpływ na zachowanie się wypustek astrocytarnych okołonaczyniowych.

Rozmieszczenie znacznika w splocie naczyńkowym noworodka świadczy o możliwości jego przenikania do płynu mózgowo-rdzeniowego. Na możliwość i mechanizmy jego przenikania do wnętrza komór zwraca się uwagę w piśmiennictwie (Majdecki, Borowicz 1970; van Deurs 1976). Przedstawione w niniejszej pracy obserwacje wskazują, że nie wszędzie blokada przestrzeni międzykomórkowej nabłonka spłotu przez złącza ścisłe jest skuteczna. Przeciek znacznika między komórkami nabłonka nawet przy odcinkowej blokadzie może być wspomagany przez pęcherzyki pinocytarne i heterofagosomy (Majdecki, Borowicz 1970; van Deurs 1976), które mogą opróżniać swoją zawartość poprzez błonę plazmatyczną bocznej powierzchni komórki nabłonka do szczeliny międzykomórkowej powyżej złącza ścisłego. Za możliwością istnienia przecieku białka osocza do płynu mózgowo-rdzeniowego u płodu przemawia wielokrotnie wyższy w tym okresie rozwoju niż u dorosłych poziom białka w płynie mózgowo-rdzeniowym (Purin 1958; Kłosowski 1963; Durbin i wsp. 1975). Możliwość przenikania białka przez złącza ścisłe u płodu i noworodka jest ciągle przedmiotem sporów. Møllgard i Sauders (1976) oraz Brightman i Reese (1969) stanowczo zaprzeczają takiej możliwości nawet u płodów we wczesnym okresie rozwoju, natomiast Grontft (1954) dopuszcza ją w pełni, ale w warunkach asfiksji. Ta ostatnia może wystąpić zawsze w przebiegu doświadczenia. Przenikania drogą transportu tubularnego w badanym materiale nie zaobserwowano. Brightman i Reese (1969) sądzą, że peroksydaza chrzanowa przenika przez fenestracje śródbłonka naczyń spłotu, a w kolejności może się dostawać do płynu mózgowo-rdzeniowego. Pełna blokada przez złącza ścisłe nie dotyczy elektrolitów i wody (Castel i wsp. 1968; Wright 1972).

ULTRASTRUCTURAL STUDIES OF THE RABBIT BRAIN CAPILLARIES IN PERINATAL PERIOD

Summary

The aim of the work was to investigate the development of cerebral capillaries in the rabbit during the perinatal period. The blood-brain barrier for horseradish peroxidase (HRP) was examined in the capillaries and choroid plexus. Three foetuses and 16 newborn rabbits were examined. The growth of the endothelial cells and the activity of pinocytosis in the vessel wall were considered to be the exponents of capillary maturity. According to the maturation of their capillaries several cerebral areas were evaluated in the following sequence: brain stem, corpus callosum, cerebral cortex. This sequence is parallel to the maturation of the above mentioned cerebral structures. The blood-brain barrier for HRP was found to be

developed in the 25-day-old foetus. In spite of this, some HRP penetrated into the lumen of the ventricle. The supposed mechanism of this phenomenon is discussed.

ИССЛЕДОВАНИЯ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КАПИЛЛЯРОВ МОЗГА КРОЛИКА В ПЕРИНАТАЛЬНОМ ПЕРИОДЕ

Резюме

Исследовались изменения в структуре капилляров мозга кролика в последних 5 днях внутриутробной жизни. Исследовалась так ультраструктура капилляров как формирование барьера кровь-мозг для хреновой пероксидазы, особенно в капиллярах сосудистого сплетения. Изучались мозги 3 плодов в 25 дне развития и 16 новорожденных кроликов в первом дне жизни. В исследуемом периоде замечено гиперплазию эндотелиальных клеток капилляров, однако неравномерную в различных структурах мозга. Интенсивность пиноцитоза в клетках эндотелия была тоже различная, зависимо от места взятия среза. Оба эти факторы могут быть показателем созревания сосуда. Быстрее всего созревают капилляры ствола мозга, затем — мозолистого тела, наиболее медленно — коры мозга. Эта последовательность соответствует последовательности созревания выше упомянутых частей мозга. Барьер кровь-мозг для хреновой пероксидазы была сформирована уже в плодовом периоде. Наблюдалось прохождение показателя через сосудистое сплетение в спинно-мозговую жидкость, несмотря на присутствие плотных соединений в сплетении. Обсуждается вероятный механизм этого феномена.

PIŚMIENNICTWO

1. Brightman M. W., Reese T. S.: Junctions between intimately opposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.*, 1969, 40, 648—677.
2. Castel M., Sahar A., Eriş D.: Extracellular route for passive permeation in choroid plexus epithelium. *Israel J. Med. Sci.*, 1968.
3. Deurs Van B.: Choroid plexus absorption of horseradish peroxidase from the cerebral ventricles. *J. Ultrastruct. Res.*, 1976, 55, 400—416.
4. Durbin G. M., Dziegielewska K. M., Evans C. A. N., Malinowska D. H., Møllgard K., Reynolds E. O. R., Reynolds M. L., Saunders N. R.: Penetration of labelled protein from blood into foetal brain and c.s.f. *Proc. of the Physiological Society, Copenhagen J. Physiol.* 1975.
5. Farkas-Bargeton E., Arsenio-Nunes M. L.: Maturation de l'équipement enzymatique des parois vasculaires du système nerveux. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1970, 15, 251—271.
6. Gabryel P.: „Bariera krew-mózg” struktura i funkcja. *Pat. Pol.*, 1973, 24, 217—235.
7. Gröntft O.: Intracranial haemorrhage and blood-brain barrier problems in the newborn. *Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl.*, 1954, 1—102.
8. Klosowski B. N.: The development of the brain and its disturbance by harmful factors Pergamon Press, Oxford, 1963.
9. Majdecki T., Borowicz J.: Ultrastruktura ciał lizosomopodobnych splotu naczyńnikowego królika. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 299—304.
10. Møllgard K., Saunders N. R.: Complex junctions of epithelial cells in early foetal brain. *J. Neurocytol.*, 1975, 4, 453—468.

11. Topilko A.: Electron microscopic observation on the formation and development of blood vessels in the human and rabbit brains. *An. Med. Sect. Pol. Acad. Sci.*, 1970, 15, 245—259.
12. Wright E. M.: Mechanism of ion transport across the choroid plexus. *J. Physiol.*, 1972, 226, 545.

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

MARIA SKONIECZNA, JOANNA KRUSZEWSKA,
WŁODZIMIERZ BICZ

OXIDATION IN BRAIN MITOCHONDRIA
OF RATS EXPOSED TO HEAT *

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy,
Medical Academy, Warszawa

Elevated ambient temperature causes disturbances in the circulatory and the central nervous systems both in humans and animals (Dutkiewicz et al. 1958; Śpioch et al. 1958; Karlyjev 1985).

The molecular mechanism of metabolic changes occurring as the result of prolonged overheating of animals is the object of numerous studies. Many authors demonstrated that exposure to heat modifies in animals the activity of mitochondrial enzymes (Jansky 1963; Hazel 1972; Raison 1973; Wodtke 1981; Musoyev 1981). Changes in the activity of these enzymes are connected with the modification of membrane lipids under the influence of temperature changes.

Under conditions of long lasting hyperthermia of the environment the rate of oxidation was found to decrease in the liver mitochondria (Casuto et al. 1966; Swaroop, Ramasarma 1982, 1985), in the kidney (Roberts, Chaffee 1976; Puranam et al. 1984), in the brown fat tissue (Roberts, Chaffee 1976) and in the brain (Gwóźdź 1978). The investigations of Swaroop and Ramasarma (1982) indicate that the oxidation rate of succinate in the liver mitochondria diminishes in animals after a short period of exposure to heat.

The lack in the available literature of papers concerning the influence of thermal exposure of short duration on the oxidation process in the brain mitochondria, and the fact that in humans exposed to the action of elevated temperatures disturbances occur within a short time in the CNS prompted us to undertake the here presented studies.

The aim in view was evaluation of the activity of enzymes of the respiratory chain and respiratory rate in mitochondria of the brain in animals subjected for a short time to elevated ambient temperature.

* This work was supported by Grant No 06-02.II.3.6 from the Polish Academy of Sciences.

MATERIAL AND METHODS

In all experiments white male rats weighing 200—220 g were used. They were fed a standard diet and received water *ad libitum*. The animals were adapted before the experiment to laboratory conditions for 5—6 days.

During the experiments the rats were kept in a chamber with forced air flow, humidity within 35—55 per cent and regulated temperature. The control temperature was $21 \pm 1^\circ\text{C}$. The animals were exposed 6 h daily for three successive days. The applied experimental temperature were $28 \pm 1^\circ\text{C}$ and $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

For three days the temperature of the animals was measured twice daily in the rectum with a mercury baguette thermometer inserted to a depth of 3 cm before introducing them into the heated chamber. Rectal temperature was also measured immediately before placing the animals in the chamber and after exposure. On the next day, 18 h after the end of exposure to heat, the animals were decapitated and the brain hemispheres were prepared out for removing the mitochondrial fraction which was isolated according to the method of Clark and Niclas (1970). The mitochondria were suspended in medium of the following composition: 0,25 M sucrose, 10 mM Tris, 0,5 mM K^+ EDTA, pH 7.4. The mitochondrial suspension (10 mg/ml) was subjected to ultrasonication for 2 min with 30-s interruption and 30-s intervals in a MSE tissue disintegrator of 9 KHz frequency and 16 amplitude. The sediment obtained after 10 min centrifugation at 8500 g was discarded and the supernatant containing submitochondrial particles was stored on ice for enzyme determination.

Determination of enzyme activity

The activity of NADH: cytochrome c reductase and succinate: cytochrome c reductase was determined as described by Sottocasa (1967). In calculations the differential coefficient $18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ was applied. Cytochrome oxidase activity was measured according to the method of Smith (1954), succinate dehydrogenase by the method of King (1963), NADH dehydrogenase by the method of King (1967).

The medium for determining oxygen utilisation by brain mitochondria consisted of: 300 mM mannitol, 10 mM KCl, 0,2 mM K^+ EDTA, 10 mM Hepes, 10 mM K-phosphate buffer pH 7,4, 1 mg/ml bovine blood albumin and about 2—3 mg mitochondrial protein.

Respiration in state 4 was induced by addition of 4 mM potassium succinate or 10 mM potassium glutamate and 5 mM potassium L-malate. The state of active respiration (state 3) was evoked by adding to the reaction mixture 300 nmoles ADP. The phosphorylation index ADP/O and the respiration control ratio (RCR) were calculated according to the method of Estabrook (1967).

Statistical analysis of the data was performed by Student's *t* test. Values of *p* less than 0.05 were considered to represent significant differences between the means for the control (rat exposed to 21°C) and the experimental group (rats exposed to 28°C and 35°C).

RESULTS

The temperature measurements performed in the animals immediately before exposure to elevated temperature and immediately after demonstrated that overheating causes a rise of body temperature in the animals. When subjected to 28°C they exhibited immediately after every thermal exposure a statistically significant rise of body temperature on the successive days, amounting to 0.5°, 0.6°, 0.4°C. Exposure of the animals to a higher temperature (35°C) caused after the first day a rise of body temperature by 0.8°C and on the subsequent days by 0.4° and 0.3°C.

The animals were sacrificed 18 h after the last exposure, the fraction of submitochondrial particles was isolated from the brain, and in it the activity of enzymes of the respiratory chain was determined.

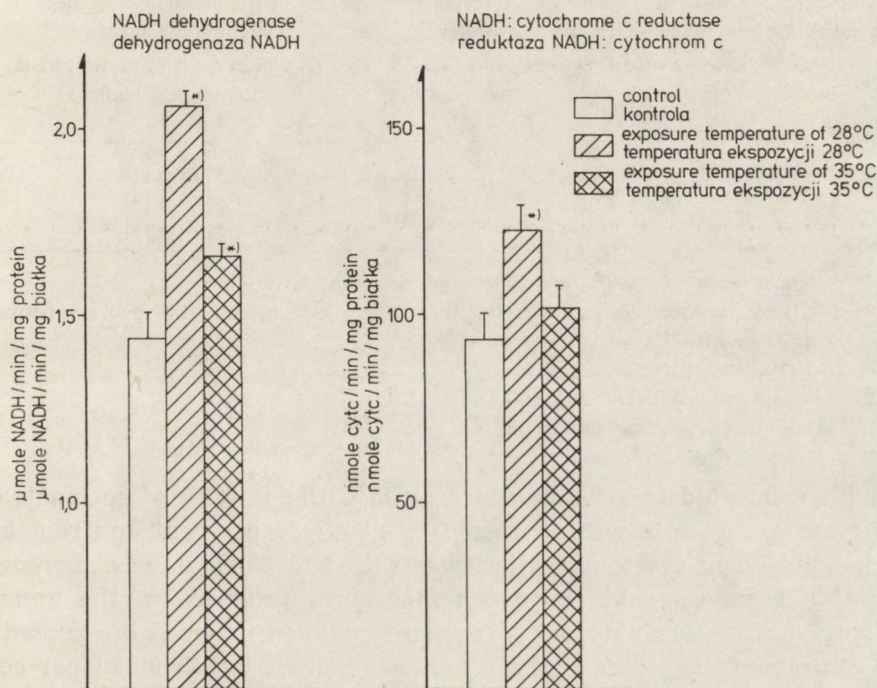


Fig. 1. Influence of raised environmental temperature on the activity of NADH dehydrogenase and NADH:cytochrome c reductase of rat brain mitochondria. Values given are arithmetic means \pm SEM from at last 6 experiments. * — difference statistically significant at $p \leq 0.05$

Ryc. 1. Wpływ podwyższonej temperatury środowiska na aktywność NADH dehydrogenazy i NADH:cytochrom c reduktazy mitochondriów mózgu szczura. Podane wartości są średnią arytmetyczną \pm SEM z 6 doświadczeń. * — różnice statystyczne przy $p \leq 0,05$

The results for NADH: cytochrome c reductase and NADH dehydrogenase are shown in Figure 1. It results from these data that, after exposure to 28°C, a considerable, about 42 per cent increase of NADH dehydrogenase activity occurs, and a less pronounced increase (by about 15 per cent) after exposure to 35°C. As the result of exposure of the animals to 28°C, NADH: cytochrome c reductase activity increases by 30 per cent, a statistically significant value. When higher temperature was applied (35°C), the activity of this enzyme increased by about 10 per cent, but statistical analysis indicated that these differences are not significant in reference to the control (exposed to 21°C).

Under the conditions of environmental hyperthermia applied, statistically significant changes were not noted in cytochrome oxidase activity (Table 1). In the fraction of submitochondrial particles from brains of

Table 1. Activities of succinate: cytochrome c reductase and cytochrome oxidase in brain mitochondria of heat exposed rats

Tabela 1. Aktywność bursztynian: cytochrom c reduktazy i oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu szczurów poddanych działaniu podwyższonej temperatury

Temperature of exposition Temperatura ekspozycji °C	Succinate: cytochrome c reductase nmoles cyt.c/min/mg protein Bursztynian: cytochrom c reduktaza nmole cyt.c/min/mg białka	n	Cytochrome oxidase μ moles cyt.c/min/mg protein Oksydaza cytochromowa μ mole cyt.c/min/mg białka	n
21	30.3 \pm 1.3	6	1.373 \pm 0.118	13
28	20.1 \pm 1.0*	6	1.557 \pm 0.151	5
35	28.4 \pm 1.5	6	1.217 \pm 0.111	5

Results are mean values \pm standard error of the mean.

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm średnie odchylenie od średniej arytmetycznej.

n — number of animals
liczba zwierząt

* / — significantly different at $p < 0.05$
różnice statystyczne znamienne $p < 0,05$

animals submitted to a temperature of 28°C the activity of succinate:cytochrome c reductase was depressed by about 34 per cent and remained unchanged when the temperature was raised to 35°C. It was, moreover, found that exposure to elevated temperature produces in the animals a depression of succinate dehydrogenase activity: in animals exposed to 28°C by about 16 per cent and somewhat higher, by about 22 per cent, in those exposed to 35°C (Fig. 2).

In order to find out whether the observed changes in respiratory enzyme activity after hyperthermia affect oxidation processes in the brain mitochondria, polarographic measurements of oxygen uptake were performed. The results are shown in Table 2 and indicate that under

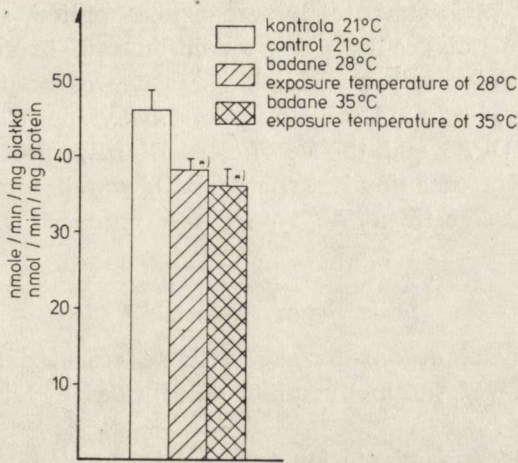


Fig. 2. Activity of brain mitochondrial succinate dehydrogenase of rats exposed to elevated ambient temperature. Values given are arithmetic means \pm SEM from at least 6 experiments. * — difference statistically significant at $p \leq 0.05$

Ryc. 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej mitochondriów mózgu szczurów poddanych działaniu podwyższonej temperatury środowiska. Podane wartości są średnią arytmetyczną \pm SEM z 6 doświadczeń. * — różnice znamienne statystycznie przy $p \leq 0,05$

Table 2. Effect of heat exposure on oxidative phosphorylation in brain mitochondria

Tabela 2. Wpływ ekspozycji cieplnej na oksydacyjną fosforylację w mitochondriach mózgu

Substrate Substrat	Temperature Temperatura °C	Oxygen uptake nmoles O ₂ /min/mg protein Zużycie tlenu nmoles O ₂ /min/mg białka		ADP/O	RCR	Number of animals Liczba zwierząt
		State 4 stan 4	state 3 stan 3			
Succinate	21	11.6 \pm 1.2	48.5 \pm 2.9	1.82 \pm 0.12	4.3 \pm 0.4	8
Bursztynian	28	10.7 \pm 1.5	45.8 \pm 3.1	1.72 \pm 0.21	4.2 \pm 0.3	6
	35	10.2 \pm 1.4	46.7 \pm 2.4	1.85 \pm 0.13	4.5 \pm 0.3	6
Glutamate + malate	21	9.8 \pm 0.6	39.5 \pm 2.1	2.68 \pm 0.13	4.4 \pm 0.5	8
Glutaminian jablczan	28	10.6 \pm 0.5	39.7 \pm 2.7	2.57 \pm 0.15	4.3 \pm 0.4	6
	35	10.3 \pm 0.7	38.2 \pm 3.2	2.72 \pm 0.11	4.1 \pm 0.5	6

Results are mean values \pm standard error of the mean

Wyniki są średnimi arytmetycznymi \pm średni błąd średniej arytmetycznej

RCR — respiratory control ratio
stosunek kontroli oddechowej

ADP/O — phosphorylation index
iloraz fosforylacyjny

Oxygen uptake was determined at 29°C by the polarographic method with use of an electrode of Clark

Zużycie tlenu oznaczano w temp. 29°C metodą polarograficzną przy użyciu metody Clarka.

the conditions of environmental hyperthermia applied, statistically significant changes do not occur in the oxidation rate in states 3 and 4 of brain mitochondrial respiration in the presence of respiratory substrate of succinate and glutamate with malate. The value of the phosphorylation quotient ADP/O and the coefficient of respiratory control of the brain mitochondria of animals exposed to elevated temperature do not show statistically significant differences as compared with those in the control groups.

DISCUSSION

In homoiothermal organisms subjected to elevated ambient temperature a new state of thermodynamic equilibrium develops (Puranam et al. 1984).

In circumstances of adaptation to thermically changed conditions the main changes concern the respiratory metabolism. Prolonged exposure of animals to elevated temperature causes a decrease of the oxidation rate in the mitochondria, especially in the liver, but the mechanism of oxidative phosphorylation is not disturbed (Swaroop, Ramasarma 1982). Depression of the oxidation rate is connected with a reduction of basal metabolism during exposure to heat. The process of depression of respiratory activity of the mitochondria is accompanied by a decrease of succinate dehydrogenase activity. Changes in the activity of this enzyme are rapid, they appear as early as after 12 h of exposure to elevated ambient temperature and further increase only slightly. Under conditions of thermal stress of long duration the cytochrome c, cytochromes $a+a_3$ and ubiquinone contents decrease in the liver mitochondria.

The results here presented indicate that environmental hyperthermia may modify respiratory enzymes in the brain mitochondria, the mechanism of these changes, however, remains unclear.

The enzymes of the respiratory chain investigated by us are lipid-dependent, functionally and structurally bound with the inner mitochondrial membrane. It was found that phospholipids are indispensable for ensuring their stability and subunit organisation. The role of phospholipid probably consists in inducing the most active enzymatic protein conformation. The membrane lipids are in a state of dynamic equilibrium, and local changes in their composition make allosteric control of their activity possible (Farias et al. 1975). The results of numerous authors indicate that modification of the activity of mitochondrial enzymes under conditions of elevated ambient temperature may be the consequence of temperature-induced changes in the phospholipid component (Johnston, Roots 1965; Raison 1973; Wodtke 1981). Such changes have been observed in the process of adaptation of animals to hyperthermia.

It is difficult at the present moment to ascertain whether under conditions of exposure of short duration to elevated ambient temperature

changes occur in the lipids of the mitochondrial membrane. The results of the present investigations indicate that in the model of environmental hyperthermia applied changes in oxidative phosphorylation do not occur in the brain mitochondria, this suggesting that there are no structural changes in the membrane. Under conditions of acute thermal stress, structural changes in the brain mitochondria occur consisting in disappearance of the cristae (Gwóźdź et al. 1978).

If we compare the changes in activity of the enzymes of the respiratory chain in the mitochondria of the brain and the liver (Skonieczna et al. 1986), occurring under short lasting hyperthermia, it may be affirmed that the character of these changes is similar. Under conditions of elevated ambient temperature an increase of activity of NADH:cytochrome c reductase and depression of activity of succinate:cytochrome c reductase and succinate dehydrogenase were observed. These changes were, however, percentually more pronounced in the liver mitochondria. It seems that the weaker reaction of the brain to hyperthermia may be due to the fact that this organ is specially protected from changing thermal conditions. The measurement of body temperature in animals on the successive days of exposure to 35°C performed by us showed a decreasing body temperature rise. It would seem that, owing to the switching on of an additional thermoregulative mechanism, the changes in the activity of enzymes of the respiratory chain are less pronounced in the brain mitochondria after exposure to 35°C.

Important seems also the observation that the action of the same thermal stimulus may have a different influence on the activity of mitochondrial enzymes. It is supposed that the diversity of biological response of the enzyme to the same environmental factor may be conditioned by a different lipid surrounding the particular membrane enzymes (Yoshida et al. 1979).

PROCESY UTLENIANIA W MITOCHONDRIACH MÓZGU SZCZURÓW PODDANYCH EKSPOZYCJI CIEPLNEJ

Streszczenie

Przeprowadzono badanie aktywności lipidozależnych enzymów łańcucha oddechowego mózgu u szczurów, które przez 3 kolejne dni przetrzymywano po 6 godzin dziennie w temperaturze 28°C lub 35°C. Aktywność enzymów mitochondrialnych oznaczano we frakcji cząstek submitochondrialnych. Szybkość oddychania oceniano metodą polarograficzną przy użyciu elektrody tlenowej Clarka.

W wyniku działania podwyższonej temperatury otoczenia stwierdzono znamienne statystycznie wzrost aktywności dehydrogenazy NADH, NADH:cytochrom c reduktazy oraz obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i bursztynian:cytochrom c reduktazy. Nie stwierdzono zmian aktywności oksydazy cytochromowej oraz szybkości zużycia tlenu w mitochondriach mózgu zwierząt nagrzewanych.

Z przeprowadzonych badań wynika, że podwyższona temperatura otoczenia (28°C, 35°C) powoduje modyfikację aktywności enzymów łańcucha oddechowego, natomiast pozostaje bez wpływu na procesy oddychania i oksydacyjnej fosforylacji mitochondriów mózgu.

ОКСИДАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫС ПОДВЕРГНУТЫХ ТЕПЛОВОЙ ЭКСПОЗИЦИИ

Резюме

Исследовались активность липидозависимых энзимов дыхательной цепи мозга крыс, которые были 3 очередные дня продерживаны 6 часов в температуре 21°C (контрольные случаи), 28°C или 35°C. Энзиматическая активность была обозначена во фракции субмитохондриальных частиц. Скорость дыхания митохондрий определялась полярографическим методом, употребляя кислородную электроду Clarka.

В результате повышенной температуры окружающей среды было обнаружено статистически знаменательное повышение активности дегидрогеназы NADH и NADH: цитохром с редуктазы и понижение активности сукцинат дегидрогеназы и сукцинат: цитохром с редуктазы. Не были обнаружены изменения активности цитохромовой оксидазы и скорости употребления кислорода в митохондриях мозга нагреваемых животных.

Исследования показывают, что повышенная температура среды (28°C, 35°C) вызывает модификацию активности энзимов дыхательной цепи, но не влияет на процесс дыхания и оксидативной фосфорилиции митохондрии мозга.

REFERENCES

1. Cassuto Y., Chaffee R. R.: Effects of prolonged heat exposure on the cellular metabolism of the hamster. *Am. J. Physiol.*, 1966, 210, 423—463.
2. Clark J. B., Niclas W. J.: The metabolism of rat brain mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4724—4731.
3. Dutkiewicz S. J., Krause M., Śpioch F. M.: Wpływ środowiska o wysokiej temperaturze i dużej wilgotności powietrza na zużycie tlenu i wyższą działalność nerwową. *Med. Pracy*, 1958, 2, 91—105.
4. Estabrook R. W.: Mitochondrial respiratory control and polarographic measurement of ADP:O ratios. In: *Methods in enzymology*. Eds.: R. W. Estabrook, M. E. Pullman, Academic Press, New York 1967, 10, 41—47.
5. Farias R. N., Bloj B., Morero R. D., Sineriz F., Trucco R. E.: Regulation of allosteric membrane bound enzymes through changes membrane lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, 415, 231—251.
6. Gwóźdź B., Dyduch A., Grzybek H., Panaz B.: Structural changes in brain mitochondria of mice subjected to hyperthermia. *Exp. Path.*, 1978, 15, 124—126.
7. Hazel J.: The effect of temperature acclimation upon succinic dehydrogenase activity from the muscle of common goldfish lipid reactivation of soluble enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1972, 43 B, 863—882.
8. Jansky L.: Body organ cytochrome oxidase activity in cold and warm-acclimated rats. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 1963, 41, 1847—1854.
9. Johnston P., Roots B. J.: Brain lipid fatty acids and temperature acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1965, 11, 303—309.
10. Karłyjew K. M.: Effect of high environmental temperature on oxygen consumption by the bodies of humans and animals. *Usp. Fizjol. Nauk*, 1985, 16, 109—121.

11. King T. E.: Reconstitution of respiratory chain enzyme systems. XI. Use of artificial electron acceptors in the assay of succinate-dehydrogenating enzymes. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 4032—4036.
12. King T. E., Horward R. L.: Preparation and properties of soluble NADH dehydrogenase from cardiac muscle. In: *Methods in enzymology*. Eds.: S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1967, 10, 275—294.
13. Musoyev K.: Effect of hyperthermia on the functions of mitochondria from rat small intestine mucosa. *Vop. Med. Khim.*, 1981, 27, 763—769.
14. Puranam R. S., Shiraswamy V., Kurup C. K., Ramasarma T.: Oxidations in kidney mitochondria of heat-exposed rats: regulation by cytochrome c. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1984, 16, 421—431.
15. Raison J. K.: The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane associated enzyme systems. *J. Bioenergetics*, 1973, 4, 285—309.
16. Roberts J. C., Chaffee R. R.: Metabolic and biochemical aspects of heat acclimation in the deer mouse, *Peromyscus maniculatus sonoriensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1976, 53 A, 367—369.
17. Skonieczna M., Kruszewska J., Nowak J., Bicz W.: Influence of raised temperature of the environment on oxidation processes in rat liver mitochondria. *Acta Physiol. Pol.*, 1986, 37, 157—167.
18. Smith L.: A study of some oxidative enzymes of bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 50, 285—298.
19. Sottocasa G. L., Kuylenstierna B., Ernster L., Bergstrand A.: An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biological and morphological study. *J. Cell Biol.*, 1967, 32, 415—438.
20. Swaroop A., Ramasarma T.: Changes in mitochondrial oxidative metabolism under conditions of heat stress. *Ind. J. Biochem. Biophys.*, 1982, 19, 382—387.
21. Swaroop A., Ramasarma T.: Heat exposure and hypothyroid conditions decrease hydrogen peroxide generation in liver mitochondria. *Biochem. J.*, 1985, 226, 403—408.
22. Spioch F. M., Chojnacka R., Płońska J.: Niektóre zmiany hemodynamiczne u człowieka pod wpływem gorąca. *Acta Physiol. Pol.*, 1958, 9, 740—756.
23. Wodtke E.: Temperature adaptation of biological membranes. The effect of acclimation temperature on the unsaturation of the main neutral and charged phospholipids in mitochondrial membranes of the carp (*Cyprinus Carpio L.*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 640, 698—709.
24. Wodtke E.: Temperature adaptation of biological membranes. Compensation of the molar activity of cytochrome c oxidase in the mitochondrial energy-transducing membrane during thermal acclimation of the carp (*Cyprinus Carpio L.*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 640, 710—720.
25. Yoshida S., Orii Y., Kawato S., Ikegari A.: Effect of temperature on cytochrome oxidase activity in solubilised form and in lipid vesicle system. *J. Biochem.*, 1979, 86, 1443—1450.

Authors' address: Dept. of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 1, Banacha Str., 02-097 Warszawa.

29 maja 1987 r. w trakcie XIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Neurologicznego odbyło się Walne Zgromadzenie członków PTN, na którym wybrano władze Towarzystwa w następującym składzie:

Prezes — prof. Teofan Domżał (Warszawa),
I Viceprezes — prof. Antoni Prusiński (Łódź),
II Viceprezes — prof. Henryk Chmielewski (Warszawa),
I Sekretarz — doc. Andrzej Szczudlik (Warszawa),
II Sekretarz — doc. Danuta Rościszewska (Zabrze),
Skarbnik — dr med. Stanisław Horski-Horończyk (Łódź),
Redaktor Naczelny „Neurologii i Neurochirurgii Polskiej” — prof. Jerzy Kulczycki (Warszawa),
Przewodniczący Komisji Nauki — prof. Mieczysław Wender (Poznań),
Przewodnicząca Komisji Współpracy z Zagranicą — prof. Irena Hausmanowa-Petrusewicz (Warszawa).

Członkowie Zarządu: prof. Jagna Czochońska (Warszawa), dr med. Fryderyk Fabian (Szczecin), prof. Cezary Fryze (Szczecin), doc. Wiesław Kawiak (Lublin), dr med. Olgierd Kossowski (Bielsko-Biała), prof. Roman Mazur (Bydgoszcz), dr med. Emilia Mierzejewska (Gdańsk), doc. Barbara Stroińska (Warszawa).

*

W czasie XIII Zjazdu PTN prof. Daniel Bartko wręczył dyplomy Członków Honorowych, nadane przez Czechosłowackie Towarzystwo Lekarskie im. Purkinjego:

— prof. Irenie Hausmanowej-Petrusewicz,
— prof. Teofanowi Domżałowi.

Godność Członków Honorowych PTN otrzymali: P. K. Thomas (Londyn), D. Bartko (Bratysława), F. Isch (Strasburg), M. Wereszczagin (Moskwa), H. Nielubowiczowa (Warszawa).

*

W czasie trwania Zjazdu PTN wręczone zostały po raz pierwszy odznaki „Zasłużony dla Polskiego Towarzystwa Neurologicznego”.

Otrzymali je: prof. Zofia Majewska, prof. Irena Hausmanowa-Petrusewicz, prof. Stanisława Falkiewiczowa, doc. Maria Filipowicz, prof. Zygmunt Kuligowski, dr med. Stanisław Horski-Horończyk.

ANDRZEJ R. SULIŃSKI, ELŻBIETA BERLIŃSKA,
WŁODZIMIERZ BICZ

EFFECT OF HIGH AMBIENT TEMPERATURE AND EXERCISE
ON LIPID PEROXIDATION AND PHOSPHOLIPID CONTENT
IN MICROSOMES OF RAT BRAIN AND LIVER *

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy,
Medical Academy, Warszawa

Increased ambient temperature is a factor which may cause disturbances in the composition and properties of biological membranes. This is particularly true as regards the phospholipid composition and fatty acids content (Sato, Murata 1980; Wodtke 1981). Changes in the quantitative proportion bring about qualitative modifications, disorders in the fluid-mosaic structure of the membranes, their permeability and enzymatic functions. Such changes may also occur in microsomal lipids. They may consist in a modified proportion of various phospholipids or changes in fatty acids composition. The changes in microsomal phospholipids may modify the activity of NADH: cytochrome c reductase and glucose-6-phosphatase (Chaplin, Mannering 1970; Coleman 1973). Phospholipids play also an essential role in reactions catalysed by cytochrome P-450 (Ingelman-Sundberg, Gustafsson 1975; Lu 1976). Changes in unsaturated fatty acids may among other causes, be the result of peroxidation processes associated with the formation of free-radical intermediate products (Hornsby, Crivello 1983; Frankel 1985). The peroxidation process is the basic mechanism injuring biological membranes. The fatty acids structurally changed during oxidation and neighbouring in the membranes with proteins may form unnormal combinations such as lipid-lipid or lipid-protein, this leading to inactivation of membrane enzymes (Tappel 1973). The peroxidation product — malonyldialdehyde — may react with amino groups inactivating a number of enzymes (Slater, Sawyer 1971; Jain 1984; De Groot, Noll 1985).

* This work was supported by Grant No. 06-02.II.3.6, from the Polish Academy of Sciences.

In consideration of these circumstance it seemed interesting to examine the phospholipid composition and the process of lipid peroxidation in brain and liver microsomes of rats after physical exertion in various thermal conditions.

MATERIAL AND METHODS

White male ten-week-old rats weighing 190–250 g were used for all experiments. They were kept in laboratory conditions with food and water *ad libitum* for at least 3 days and selected. Rats with physiological rectal temperature below 38°C were chosen and randomly divided into six experimental groups:

— 3 groups of animals not subjected to exercise, exposed 1 hour daily for six consecutive days to temperatures of 21°, 28° and 35°C, respectively, and

— 3 groups of rats, exposed to the same thermic conditions, and simultaneously trained on a moving belt with horizontal track at a speed of 10 m./min.

During the experiments, the rats were kept in a chamber with regulated temperature, air flow and controlled moisture of 45–69%. The rats were exercised on a moving belt located in a closed chamber with an electrical grid floor.

They were killed the day after the last exposure session. The brains and livers were quickly removed, weighed, rinsed with 0.25 M sucrose and homogenized in 4 volumes of the same sucrose solution in a Potter glass-teflon homogenizer. The microsomes were isolated by the method of Kamath and Rubin (1972). The final microsomal pellets were resuspended in an ice-cold solution of 1.15% KCl in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 and used for lipid extraction and for rate of lipid peroxidation and protein content estimation.

Lipids were extracted from the microsomes with methanol: chloroform (1:2) by Folch method (Folch et al. 1957).

For phospholipids estimation aliquots of lipid extracts were chromatographed according to the two-dimensional TLC method described by Peter and Wolf (1973). The phospholipid spots on silica gel were detected by means of iodine vapor and identified by comparison with standards, scraped off, transferred to centrifuge tubes and extracted by adding chloroform-methanol (2:1). After centrifugation the organic phase was evaporated under air flux, the residues were mineralized with perchloric acid and phosphorus contents were estimated by the method of Carter and Karl (1982).

The extent of lipid peroxidative damage was determined by quantitating malonyldialdehyde, and end product of fatty acid peroxidation, using the thiobarbituric acid method (Searle, Willson 1983). Aliquots of

the microsomal fraction were incubated at 37°C in Tris/KCl buffer, pH 7.4 containing 5 mM cysteine and 50 µM FeSO₄. A 3-ml aliquot of 10⁰/₀ trichloroacetic acid was added to the incubation mixture and the color reaction was developed after treating the solution with the thiobarbituric acid reagent and boiling the sample for 15 min. After cooling, the protein precipitate was centrifuged and absorption was read at 535 nm. Protein in the microsomal fractions was determined by the Lowry method (Lowry et al. 1951). The results were statistically elaborated by Student's t and Dixon's R tests.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of analysis of the phospholipid composition of the microsomal fraction of the liver of rats subjected to hyperthermia and physical exercise are shown in Table 1. It results from the data obtained that elevated temperature coupled with physical exercise does not affect significantly, under the conditions applied, the content of the determined phospholipids, similarly as elevated temperature alone does not. The results obtained indicate that in the liver microsomal fraction of rats exposed to 35°C the phosphatidylcholine content amounting to 296 nmoles

Table 1. Hepatic microsomal phospholipids contents in rats subjected to raised ambient temperature and physical exercise (nmoles Pi/mg of protein)

Tabela 1. Zawartość fosfolipidów w mikrosomach wątroby szczurów poddawanych działaniu podwyższonej temperatury otoczenia i wysiłku fizycznego (nmole Pi/mg białka)

Experimental model Model doświadczalny	Estimated phospholipids/Oznaczone fosfolipidy							
	phosphati- dylcholine fosfatydylo- cholina		phosphati- dylethanolamine fosfatydylo- etanolamina		phosphati- dylinositol fosfatydylo- inozytol		phosphati- dylserine fosfatydylo- seryna	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)
21°C	283±14	(7)	128±9	(7)	41±16	(7)	32±9	(6)
21°C + exercise wysiłek	278±21	(5)	126±20	(5)	39±12	(5)	31±8	(5)
28°C	285±34	(6)	127±18	(6)	38±15	(6)	28±6	(6)
28°C + exercise wysiłek	288±12	(6)	123±16	(6)	39±13	(6)	32±12	(6)
35°C	296±28	(5)	122±14	(5)	39±11	(5)	28±5	(5)
35°C + exercise wysiłek	286±19	(5)	121±16	(5)	38±2	(5)	28±7	(5)

$\bar{x} \pm S\bar{x}$ — arithmetic mean ± standard error of the mean
średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe średniej arytmetycznej
n — number of experiments
ilość doświadczeń

Pi/mg protein is somewhat higher than in animals kept at 21°C for which the determined amount is 283 nmoles Pi/mg protein. In the case of coupled action of raised temperature and physical exertion the amount of phosphatidylcholine remains practically unchanged, notwithstanding the temperature to which the animals were exposed and amounts to 283 nmoles Pi/mg protein at 21°C and 286 nmoles Pi/mg protein at 35°C.

Phosphatidylethanolamine content in liver microsomal fractions of rats is slightly depressed with rising exposure temperature and amounts at 21°C to 128 nmoles Pi/mg protein, at 28°C to 127 nmoles Pi/mg protein and at 35°C to 122 nmoles Pi/mg protein. A similar tendency is observed when rats are exposed to elevated temperature and simultaneously subjected to exercise. The phosphatidylinositol and phosphatidylserine contents are slightly decreased with rise of temperature; these differences amount to 10 per cent of the content. It was found at the same time that the additional element of physical exercise did not influence the phosphatidylinositol and phosphatidylserine contents.

The phospholipid composition of the brain microsomal fractions from rats subjected to elevated environmental temperature and physical exertion is presented in Table 2.

As seen, in the applied experimental conditions no significant changes are noted in the brain microsomal phospholipids as result of exposure

Table 2. Brain microsomal phospholipids contents in rats subjected to raised ambient temperature and physical exercise (nmoles Pi/mg of protein)

Tabela 2. Zawartość fosfolipidów w mikrosomach mózgu szczurów poddawanych działaniu podwyższonej temperatury otoczenia i wysiłku fizycznego (nmole Pi/mg białka)

Experimental model Model doświadczalny	Estimated phospholipids/Oznaczone fosfolipidy							
	phosphatidylcholine fosfatydylocholina		phosphatidylethanolamine fosfatydyloetanolamina		phosphatidylinositol fosfatydyloinozytol		phosphatidylserine fosfatydyloseryna	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)
21°C	576 ± 29	(6)	435 ± 21	(6)	112 ± 68	(6)	80 ± 10	(6)
21°C + exercise wysiłek	570 ± 18	(5)	430 ± 19	(5)	110 ± 6	(5)	75 ± 15	(5)
28°C	595 ± 31	(6)	415 ± 22	(6)	128 ± 10	(6)	75 ± 8	(6)
28°C + exercise wysiłek	575 ± 22	(6)	420 ± 16	(6)	116 ± 9	(6)	78 ± 18	(6)
35°C	584 ± 20	(6)	410 ± 24	(6)	130 ± 12	(6)	72 ± 11	(6)
35°C + exercise wysiłek	589 ± 24	(5)	415 ± 10	(5)	114 ± 11	(5)	68 ± 8	(5)

$\bar{x} \pm S\bar{x}$ — arithmetic mean ± standard error of the mean
średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe średniej arytmetycznej

n — number of experiments
ilość doświadczeń

of rats to high ambient temperature alone or with physical exercise. After exposure to 28°C and 35°C the phosphatidylcholine level is slightly higher than in control animals (kept at 21°C), reaching 595 nmoles Pi/mg protein at 28°C and 584 nmoles Pi/mg protein at 35°C. Similar results are obtained for groups of rats exposed to elevated temperature and simultaneously subjected to exercise.

The phosphatidylethanolamine content in brain microsomes of rats exposed to high ambient temperatures (28°C and 35°C) decreases somewhat as compared with that in animals exposed to 21°C, the differences are, however, statistically nonsignificant. The physical exertion applied simultaneously did not change the phosphatidylethanolamine content.

The content of phosphatidylinositol and phosphatidylserine in microsomes of rats exercised at various temperatures of environment also undergoes only slight modifications in dependence on the applied temperature.

The results of investigation of the peroxidative reaction in microsomes of the rat liver and brain in the groups exposed to elevated temperature and those simultaneously subjected to hyperthermia and physical exercise are shown in Table 3.

Table 3. Lipid peroxidation in liver and brain microsomes of rats subjected to elevated temperature and physical exercise (nmoles MDA/mg of protein)

Tabela 3. Peroksydacja we frakcjach mikrosomalnych wątroby i mózgu szczurów poddawanych działaniu podwyższonej temperatury oraz wysiłku fizycznego (nmole MDA/mg białka)

Tissue Tkanka	Experimental groups Grupy doświadczalne	Applied temperature/Stosowana temperatura					
		21°C		28°C		35°C	
		$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)
Liver Wątroba	LC Control — without exercise Kontrola bez wysiłku fizycznego	2.03 ± 0.29	(6)	1.59 ± 0.26*	(6)	1.74 ± 0.10*	(5)
	LE Exercised Poddawane wysiłkowi fizycznemu	2.20 ± 0.47	(7)	1.41 ± 0.19*	(6)	1.65 ± 0.20*	(6)
Brain Mózg	BC Control — without exercise Kontrola bez wysiłku fizycznego	6.72 ± 0.85	(6)	5.84 ± 0.54	(6)	5.89 ± 0.60	(5)
	BE Exercised Poddawane wysiłkowi fizycznemu	6.54 ± 0.61	(6)	5.02 ± 0.62	(5)	5.10 ± 0.74	(6)

$\bar{x} \pm S\bar{x}$ — arithmetic mean ± standard error of the mean
średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe średniej arytmetycznej

n — number of experiments
ilość doświadczeń

* — statistical significance: $p < 0.05$
znamienność statystyczna; $p < 0,05$

It results from the presented data that a rise of ambient temperature depresses the peroxidation of the liver microsomal fraction from rats not loaded with exercise as well as from those making physical effects. In the groups not subjected to physical exercise, but exposed to elevated temperature, peroxidative activity in the liver microsomes decreases from 2.03 ± 0.29 nmoles MDA/mg protein at 21°C to 1.59 ± 0.26 nmoles MDA/mg protein at 28°C . In the groups of rats exposed to 35°C peroxidative activity in the liver microsomes was 1.74 ± 0.10 nmoles MDA/mg protein. The differences in the peroxidative activity values in microsomes of rats between the groups exposed to 21°C and those exposed to 28°C and 35°C are statistically significant.

In liver microsomes of rats subjected simultaneously to physical exercise and hyperthermia there also are differences in peroxidative activity. For rats kept at 21°C this activity was 2.20 ± 0.47 nmoles MDA/mg protein and for those at 28° and 35°C it was 1.41 ± 0.19 and 1.65 ± 0.20 nmoles MDA/mg protein, respectively. The differences in this case are also statistically significant. The peroxidation is most depressed in the microsomal rat liver fractions in the group exposed to 28°C , independently whether there is an additional load of exercise or not.

It results from the data included that exercise as an additional element did not have in any of the combinations with elevated temperature a statistically significant influence on peroxidative activity. It should, however, be mentioned that the peroxidative activity of liver microsomes from rats subjected simultaneously to elevated temperature and exercise is slightly lower than in animals exposed exclusively to hyperthermia.

As regards brain microsomes, elevated ambient temperature during the experiment also caused a depression of the amounts of TBA-reactive substances, this indicating a reduced peroxidation. These values are at 21°C 6.72 nmoles MDA, at 28°C 5.84 nmoles MDA in conversion to 1 milligram microsomal protein. The differences are statistically non-significant. In the microsomes of animals subjected to exercise under varying thermal conditions there also are differences in peroxidation. In this case too there is a similar tendency, as in animals exposed to the action of temperature exclusively, to a depression of peroxidation with higher exposure temperature. For rats kept at 21°C the values are 6.34 nmoles MDA, at 28° 5.02 nmoles MDA and at 35°C 5.10 nmoles MDA and differences are significant. At the same time, exercise also decreases (at all tested temperatures) the amount of the determined substances reacting with TBA, although the differences are not significant. This may be due to a considerable dispersion of results.

The present investigations indicate that, under the conditions of thermic and exertion loading of the rat organism, no significant changes

occur in the composition of the microsomal phospholipids of the rat brain and liver.

On the other hand, a depression of peroxidative activity was noted both as the result of elevated temperature and of exercise. It is known from the literature that studies on the influence of physical exercise on peroxidation were mainly performed on skeletal muscles and lungs, and that their results were not univocal (Salminen, Vihko 1983; Salminen et al. 1984). Such results may be due to the specificity of the examined tissue, the content of compounds acting as antioxidants or to the accessibility of oxygen to the tissue (Brady et al. 1979). Oxygen in the tissue may induce peroxidation by producing free radicals of oxygen capable of initiating the peroxidation process of lipids. Changes in oxygen concentration in the tissue as the result of elevated temperature or exercise may, therefore, be responsible for changes in peroxidation. It is possible that a strengthened free radicals scavenger system may also play a role here. It is believed that further extension of the studies to these elements of the peroxidation system would be useful.

WPLYW PODWYŻSZONEJ TEMPERATURY OTOCZENIA
I WYSIŁKU FIZYCZNEGO NA PEROKSYDACJĘ LIPIDÓW
I ZAWARTOŚĆ WYBRANYCH FOSFOLIPIDÓW
W MIKROSOMACH MÓZGU I WĄTROBY SZCZURA

Streszczenie

Badania przeprowadzono na szczurach, które poddawano 1-godzinnej ekspozycji na temperatury 21°C, 28°C lub 35°C przez 6 kolejnych dni. Połowę zwierząt obciążano jednocześnie wysiłkiem fizycznym przez umieszczenie ich na bieżni wysiłkowej.

Stwierdzono, że zarówno wyłączone działanie podwyższonej temperatury otoczenia, jak i skojarzone działanie temperatury i wysiłku fizycznego prowadzi w mikrosomach mózgu oraz wątroby szczurów do zmniejszenia ilości TBA-reaktywnych substancji, będących miarą peroksydacji lipidów. W przypadku wyłączonego działania podwyższonej temperatury wynosi ono dla mikrosomów wątroby około 20% (temperatura 28°C) i 15% (temperatura 35°C) w porównaniu do szczurów kontrolnych (temperatura 21°C). W mikrosomach mózgu różnice te są mniejsze i wynoszą około 10–15%. Wysiłek fizyczny, jako współdziałający element obciążający, pogłębia efekt spadku poziomu peroksydacji zarówno w mikrosomach mózgu, jak i wątroby.

W zastosowanych modelach termicznego i wysiłkowego obciążenia organizmu nie stwierdzono zmian w składzie badanych fosfolipidów mikrosomalnych mózgu oraz wątroby.

**ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ
СРЕДЫ И ФИЗИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ
НА ПЕРОКСИДАЦИЮ ЛИПИДОВ И СОДЕРЖАНИЕ ИЗБРАННЫХ ФОСФОЛИПИДОВ
В МИКРОЗОМАХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫСЫ**

Резюме

Исследования были проведены на крысах, которые подвергались одночасовой экспозиции на температуру среды 21°C, 28°C и 35°C в течение 6-ти очередных дней. Половина животных получала одновременно физическую нагрузку на беговой напрягательной дорожке. Так действие повышенной температуры среды исключительно, как и соединенное действие температуры и физической нагрузки ведет в микросомах мозга и печени крыс к уменьшению количества ТВА — реактивных веществ определяющих пероксидацию липидов. При исключительном действии повышенной температуры уменьшение это в микросомах печени составляет около 20% при температуре 28°C и 15% при температуре 35°C по сравнению с контрольными животными (21°C). В микросомах мозга эти различия меньшие и составляют около 10—15%.

Физическая нагрузка, усиливающая напряжение, углубляет эффект снижения уровня пероксидации, как в микросомах мозга так печени.

В примененных моделях термической нагрузки и физического напряжения организма не обнаружено изменения в составе исследованных микросомальных фосфолипидов мозга и печени.

REFERENCES

1. Brady P. S., Brady L. J., Ullrey D. E.: Selenium, vitamin E and the response to swimming stress in the rat. *J. Nutr.*, 1979, 109, 1103—1109.
2. Carter S. G., Karl D. W.: Inorganic phosphate assay with malachite green: An improvement and evaluation. *J. Biochem. Methods*, 1982, 7, 7—13.
3. Chaplin M. D., Mannering G. J.: Role of phospholipids in the hepatic microsomal drug-metabolising system. *Molec. Pharmacol.*, 1970, 6, 631—640.
4. Coleman R.: Membrane bound enzymes and membrane ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 300, 1—30.
5. Folch J., Less M., Sloane-Stanley S. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—509.
6. Frankel E. N.: Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Progr. Lipid Res.*, 1985, 23, 197—221.
7. De Groot H., Noll T.: The critical steady-state hypoxic conditions in carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 795, 365—362.
8. Hornsby P. J., Crivello J. F.: The role of lipid peroxidation and biological antioxidants in the function of the adrenal cortex. *Molec. and Cell Endocrinol.*, 1983, 30, 1—11.
9. Ingelman-Sundberg M., Gustafsson J.: The role of phospholipids in cytochrome P-450 catalysed reactions. *Biochem. Soc. Trans.*, 1975, 3, 977—980.
10. Jain S. K.: The accumulation of malonyldildehyde, a product of fatty acid peroxidation, can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 3391—3394.
11. Kamath S. A., Rubin E.: Interaction of calcium with microsomes. A modified method for the rapid isolation of rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 49, 52—59.

12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. chem.*, 1951, 193, 265—269.
13. Lu A. Y. H.: Liver microsomal drug-metabolizing enzyme system: functional components and their properties. *Fed. Proc.*, 1976, 35, 2460—2463.
14. Peter H. W., Wolf H. U.: A new method for the *in situ* determination of phospholipids after thin-layer separation. *J. Chromatogr.*, 1973, 82, 15—30.
15. Salminen A., Vihko V.: Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation *in vitro*. *Acta Physiol. Scand.*, 1983, 117, 109—113.
16. Salminen A., Kainulainen H., Vihko V.: Endurance training and antioxidants of lung. *Experientia*, 1984, 40, 822—823.
17. Sato N., Murata N.: Temperature shift-induced responses lipids in the blue-green *Alga Anabaena Variabilis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 619, 353—366.
18. Searle A. J. F., Willson R. L.: Stimulation of microsomal lipid peroxidation by iron and cysteine. *Biochem. J.*, 1983, 212, 549—554.
19. Slater T. F., Sawyer B. C.: The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions *in vitro*. *Biochem. J.*, 1971, 123, 805—814.
20. Tappel A. L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.*, 1973, 32, 1870—1975.
21. Tappel A. L.: Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipids peroxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1980, 355, 18—31.
22. Wodtke E.: The effects of acclimation temperature on the unsaturation of the main neutral and charged phospholipids in mitochondrial membranes of the carp. *Biochim. Biophys. Acta*, 1981, 640, 698—709.

Authors' address: Dept. of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 1, Banacha Str., 02-097 Warszawa.

*

Również w czasie Zjazdu wręczone zostały przyznane przez Zarząd Główny PTN nagrody im. Józefa Babińskiego.

Otrzymali je:

- kol. Jacek Bojakowski z Kliniki Neurologicznej AM w Warszawie,
- kol. Andrzej Szczudlik z Kliniki Neurologicznej WAM w Warszawie.

*

2 czerwca 1987 r. odbyło się przed Radą Naukową Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie kolokwium habilitacyjne dr med. Wandy Sobczyk z Kliniki Diagnostyki i Terapii Chorób Układu Nerwowego IPN. Tematem pracy była „Analiza zagadnień kliniczno-diagnostycznych i prób leczenia SSPE na podstawie 125 przypadków”.

*

Rada Naukowa CMDiK PAN nadała stopnie naukowe doktora nauk medycznych następującym osobom:

— Elżbiecie Kida, na podstawie rozprawy pt. „Obraz zmian morfologicznych w Ośrodkowym układzie nerwowym u chorych z zespołem parkinsonowskim towarzyszącym miażdżycy naczyń”. Promotorem pracy była doc. Krystyna Renkawek. Obrona pracy odbyła się 22 kwietnia 1987 r.

— Pawłowi Grochowiczowi, na podstawie rozprawy pt. „Allogeniczny przeszczep nerwu obwodowego u biorców poddanych immunosupresji cyklosporyną A”. Promotorem pracy był prof. Waldemar Olszewski. Obrona pracy odbyła się 22 kwietnia 1987 r.

— Wandzie Gordon-Majchrzak na podstawie rozprawy pt. „Zmiany właściwości biochemicznych zakończeń synaptycznych mózgu pod wpływem wolnorodnikowego utleniania *in vitro* i *in vivo*”. Promotorem pracy był doc. Jerzy Łazarewicz. Obrona odbyła się 25 czerwca 1987 r.

Jerzy Dymecki

TEOFAN DOMŻAŁ¹,
KRYSTYNA RENKAWEK², BOŻENA ZALESKA¹

A CASE OF MEIGE'S DISEASE.
CLINICAL AND MORPHOLOGICAL STUDY

¹Department of Neurology, Postgraduate Medical Education Centre, Military Medical Academy, Warsaw, ²Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Research Center, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

The syndrome of involuntary facial movements was described firstly by H. Meige in 1910. The clinical picture of this disease has been very rarely described in the literature until 1981, when Tolosa published an extensive study based on the observation of 17 cases of Meige's disease. Although the clinical picture is well characterized, pathomorphological changes in the brain are poorly known and are confined to the case described by Altrocchi and Forno (1983). The present case represents clinical and neuropathological changes characterizing this rare disease.

CASE REPORT

Patient P. K., male, 60 years old was admitted to the Neurological Department in March 1984 because of intensive involuntary movements involving the muscles of the face, neck and throat. These hyperkineses had a form of bilateral, tonic, non-rhythmic contractions lasting from 20 to 60 seconds. The contraction started in the orbicularis oculi muscles causing tight shutting of the eyelids, and spread within several seconds to the muscles of the lower part of the face and neck causing trismus, involuntary smile and contraction of the neck muscles with flexion of the head towards the chest. When the patient was eating, spasm of the masticatory muscles caused chewing difficulties, spasm of the pharyngeal muscles caused dysphagia and choking. The strength and frequency of these involuntary movements increased during emotion and motor activities, decreased in recumbent position, disappeared in sleep. The hyperkineses impaired greatly the everyday functions of the patient.

The disease began 4 years earlier when involuntary movements appeared. These movements occurred initially as mandible movements ap-

pearing only during eating or after long talk. After several months blepharospasm appeared, and successively spasm of the neck muscles. Because of the intensiveness of hyperkineses the patient was readmitted to the Clinic in 1982 and 1983. During hospitalization clinical syndrome allowed to diagnose Meige's disease. In the initial period of the illness, the involuntary movements caused difficulties in everyday life leading to a disabled condition during 30 months of the disease duration. During two years of observation various tentatives of treatment were undertaken. The patient received successively and in various combinations diazepam, carbamazepine, orap, rivotril, haloperidol, parlodel, nakom, baclofen, bimanol or prostigmine. After nearly all changes of treatment a short-lasting transient improvement occurred. The best effect was achieved with haloperidol, 15 drops thrice daily with clonazepam, 4—8 mg daily. The involuntary movements never disappeared completely, only their frequency and intensity decreased. In 1972 the patient had a myocardial infarction. For several years he had suffered from hypertension (180/100 mm Hg).

Physical examination during the whole period of hospitalization did not demonstrate any abnormalities of the internal organs. Neither did neurological examination disclose any abnormalities apart from the involuntary movements.

The routine laboratory investigations: ESR, blood cell count, electrolytes, plasma proteins, ECG, chest x-ray — gave normal results. EEG — the background activity was 8—16 c/sec, irregular, symmetrical. Activation caused no changes in the record. The cerebrospinal fluid revealed a pressure of 90 mm H₂O, it was clear, the protein level was 0.38 g/l, cell count 4 M/L. Computerized tomography demonstrated a normal pattern of the intracranial structures.

During the last hospitalization the patient developed suddenly a fever and bronchopneumonia in a radiogram. The course of the disease was severe, with rapid progression and without positive response to antibiotics. The patient died after two days of therapy.

General postmortem examination revealed purulent bronchopneumonia with confluence of inflammatory foci in the basal and paravertebral segments of the lungs. Disseminated necrosis of myocardial fibres. Widespread atheromatosis of the aorta and peripheral vessels, particularly far advanced in the coronary and renal arteries. A postinfarction scar in the upper part of the posterior wall of the left ventricle and in the lower part of the ventricular septum and apex.

Neuropathological examination

The brain, fixed in formol weighed 1540 g. The leptomeninges were transparent. No distinct morphological damage was seen except small extravasations in the front-temporal area. The vessels on the brain base

were collapsed, some atheromathous plaques at the site of bifurcation were visible. On cross-sections of the brain the ventricular system was normal. Small cavities in the both basal ganglia were found. Brain stem and cerebellum were unchanged. Sections from the basal ganglia, frontal and temporal lobe, brain stem and cerebellum were taken. They were embedded in paraffin, stained with hematoxylin and eosin, the Bielschowsky, Holzer and van Gieson methods.

Microscopical findings

Microscopical abnormalities were confined to the caudate nucleus and putamen throughout the length of these structures, including the tail of the caudate. There was widespread, uneven loss of nerve cells accompanied by severe cellular gliosis replacing neuronal cells (Fig. 1). A decreased number of neurons was present both in the caudate nucleus and in the putamen structures, but it was most pronounced in the dorsal part of the head of the caudate and throughout the dorsal putamen. The cell loss involved mainly large and medium size neurons. In certain areas of the head of the caudate nucleus no nerve cells but intensively proliferative glia cells were visible (Fig. 2). Proliferation of the glial

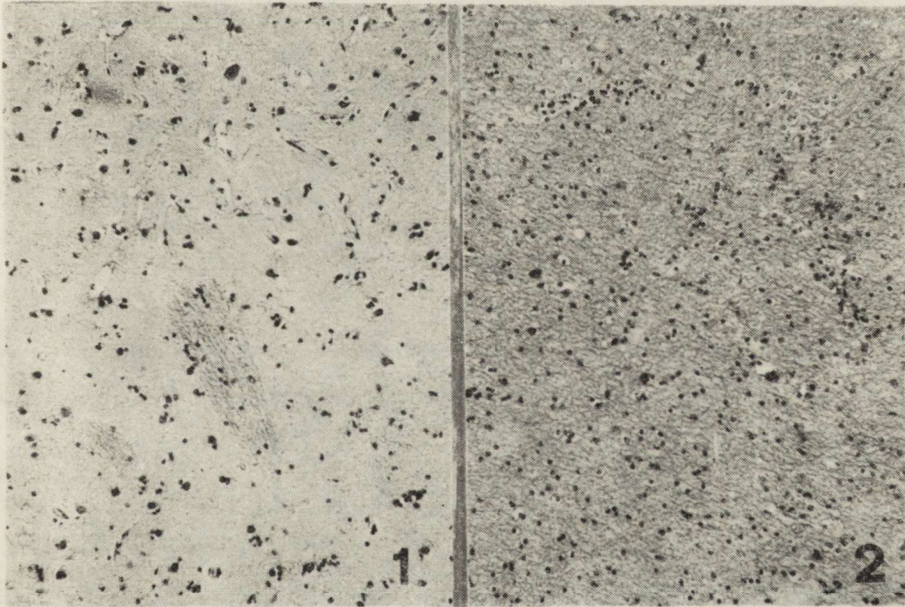


Fig. 1. Basal ganglia; dorsal part of putamen. Widespread loss of neurons. Increased number of glial cells at the places of neuronal loss. H—E. $\times 200$

Ryc. 1. Zwoje podstawy; część grzbietowa skorupy. Rozlane ubytki neuronów z towarzyszącą glejową komórkową. H—E. Pow. $200 \times$

Fig. 2. Cross-section through the caudate nucleus. Spongy loosening of interstitial tissue. Diffuse neuronal loss and gliosis. H—E. $\times 120$

Ryc. 2. Przekrój przez jądro ogoniaste. Gąbczasta struktura tkanki, ubytki neuronów i glejoza. H—E. Pow. $120 \times$

fibrils was very weak as compared with the intensive multiplication of astrocytes. The adjacent globus pallidus displayed mild gliosis without nerve cell loss.

On successive cross-sections of the striatum diffuse rarefaction of the tissue was observed (Figs 2, 3, 4) leading to a spongiotic or cribrate state. These changes were specially intensive in the dorsal part of the putamen. Between small cavities a great number of proliferating glial cells were accumulated interstitially (Fig. 4). In the same areas status

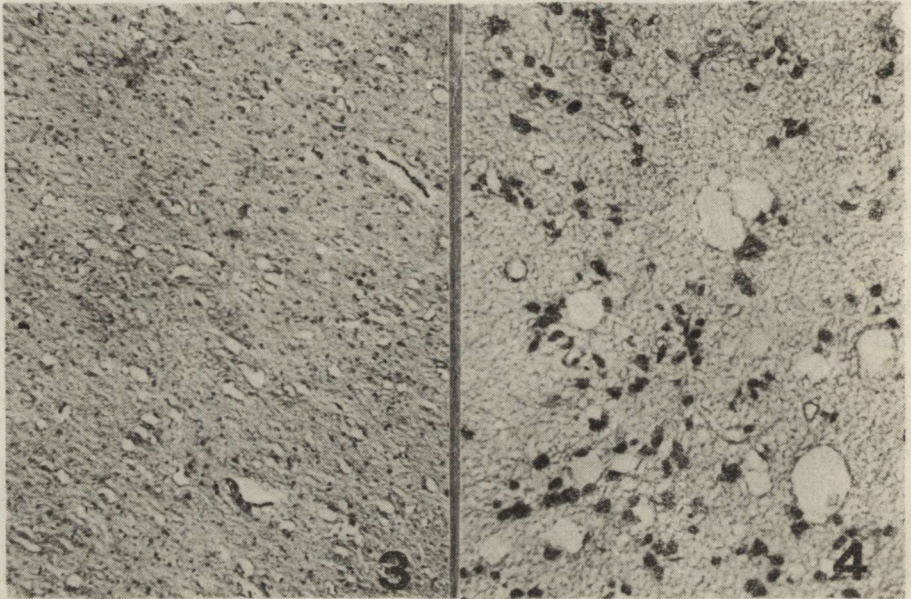


Fig. 3. Dorsal part of nucleus caudatus. Spongy state and widening of the perivascular spaces. H—E. $\times 80$

Ryc. 3. Część grzbietowa jądra ogoniastego. Stan gąbczasty i poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych. H—E. Pow. $80 \times$

Fig. 4. Dorsal part of putamen. Enhanced spongy state with cellular gliosis. H—E. $\times 400$

Ryc. 4. Część grzbietowa skorupy. Stan gąbczasty z glejową komórkową. H—E. Pow. $400 \times$

cribrosus or foci of tissue necrosis were seen (Fig. 5). Usually the necrotic areas were not accompanied by proliferating vessels or intensive gliosis (Fig. 6). They represented different stages of advanced tissue rarefaction or small foci of tissue loosening.

In the striatum, in the vicinity of necrotic areas as well as in the tissue without spongiotic changes the vessels were often surrounded by wide perivascular spaces and rarefied tissue. Around certain vessels perivascular necrosis of gradually decreasing intensity extended towards the surrounding tissue (Fig. 7). The walls of the small vessels showed no evidence of hyalinization while the larger vessels exhibited great thickening of all layers and proliferative changes of adventitia (Fig. 8).

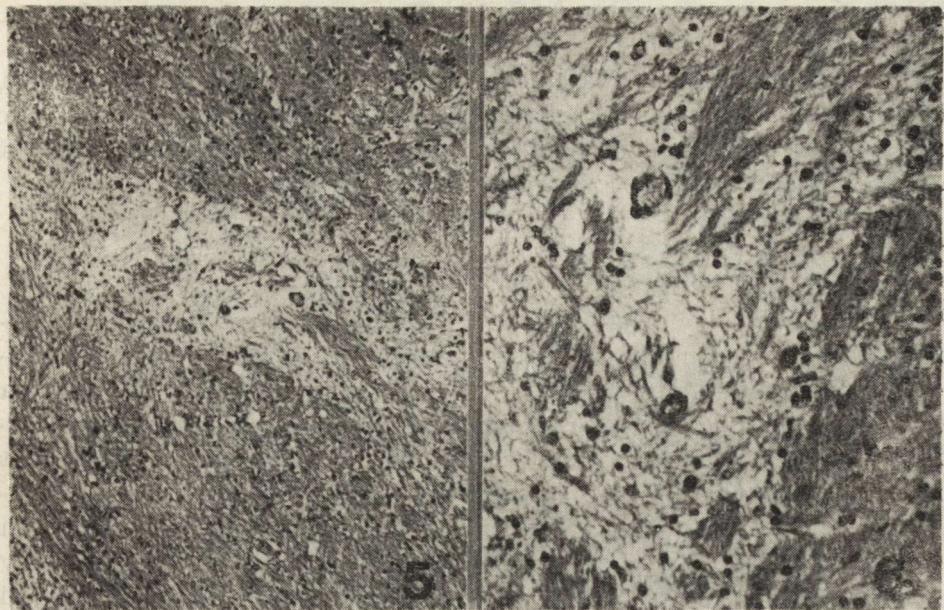


Fig. 5. Putamen, focal status spongiosus and small confluent foci of necrosis.
H—E. $\times 100$

Ryc. 5. Skorupa, ogniska zęabczenia i drobne zlewające się ogniska martwicy.
H—E. Pow. 100 \times

Fig. 6. Putamen, a high magnification of necrotic foci. H—E. $\times 400$

Ryc. 6. Skorupa, obraz martwicy. H—E. Pow. 400 \times

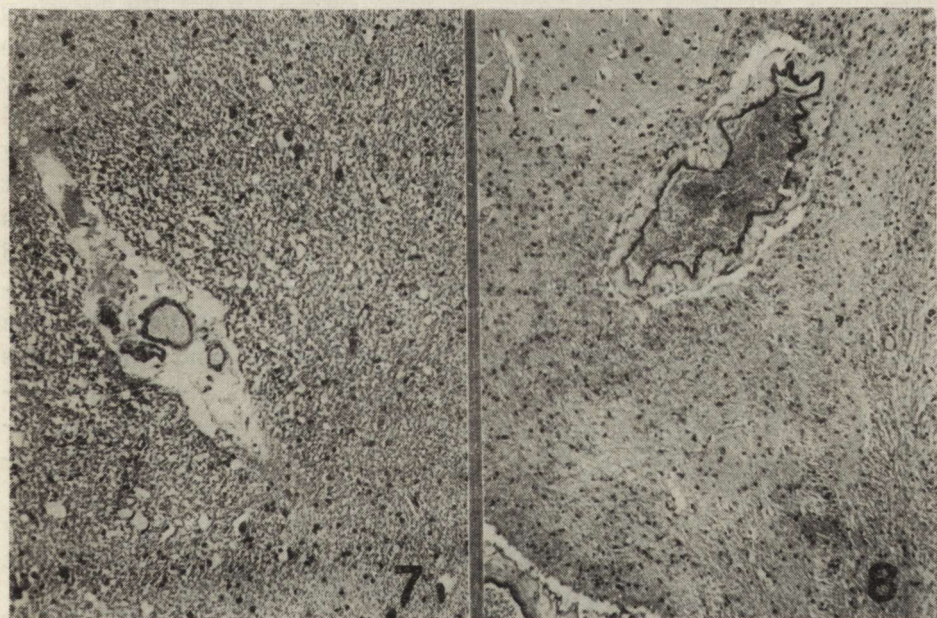


Fig. 7. Putamen, vessels with perivascular necrosis. H—E. $\times 150$

Ryc. 7. Skorupa, martwice okołonaczyniowe. H—E. Pow. 150 \times

Fig. 8. Thickened vessel wall, hypertrophy of adventitia, Van Gieson. $\times 100$

Ryc. 8. Pogrubienie ścian naczyń, przerost przydanki. Van Gieson. Pow. 100 \times

In the remaining structures of the basal ganglia cell loss was slight, in the thalamus, and subthalamic nucleus no structural changes were observed. The brain stem and cerebellum were unaffected. Vascular changes or senile plaques were not seen in the cortex.

DISCUSSION

Clinical manifestations of the patient's disorder corresponded to similar cases described in the literature and diagnosed as spontaneous oral-facial dyskinesia (Altrocchi 1972; Paulson 1972; Marsden 1976; Tolosa 1981). As in the described case, blepharospasm and oro-mandibular dystonia predominated in the clinical picture but also other combinations of facial spasm, dysarthria or dysphagia could be present (Tolosa, Klawans 1979; Gollomp et al. 1981). Although Meige's disease has been considered a basal disorder of ganglia, signs in the limbs were usually not prominent (Altrocchi 1972; Tolosa, Klawans 1979). Neuropathological descriptions of clinically typical cases of Meige's disease reported a unique pattern of neuronal loss and gliosis giving a mosaic appearance in the caudate and putamen structures (Altrocchi, Forno 1983). On the other hand, Garcia-Alba et al. (1981) providing complete neuropathological analysis of a case of spontaneous oral-facial dyskinesia found no abnormalities in the basal ganglia or elsewhere.

The present case represents neuropathological changes confirming the clinical diagnosis of Meige's disease as a disease of basal ganglia. The neuropathological picture generally corresponded to the case previously described by Altrocchi and Forno (1983) in the sense of neuronal cell loss and gliosis situated in the striatum, but the presence of spongy state and tissue necrosis was not observed as it was found in the present case. Tissue necrosis might have been a result of vascular wall changes which could explain the greater intensity of necrotic changes around the vessels and spread of necrosis from the vessels. However, focal necrosis within the tissue was also seen without any connection with the vessels. It is possible that the *status spongiosus* in this syndrome belongs to the morphological pattern of basal ganglia structural changes in Meige's disease. Similar necrotic changes in the putamen were also described in other forms of basal ganglia dyskinesia observed in liver dysfunction caused by cancer metastasis (Kida et al. 1984).

The variability of the clinical manifestation in Meige's disease may correspond to different neuropathological findings, but also suggests that Meige's disease may be a syndrome of different causes.

PRZYPADEK CHOROBY MEIGE'A.
BADANIE KLINICZNO-MORFOLOGICZNE

Streszczenie

Przedstawiono obraz kliniczny i neuropatologiczny choroby Meige'a u 60-letniego mężczyzny. Poza hiperkinezami mięśni twarzy, u chorego nie występowały żadne inne objawy uszkodzenia układu nerwowego. Stan ogólny chorego był prawidłowy, poza występującym okresowo nadciśnieniem tętniczym rzędu 180/100 mm Hg. Pacjent był leczony wieloma lekami bez wyraźnej poprawy. Zmarł wskutek zaburzeń oddechowych w przebiegu zapalenia płuc. W obrazie neuropatologicznym widoczny był znacznie nasilony zanik neuronów w jądrze ogoniastym, glejoza komórkowa oraz rozsiane ogniskowe zgąbczenie tkanki. Wybiórczość występowania zmian w strukturach prądkowia sugeruje rozpoznanie choroby Meige'a jako wynik uszkodzenia zwojów podstawy, zwłaszcza jądra ogoniastego.

СЛУЧАЙ БОЛЕЗНИ MEIGE'A
Клинико-морфологическое исследование

Резюме

Представлено клиническую и морфологическую картину болезни Meige'a у 60-летнего мужчины. Кроме гиперкинезов лицевых мышц, не было никаких других симптомов повреждения нервной системы. Общее состояние больного было нормальное, кроме периодически появляющейся гипертонии 180/100 mm Hg. Пациент лечился многочисленными лекарствами без отчетливого улучшения. Умер вследствие воспаления легких. Невропатологическое исследование показало значительную атрофию нейронов в хвостатом ядре, клеточный глиоз и рассеянный очаговый спонгиоз ткани. Селективность появления изменений в полосатом теле внушает диагноз болезни Meige'a вследствие повреждения подкорковых узлов, особенно полосатого тела.

REFERENCES

1. Altrocchi P. H.: Spontaneous oral-facia dyskinesia. Arch. Neurol., 1972, 26, 506—512.
2. Altrocchi P. H., Forno L. S.: Spontaneous oral-facial dyskinesia: neuropathology of a case. Neurology, 1983, 33, 802—805.
3. Garcia-Alba E., Franch O., Munoz D., Reco J. R.: Brueghel's syndrome, report of a case with postmortem studies. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1981, 44, 437—440.
4. Gollomp S., Ilson J., Burke R., Reches A., Fahn S.: Meige syndrome: a review of 31 cases. Neurology (N.Y.), 1981, 31, 78.
5. Kida E., Renkawek K., Piórek T.: Obraz neuropatologiczny nasilonej dyskinezy twarzowo-językowej. Neuropat. Pol., 1984, 22, 387—397.
6. Marsden C. D.: Blepharospasm-oramandibular dystonia syndrome (Brueghel's syndrome). J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 1976, 39, 1204—1249.
7. Meige H.: Les convulsion de la face, une forme clinique de convulsion faciale bilaterale et mediane. Rev. Neurol., 1910, 21, 437—443.
8. Paulson G. W.: Meige's syndrome. Geriatrics 1972, 27, 69—73.

9. Tolosa E. S.: Clinical features of Meige's disease (ethiopathic oral-facial dystonia). *Arch. Neurol.*, 1981, 38, 145—151.
10. Tolosa E. S., Klawans H. L.: Meige's disease: a clinical form of facial convulsions, bilateral and medial. *Arch. Neurol.*, 1979, 36, 635—637.

Authors' address: Dept. of Neurology, Postgraduate Education Centre, Military Medical Academy, 128, Szaserów Str., 00-909 Warszawa.

W. MÜLLER¹, I. REIFFERSCHIEDT¹, R. FIRSCHING²

ONCOCYTIC TRANSFORMATION IN CHOROID PLEXUS PAPILLOMA. LIGHTMICROSCOPIC STUDY OF TWO CASES

Department of Pathology¹ and Department of Neurosurgery²
of the University of Cologne, GFR

In 1983 Kepes reported an autopsy case of a young woman with oncocyctic transformation of the choroid plexus epithelium in all cerebral ventricles. She had died of Leigh's disease. Two years later Stefanko and Vuzvski (1985) described an oncocyctic variant of choroid plexus papilloma in two elderly patients. Since these tumours are obviously very rare, two further case reports seem justified.

MATERIAL AND METHODS

The specimens were fixed in formalin and embedded in paraffin. The tissue was sectioned at 7 μ m intervals, and the following staining techniques were applied: hematoxylin and eosin, Heidenhain's iron hematoxylin, Masson's trichrome stain, Klüver and Barrera's Luxol fast blue technique, Gordon's silver impregnation for reticulin fibres, amido black stain (Geyer 1960), PAS technique, and colloidal iron binding reaction of Hale. Smears from portions of the specimens were used for phase-contrast microscopy. Electron microscopy preparations from the paraffin embedded material gave no useful results.

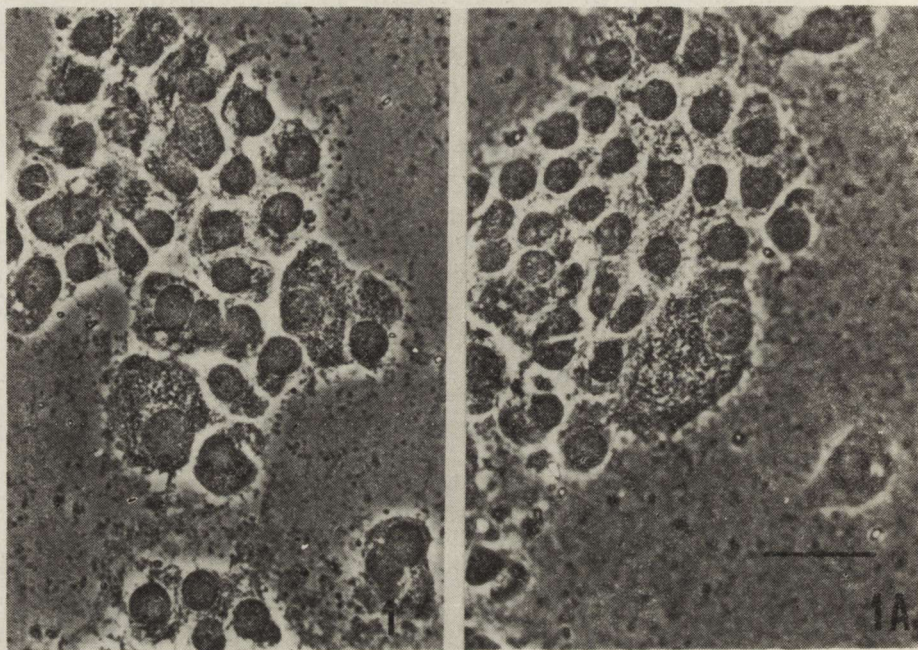
CASE REPORTS

Case 1: A 47-year-old male had a four year history of headaches and a three year history of visual problems prior to hospitalization. Upon admission a midline space occupying lesion of the posterior fossa was diagnosed. A greyish-red soft tumour was removed from the fourth ventricle at operation.

Case 2: A 22-year-old male suffered from increasing headaches and visual disorders after a motorcycle accident. A space occupying lesion in the right lateral ventricle was diagnosed. A soft tumour was removed at operation.

RESULTS

Phase contrast microscopy of smear preparations showed tumour cells between 15 and 20 μm in diameter, ranging up to 30 μm , with a remarkable number of intracytoplasmic granules. The nuclei were frequently large, with prominent nucleoli (Fig. 1). No mitotic figures were seen. After staining with iron hematoxylin the granules appeared intensely



Figs 1—1A. Large cells with abundant intracytoplasmic granules between normal sized cells. Smear preparation; phase contrast; marker 30 μm

Ryc. 1—1A. Duże komórki z obfitą ilością ziarnistości śródplazmatycznych widoczne pomiędzy komórkami normalnej wielkości. Preparat z rozmazu. Kontrast fazo-sized cells. Smear preparation; phase contrast; marker 30 μm

black (Fig. 2). Sections of the paraffin-embedded specimens in both cases show the typical appearance of a choroid plexus papilloma, with large, seemingly benign epithelial cells arranged in nests as well as scattered sporadically throughout the tumour parenchyma. Hematoxylin and eosin stains show these epithelial cells to contain eosinophilic, different-sized cytoplasmic granules closely packed together. They appeared black with iron hematoxylin staining, dark violet with Masson's trichome stain, and moderately blue with Luxol fast blue technique (Fig. 3). With PAS and Hale's reaction they are positive. They appeared blue to black in the amido black technique.

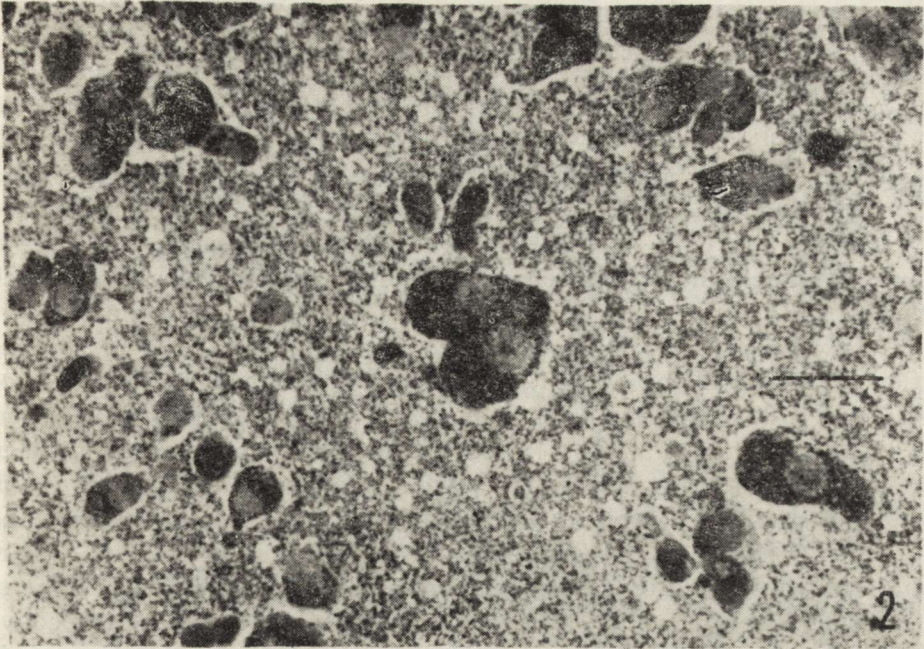


Fig. 2. Oncocytes with intensely stained intracytoplasmic granules. The granules in the background are for the most part mitochondria expressed of injured cells. Smear preparation. Heidenhain's iron hematoxylin; marker 30 μ m

Ryc. 2. Onkocyty z intensywnie zabarwionymi ziarnistościami śródplazmatycznymi. Ziarnistości w tle w większości są mitochondriami uszkodzonych komórek. Preparat z rozmazu. Hematoksylina żelazista Heidenhaina. Znacznik — 30 μ m

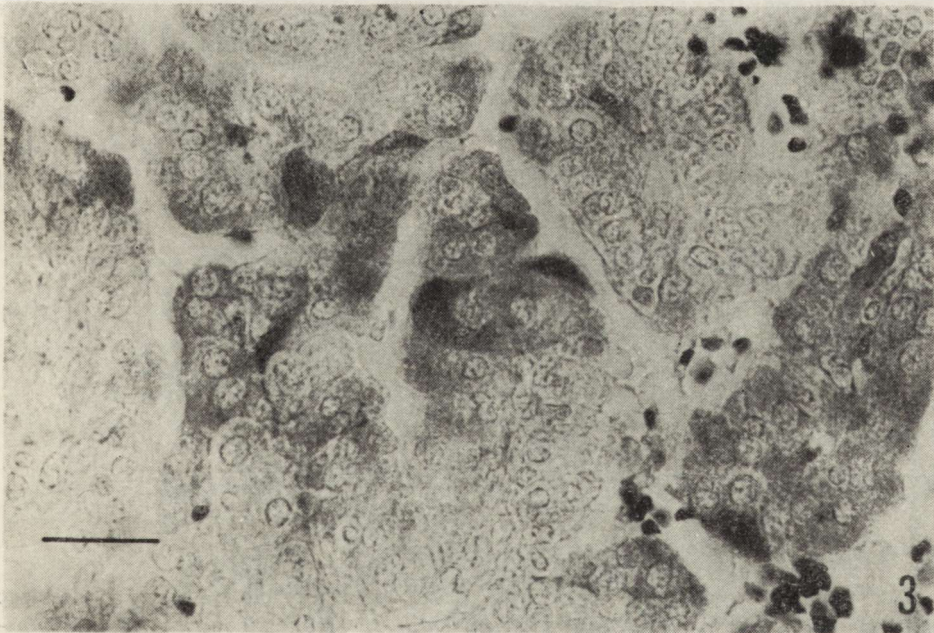


Fig. 3. Moderately stained intracytoplasmic granules in oncocytes. The intensely stained corpuscles are erythrocytes. Smear preparation. Luxol fast blue; marker 30 μ m

Ryc. 3. Umiarkowanie zabarwione ziarnistości śródplazmatyczne w onkocytach, intensywnie zabarwione erythrocyty. Preparat z rozmazu. Błękit trwały luksolu. Znacznik — 30 μ m

DISCUSSION

In accordance with Stefanko's and Vuzvski's (1985) findings, both choroid plexus papillomas reported here exhibited multifocal large cells containing a massive amount of intracytoplasmatic eosinophilic granules. Lightmicroscopy showed features of oncocytic transformation as defined by Hamperl (1931a,b, 1962). The granules contained proteins as well as neutral and acid mucopolysaccharides, as exhibited by their amido black staining and positive PAS and Hale reaction. The staining of the granules with Luxol fast blue is in accordance with the Weil-Weigert staining of oncocytically transformed epithelium of the choroid plexus as reported by Kepes (1983) and findings in oncocytic transformation by Hamperl (1962) and Hübner et al. (1967). This suggests that lipids are involved in the structure of these granules as well. Stefanko and Vuzvski (1985) and Kepes (1983) examined the granules by electronmicroscopy and identified them as hyperplastic mitochondria, which are characteristic of oncocytic transformation (Askew et al. 1971; Sun et al. 1975). As previously indicated, the material in this retrospective study was unfortunately insufficient for electron microscopy. In accordance with Stefanko and Vuzvski (1985), our cases also showed hyperchromasia of nuclei in areas of oncocytic transformation. Consistent with hyperchromasia we found in one of these two cases a distinct stemline in the triploid stage with Feulgen cytophotometry, while in 7 other choroid plexus papillomas diploidy was revealed (Müller et al., in press). We concluded that this aneuploid DNA pattern is not a sign of malignancy, but rather of oncocytic transformation.

The origin of oncocytic transformation remains unknown. As speculated by Fischer (1961), Askew et al. (1971), and Sun et al. (1975), hyperplasia of mitochondria in oncocytes may be attributed to the loss of mitochondrial enzymes in degenerative cell metabolism.

ONKOCYTARNA TRANSFORMACJA BRODAWCZAKA
SPLOTU NACZYNIÓWKOWEGO. BADANIE DWÓCH PRZYPADKÓW
W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM

Streszczenie

W dwóch przypadkach łagodnych brodawczaków splotu naczyniówkowego stwierdzono wielogniskowo gniazda powiększonych komórek guza. Ich cytoplazma była wypełniona gęsto ułożonymi ziarnistościami eozynofilnymi. Obraz mikroskopowy tych komórek i wyniki barwienia odpowiadały kryteriom transformacji onkocytarnej, określonym przez Hamperla.

ОНКОЦИТАРНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ПАПИЛЛОМАТА
СОСУДИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ.
ИССЛЕДОВАНИЕ ДВУХ СЛУЧАЕВ В СВЕТОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Резюме

В двух случаях доброкачественного папилломата сосудистого сплетения обнаружено мультифокальные накопления увеличенных клеток опухоли. Их цитоплазма была наполнена густо уложенными эозинофильными гранулами. Микроскопическая картина этих клеток и результаты окраски соответствовали критериям онкоцитарной трансформации Hampera.

REFERENCES

1. Askew J. B., Fechner R. E., Bentinck D. C., Jenson A. B.: Epithelial and myoepithelial oncocytes. Ultrastructural study of a salivary gland oncocytoma. Arch. Otolaryngol., 1971, 93, 46—54.
2. Fischer R.: Über den histochemischen Nachweis oxydativer Enzyme in Onkozyten verschiedener Organe. Virch. Arch., 1961, 334, 445—452.
3. Geyer G.: Zur Eiweissfärbung mit Amidoschwarz 10 B. Acta histochem., 1960, 10, 286—292.
4. Hamperl H.: Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie menschlicher Speicheldrüsen. Z. mikr.-anat. Forsch. 1931a, 27, 1—55.
5. Hamperl H.: Onkozyten und Geschwülste der Speicheldrüsen. Virch. Arch. path. Anat., 1931b, 282, 724—736.
6. Hamperl H.: Onkozyten und Onkozytome. Virch. Arch. path., Anat., 1962, 335, 452—483.
7. Hübner G., Paulussen F., Kleinsasser O.: Zur Feinstruktur und Genese der Onkozyten. Virch. Arch. path. Anat., 1967, 343, 34—50.
8. Kepes J. J.: Oncocytic transformation of choroid plexus epithelium. Acta Neuropathol. (Berl.), 1983, 62, 145—148.
9. Müller W., Füsting M., Firsching R.: DNA pattern in choroid plexus papilloma. Zbl. Neurochir. (in press).
10. Stefanko S. Z., Vuzvski V. D.: Oncocytic variant of choroid plexus papilloma. Acta Neuropathol., 1985, 66, 160—162.
11. Sun C. N., White H. J., Thompson B. W.: Oncocytoma (Mitochondrioma) of the parotid gland. Arch. Pathol., 1975, 99, 208—214.

Address for correspondence: Prof. Dr. Dr. W. Müller, Patholog. Inst. d. Univ., Joseph-Stelzmann-Str. 9, D-5000 Köln 41, GFR.

KOMUNIKATY

W dniach 8—10 października 1987 r. odbędzie się w Innsbrucku 20 Dunajskie Sympozjum Nauk Neurologicznych.

Tematami Sympozjum będą:

- zaburzenia funkcji międzymózgowia,
- nowe kierunki w neuroimmunologii,
- tematy wolne.

*

W dniach 12—13 listopada 1987 r. odbędzie się w Katowicach XXII Dzień Neurochemii Klinicznej na temat „Neurofarmakologia i Biochemia Tkanki Nerwowej i Mięśniowej w Normie i Patologii”.

Termn nadsyłania zgłoszeń upływa 15 września 1987 r.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Prof. Mieczysław Wender, Klinika Neurologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

*

W dniach 1—3 grudnia 1987 r. odbędzie się w Lipsku wspólne posiedzenie Towarzystwa Neuropatologicznego NRD oraz Towarzystwa Nauk Neurologicznych NRD. Tematem posiedzenia są „Nowoczesne Metody w Naukach Neurologicznych”.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Doc. Dr J. Lehmann, Abteilung für Neuro-pathologie, Institut für Pathologische Anatomie der Karl-Marx-Universität Liebig-strasse 26, 7010 Leipzig, DDR.

*

W dniach 18—22 kwietnia 1988 r. odbędzie się w Pradze I Europejski Kongres Neurologii.

Głównymi tematami będą:

- ostre zaburzenia neurologiczne w klinice i badaniach doświadczalnych,
- monitorowanie i mapowanie funkcji mózgu,
- zaburzenia ruchowe,
- ból.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Association of Czechoslovak Medical Societies J. E. Purkyne, 1st European Congress of Neurology, Tr. Vitezného února 31 120 26 Praha 2, Czechoslovakia.

IZABELA KUCHNA

ZESPÓŁ PARANOWOTWOROWEGO ZAPALENIA MÓZGU

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej PAN, Warszawa

Paranowotworowe zespoły neurologiczne wywołane zmianami patologicznymi w ośrodkowym i/lub obwodowym układzie nerwowym (UN) występują w przebiegu złośliwych nowotworów narządów wewnętrznych, ale nie są związane z przerzutami do UN. Występują one najczęściej w przebiegu odoskrzelowego raka płuc (Julien, Vital 1969). Obraz kliniczny paranowotworowego zespołu neurologicznego zależy od topografii uszkodzeń, które mogą mieć charakter zmian zwyrodnieniowych lub zapalnych (Mossakowski, Renkawek 1981). Na podstawie dotychczas opisanych przypadków Dietl i wsp. (1982) wyodrębnili następujące paranowotworowe zespoły neurologiczne: podostre zwyrodnienie mózdzku, zapalenie mózgu z przewagą zmian w strukturach limbicznych (limbic encephalitis) lub w rdzeniu przedłużonym (bulbar encephalitis), zapalenie rdzenia, mielopatię, zapalenie wielokorzeniowonerwowe, neuromiopatię. Paranowotworowe uszkodzenia UN powstają niekiedy stosunkowo wcześnie w przebiegu podstawowego schorzenia, nawet przed jego rozpoznaniem, i mogą wówczas stwarzać problemy diagnostyczne. Tego typu trudności rozpoznania różnicowego ukazuje analiza kliniczno-patologiczna przypadku, w którym neurologicznie dominował zespół opuszkowy.

OPIS PRZYPADKU

Chory Z. J., lat 75 (nr ks. gł. 5496/318) został przyjęty do Oddziału Neurologicznego Szpitala Grochowskiego w Warszawie z powodu narastających od dwóch miesięcy zawrotów głowy, zaburzeń równowagi i wystąpienia dyzartrii. W badaniu neurologicznym stwierdzono: po stronie prawej — niedowład podniebienia i niedowład kończyny dolnej; po stronie lewej — ośrodkowe uszkodzenie nerwu VII i niedowład połowiczny z wygórowaniem odruchów bez objawów patologicznych. Napięcie mięśniowe było symetrycznie wzmożone czterokończynowo. Chory był przy-

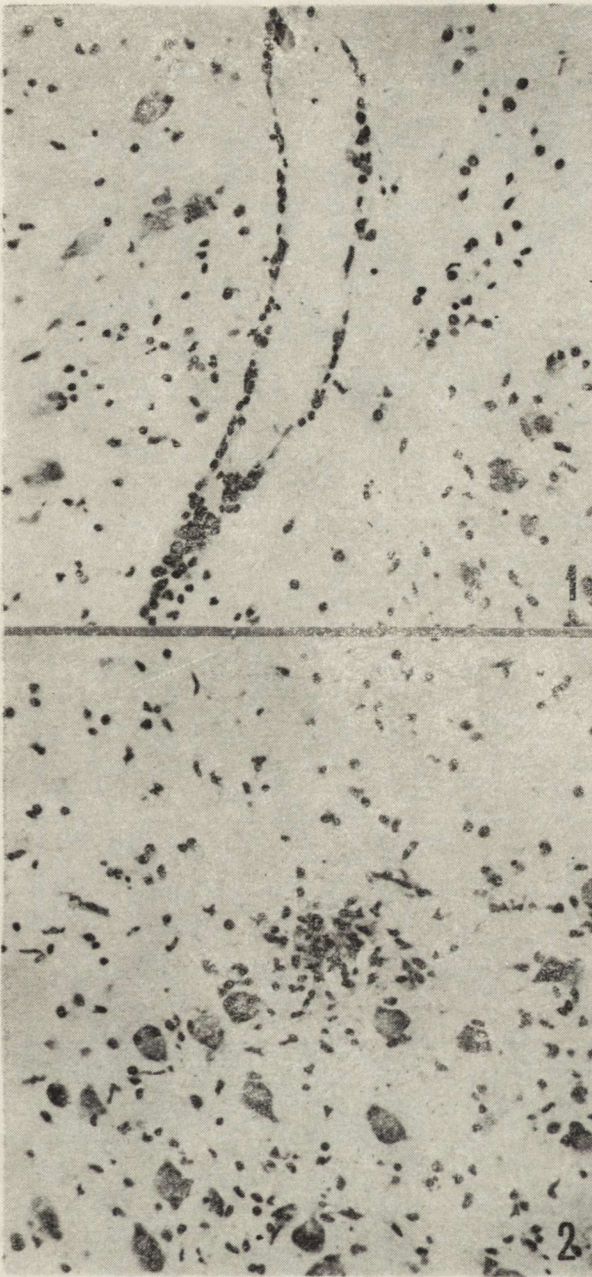
mroczone, spowolniały psychoruchowo, nie spełniał poleceń, co uniemożliwiało wykonanie prób mózdkowych i ocenę czucia. Gorączkował do 38°. W badaniu internistycznym rozpoznano nadciśnienie tętnicze i przewlekłą niewydolność krążenia. W badaniach dodatkowych stwierdzono: leukocytozę 9600, białkomocz, erytrocyturię, w ekg — cechy przerostu i niedotlenienia lewej komory serca. Nakłucie lędźwiowe: ciśnienie płynu mózgowo-rdzeniowego podwyższone, skład płynu prawidłowy. W oddziale stan pacjenta był ciężki, narastały zaburzenia świadomości, aż do śpiączki. Wystąpiły objawy kliniczne zapalenia płuc. W czwartej dobie pobytu w szpitalu chory zmarł wśród objawów niewydolności krążeniowo-oddechowej.

Rozpoznanie kliniczne: miażdżyca uogólniona, szczególnie mózgu, nadciśnienie tętnicze, naczyniopochodne ogniskowe uszkodzenie rdzenia przedłużonego, zwyrodnienie miażdżycowe mięśnia sercowego w okresie niewydolności krążenia, przewlekłe zapalenie miedniczek nerkowych i pęcherza, odoskrzelowe zapalenie płuc przed końcem życia.

Na sekcji ogólnej stwierdzono: rak płata górnego płuca prawego z przerzutami do węzłów chłonnych śródpiersia okołotchawicznych, zapalenie ropne tchawiczo-oskrzelowe, przerost komory serca lewej, blizna po zawale mięśnia sercowego w okolicy ściany bocznej komory lewej, zwyrodnienie tłuszczowe wątroby, zapalenie pęcherzyka żółciowego i dróg żółciowych, zapalenie miedniczek nerkowych krwotoczne, częściowo wrzodziejące, gruczolak prostaty, uogólniona miażdżyca tętnic.

Badanie neuropatologiczne: mózg po utrwaleniu w formalinie ważył 1050 g, makroskopowo stwierdzono przekrwienie opon, zanik mózgu niewielkiego stopnia, miażdżycę II stopnia naczyń podstawy. Na przekrojach widoczne było przekrwienie, zatarty rysunek w opuszcze środkowej po stronie prawej. Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z płata potylicznego, zwojów podstawy i wzgórza, mostu, opuszki środkowej i dolnej oraz mózdku. Skrawki barwiono: hematoksyliną-eozyną, fioletem krezyłu, metodami Heidenhaina i van Gieson.

Badanie mikroskopowe: największe zmiany obejmowały pień mózgu i korę mózdku. Zespół zmian zapalnych pod postacią nacieków limfocytarnych okołonaczyniowych (ryc. 1) oraz rozsianych grudek mikroglejowych (ryc. 2) występował w pniu i był szczególnie nasilony w jądrze oliw opuszki, i ich otoczeniu oraz w jądrach mostu. Nieliczne nacieki okołonaczyniowe obserwowano podwyściółkowo przy komorze III (ryc. 3) i wokół rogu tylnego komory bocznej oraz w istocie białej płata potylicznego i mózdku. Poza tym stwierdzono w korze mózgu rozsiane ubytki neuronalne i zmiany zwyrodnieniowe zachowanych neurocytów. Podkorowo widoczne było zagęszczenie gleju o typie glejozy izomorficznej. W istocie białej płata potylicznego występowały liczne naczynia z zaznaczonymi wokół nich cechami obrzęku z pojedynczymi makrofagami wypełnionymi hemosyderyną w poszerzonych przestrzeniach okołonaczy-

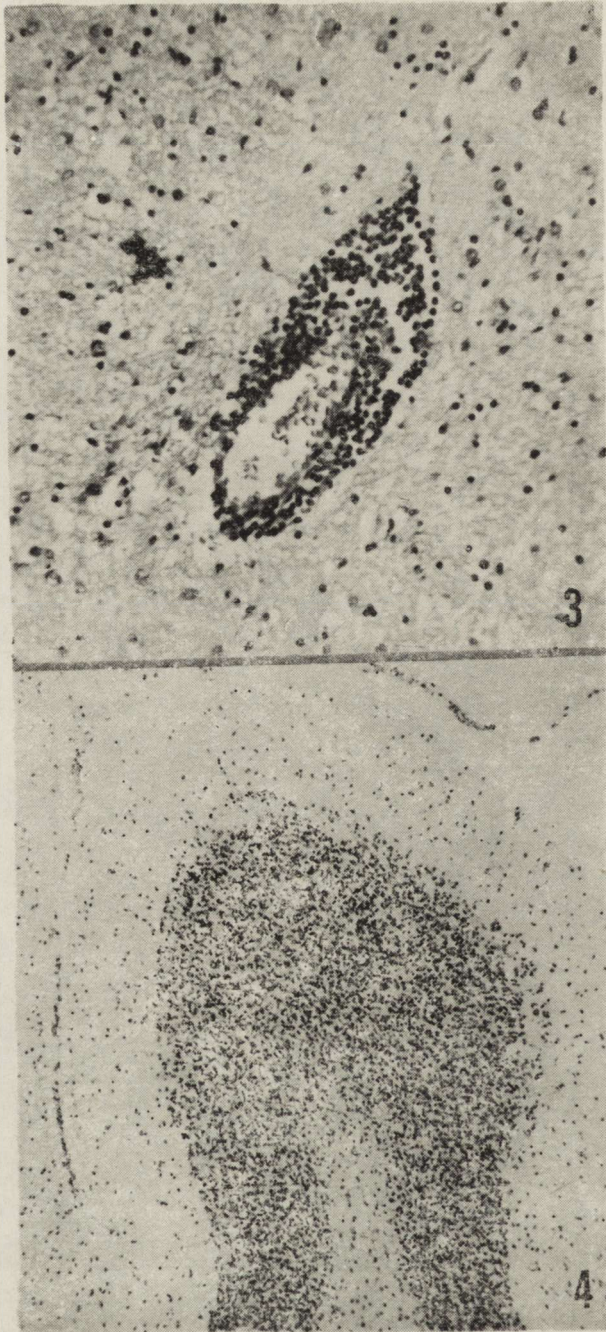


Ryc. 1. Opuszka. Okołonaczyniowy naciek limfocytny w jądrze oliwki. Fiolet krezylu. Pow. 200 ×

Fig. 1. Medulla oblongata. Lymphocytic perivascular cuffing in the olivary nucleus. Cresyl violet. × 200

Ryc. 2. Opuszka. Grudka mikroglejowa w jądrze oliwki. Fiolet krezylu. Pow. 200 ×

Fig. 2. Medulla oblongata. Microglial nodule in the olivary nucleus. Cresyl violet. × 200



Ryc. 3. Wzgórze. Naciek limfocytarny okołonacyniowy. H—E. Pow. 200 ×
Fig. 3. Thalamus. Lymphocytic perivascular cuffing. H—E. × 200

Ryc. 4. Mózdzek. Zanik komórek Purkiniego i przerzedzenie warstwy ziarnistej kory. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×
Fig. 4. Cerebellum. Atrophy of Purkinje cells and rarefaction of the granular layer. Cresyl violet. × 60

niowych. Na tym tle widoczne były dwa ogniska demielinizacji z intensywnym odczynem astrogleju wyrażającym się obecnością przerośniętych postaci astrocytów. Zmiany w mózdzku polegały na ogniskowym zaniku komórek Purkiniego i przerzedzeniu warstwy ziarnistej (ryc. 4), bardziej nasilonych w korze półkul, niż w robaku. Stwierdzone zmiany pozwoliły rozpoznać zespół zapalenia mózgu i cerebellopatię w przebiegu raka płuc.

OMÓWIENIE

Przedstawiony przypadek dotyczył 75 letniego pacjenta z objawami zespołu opuszkowego, bez cech klinicznych choroby nowotworowej. Podeszły wiek chorego, brak objawów procesu zapalnego, prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy, krótki, burzliwy przebieg choroby sugerował naczyniopochodne uszkodzenie pnia mózgu. Badanie neuropatologiczne potwierdziło zgodność objawów klinicznych z lokalizacją zmian w UN, ale wskazało na inny patomechanizm zaburzeń obserwowanych u pacjenta. Stwierdzone zmiany histopatologiczne charakterystyczne dla *encephalitis* topografią przypominały kleszczowe zapalenie mózgu (Osetowska 1974). W związku ze stwierdzonym w autopsji rakiem płuca rozpoznano u chorego zespół paranowotworowego zapalenia mózgu. Zmiany w mózdzku obserwowane w naszym przypadku potraktowano jako paranowotworowe zwyrodnienie mózdzku. Ogniska demielinizacji napotymane w istocie białej płata potylicznego były nieduże i umiejscowione w okolicy ze zmianami wskazującymi na nawracający obrzęk. Trudno jest więc dyskusować o ich powiązaniu z paranowotworowymi zespołami, w przebiegu których była opisywana demielinizacja (Nowacki i wsp. 1984).

Występowanie zmian zapalnych i zwyrodnieniowych w UN w przebiegu złośliwych nowotworów narządów wewnętrznych stwierdzano od dawna i przedstawiano różne hipotezy na temat przyczynowego powiązania tych zaburzeń. Greenfield (1934) uważał, że zmiany zapalne są wtórnym odczynem na zmiany zwyrodnieniowe w UN. Według Hensona i Russela (1954) zmiany zapalne w UN miały być pierwotne i przypuszczalnie o etiologii wirusowej. Badania kliniczno-patomorfologiczne, wirusologiczne, immunologiczne i doświadczalne prowadzone w ciągu następnych lat nie rozstrzygnęły ostatecznie przyczyny paranowotworowych zespołów neurologicznych (Dietl i wsp. 1982). Obecnie uważa się, że zespoły te powstają w wyniku autoagresyjnego uszkodzenia UN w przebiegu choroby nowotworowej. Hipotezę tę popiera obecność przeciwciał przeciwko komórkom Purkiniego i komórkom ziarnistym mózdzku stwierdzana w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy chorych z paranowotworowym zwyrodnieniem mózdzku (Jaekle i wsp. 1985; Greenlee, Lipton 1986). Mechanizm powstania przeciwciał przeciwko komórkom nerwowym nie jest wyjaśniony. Prawdopodobne jest powstanie takiej odpowiedzi immunologicznej na antygen wytwarzany przez nowo-

twór (Kearsley i wsp. 1985). Wydaje się, że badania prowadzone w celu wyjaśnienia przyczyny paranowotworowych zespołów neurologicznych mogą mieć również znaczenie dla określenia etiologii nowotworów.

A SYNDROME OF PARANEOPLASTIC ENCEPHALITIS

Summary

The communication concerns the case of a 75-year-old man in whom damage to the brain stem of vascular origin was clinically diagnosed. Autopsy revealed cancer of the right lung and inflammatory changes in the brain, localized mainly in the medulla oblongata, and degenerative changes in the cerebellum. The changes found in the central nervous system were considered as paraneoplastic. It is stressed that damage to the nervous system of this kind may appear earlier before the basic disease is discovered, thus creating diagnostic difficulties. Recent views on the pathomechanism of paraneoplastic changes in the nervous system are presented.

СИНДРОМ ПАРАНЕОПЛАСТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ МОЗГА

Резюме

Представлен случай 75-летнего мужчины с клиническим диагнозом сосудистого повреждения ствола мозга. Вскрытие и невропатологическое исследование обнаружило карциному правого легкого, симптомы воспаления мозга, локализованные главным образом в продолговатом мозгу и дегенерационные изменения в мозжечке. Эти изменения были оценены как проявление паранеопластического процесса. Подчеркивается, что такие повреждения нервной системы могут появляться раньше, чем диагноз основной болезни, причиняя диагностические затруднения. Представлены, кроме того, актуальные воззрения на счет патомеханизма паранеопластических изменений в нервной системе.

PIŚMIENICTWO

1. Dietl H. W., Pulst St.-M., Engelhardt P., Mehraein P.: Paraneoplastic brainstem encephalitis with acute dystonia and central hypoventilation. *J. Neurol.*, 1982, 227, 4, 229—238.
2. Greenfield J. C.: Subacute spinocerebellar degeneration occurring in elderly patients. *Brain*, 1934, 57, 161—176.
3. Greenlee J. E., Lipton H. L.: Anticerebellar antibodies in serum and cerebrospinal fluid of a patient with oat cell carcinoma of the lung and paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann. Neurol.*, 1986, 19, 82—85.
4. Henson R. A., Russell D. S., Wilkinson M.: Carcinomatous neuropathy and myopathy. A clinical and pathological study. *Brain*, 1954, 77, 82—121.
5. Jaeckle K. A., Graus F., Houghton A., Cardon-Cardo C., Nielsen S. L., Posner J. B.: Autoimmune response of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration to a Purkinje cell cytoplasmic protein antigen. *Ann. Neurol.*, 1985, 18, 592—600.
6. Julien J., Vital Cl.: Encephalomyelitis para-neoplastique a propos d'une observation anatomo-clinique. *Rev. Neurol.*, 1969, 120, 77—88.

7. Kearsley J. H., Johnson P., Halmagyi G. M.: Paraneoplastic cerebellar disease. Remission with excission of the primary tumor. *Arch. Neurol.*, 1985, 42, 1208—1212.
8. Mossakowski M. J., Renkawek K.: Uszkodzenie układu nerwowego w nowotworach złośliwych. W: *Podstawy neuropatologii*. Red.: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. PZWL, Warszawa 1981, 381—383.
9. Nowacki P., Marlicz M., Honczarenko K., Nocoń D., Osuch Z., Kolarz-Józewicz L., Bukowski J., Józwa H.: Uwagi na temat encefalopatii nowotworowej na marginesie obserwacji dwóch przypadków. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1984, 18, 485—488.
10. Osetowska E.: *Neuropatologia zapaleń mózgu wirusowych i alergicznych*. PZWL, Warszawa 1974.

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

W dniach 18—22 kwietnia 1988 r. odbędzie się w Pradze I Europejski Kongres Neurologii.

Głównymi tematami będą:

- ostre zaburzenia neurologiczne w klinice i badaniach doświadczalnych,
- monitorowanie i mapowanie funkcji mózgu,
- zaburzenia ruchowe,
- ból.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Association of Czechoslovak Medical Societies J. E. Purkyne, 1st European Congress of Neurology, Tr. Vitezného února 31 12026 Praha 2, Czechoslovakia.

*

W dniach 3—5 maja 1988 r. odbędzie się w Warszawie Pierwsze Polsko-Szwedzkie Sympozjum na temat Struktury i Funkcji w Neurofarmakologii.

Adres Komitetu Organizacyjnego: Prof. Wojciech Kostowski, Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.

*

W dniach 5—9 czerwca 1988 r. odbędzie się w Jerozolimie 9 Międzynarodowe Sympozjum na temat Choroby Parkinsona.

Adres Sekretariatu: P.O.B. 50006, Tel Aviv 61500, Israel.

Jerzy Dymecki

PRZEMYSŁAW NOWACKI

W SPRAWIE MECHANIZMU POWSTAWANIA ROZLEGŁYCH NACIEKÓW BIAŁACZKOWYCH W MÓZGOWIU

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

U chorych zmarłych z powodu białaczki często obserwuje się w mózgowiu miejsca zawierające liczne, gęste, ostro odgraniczone od tkanki nerwowej nacieki białaczkowe, którym zawsze towarzyszą krwotoki śródmiąższowe, podczas gdy w innych okolicach ośrodkowego układu nerwowego (OUN) tego typu nacieki występują rzadko. Wcześniej na to zjawisko zwrócili uwagę Mossakowski i wsp. (1962). Dotychczas nie ustalono, czy rozległe, gęste skupienia nacieków białaczkowych ulegają ukrwotocznieniu, czy też rozwijają się w wyniku skazy krwotocznej. Nie wiadomo także, w jakim okresie choroby pojawiają się one w OUN.

Celem pracy jest próba ustalenia mechanizmu prowadzącego do powstawania gęstych rozległych nacieków białaczkowych w mózgowiu oraz odpowiedź na pytanie, jakie mają one znaczenie kliniczne?

MATERIAŁ I METODY

Przebadano mózgowia 100 osób obu płci, w wieku 17—74 lata (średnia wieku — 40,7 lat), leczonych i zmarłych z powodu białaczki w Klinice Hematologii PAM w Szczecinie w latach 1976—1984. W 63 przypadkach rozpoznano ostrą białaczkę mieloblastyczną, w 13 przypadkach — ostrą białaczkę mielomonocytoidalną, w 24 przypadkach — przełom blastyczny przewlekłej białaczki szpikowej. Metodykę badań mających na celu ustalenie typu białaczki oraz badań neuropatologicznych przedstawiono we wcześniejszym opracowaniu (Nowacki i wsp. 1982).

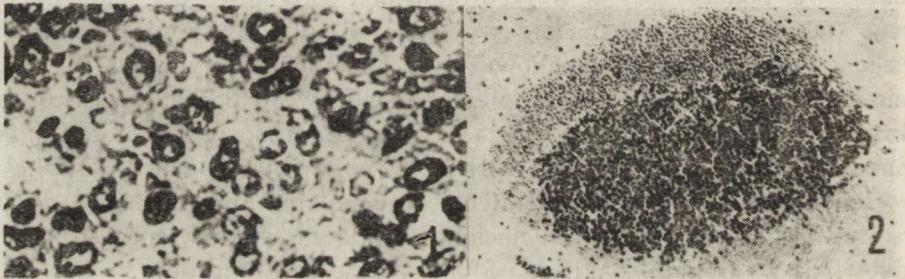
WYNIKI

Wyodrębniono trzy grupy przypadków: 1 — z krwotokami i naciekami białaczkowymi w mózgowiu, 2 — z krwotokami bez nacieków białaczkowych w mózgowiu, 3 — z naciekami białaczkowymi bez krwotoków mózgowych.

Grupa 1. Przypadki z krwotokami i naciekami białaczkowymi

W 17 przypadkach (60,7%), spośród 28 składających się na tę grupę, występowały w krwotokach i w ich najbliższym sąsiedztwie nacieki białaczkowe osiągające średnicę do około 600 mikrometrów. Były one okrągłe lub owalne. W głębi ognisk krwotocznych wykazywały one tendencję do zlewania się. W większości nacieków w krwotokach komórki białaczkowe wykazywały cechy zwyrodnienia, ich jądra były obrzmiałe, blade o zatartym rysunku chromatyny (ryc. 1). Liczba nacieków białaczkowych w krwotokach sięgała od kilku do kilkudziesięciu w 1 cm².

W bezpośrednim sąsiedztwie ognisk krwotocznych nacieki białaczkowe miały kształt owalny, czasami wrzecionowaty i układały się równoległe do granicy wyznaczynienia. Ich struktura była podobna do struktury gęstych regularnych nacieków w innych okolicach mózgowia. Nacieków tego typu w sąsiedztwie wyznaczynienia było jednak niewspółmiernie dużo w porównaniu z pozostałymi okolicami mózgowia, w których występowały one pojedynczo lub nie stwierdzono ich wcale. Większość nacieków otoczona była rąbkim krwotocznym (ryc. 2). Zwykle zlewały



Ryc. 1. Zwyrodnienie komórek białaczkowych w ognisku krwotocznym. Obrzmiałe, jasne jądra ubogie w chromatynę. Fiolet krezyłu. Pow. 240 ×

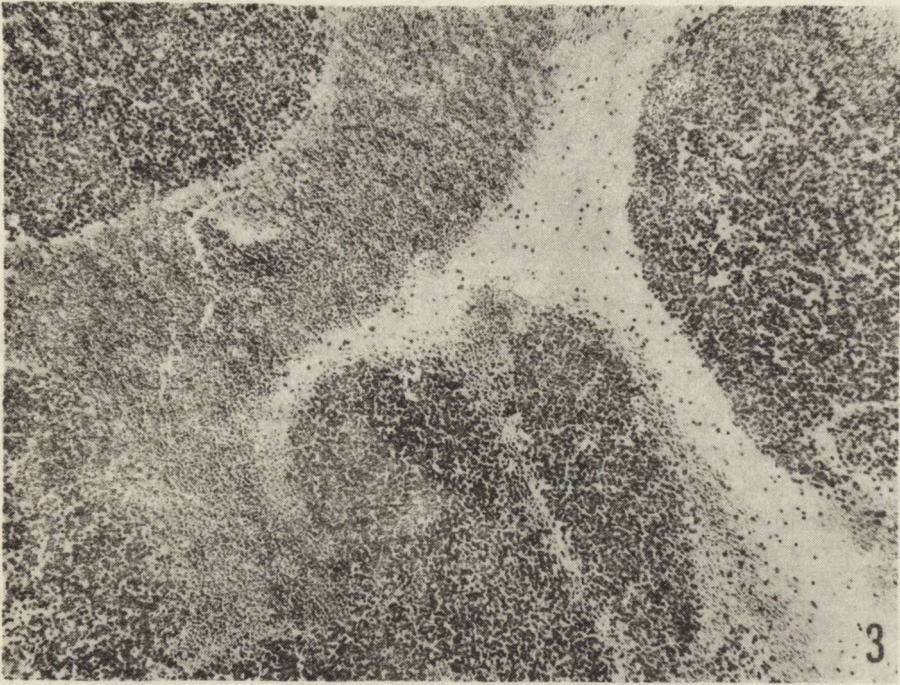
Fig. 1. Degeneration of leukemic cells in hemorrhagic focus. Swollen, clear nuclei poor in chromatin. Cresyl violet. × 240

Ryc. 2. Pojedynczy, gęsty naciek białaczkowy otoczony rąbkim krwotocznym w istocie białej płata czołowego. H—E. Pow. 63 ×

Fig. 2. Single, dense leukemic infiltration surrounded by hemorrhagic border in the white matter of frontal lobe. H—E. × 63

się one z główną masą ogniska krwotocznego (ryc. 3). W miejscach odległych od ogniska krwotocznego obserwowano najczęściej drobne i średniej wielkości nacieki białaczkowe wypełniające niewielką część przestrzeni okołonaczyniowej. Leukocytoza we krwi w okresie bezpośrednio poprzedzającym zgon chorego wynosiła w opisanych przypadkach od 104 do 498 G/L.

W 11 przypadkach (39,3%) w krwotokach mózgowych skupiska komórek białaczkowych były znacznie mniejsze i utworzone z mniej gęsto ułożonych komórek (ryc. 4) niż w opisanych powyżej naciekach w ogni-



Ryc. 3. Liczne ukrwotocznione nacieki białaczkowe zlewające się z główną masą wynaczynienia (lewa strona ryciny) H—E. Pow. 63 ×

Fig. 3. Numerous hemorrhagic leukemic infiltrations merging with the main extravasation mass (left side of Figure). H—E. × 63



Ryc. 4. Pojedyncze, rzadkie skupiska komórek białaczkowych w rozległym ognisku krwotocznym. H—E. Pow. 63 ×

Fig. 4. Single, rare leukemic cells concentrations in the extensive hemorrhagic focus. H—E. × 63

skach krwotocznym. Mniej było też takich skupisk w poszczególnych krwotokach. W wymienionych przypadkach poza skupiskami w krwotokach, komórki białaczkowe nie tworzyły nacieków w mózgowiu. Wartość leukocytozy we krwi w tych przypadkach w okresie przed zgonem chorego mieściła się w granicach 24—38 G/L, w 1 przypadku — 88 G/L.

Grupa 2. Przypadki z krwotokami bez nacieków białaczkowych

W 27 przypadkach stwierdzono w mózgowiu różnej wielkości ogniska krwotoczne, położone zwykle w istocie białej półkul mózgu, rzadziej pnia mózgu. W mózdzku krwotoki występowały częściej w korze. Nacieków białaczkowych w mózgowiu w tej grupie przypadków nie obserwowano. Wartość leukocytozy bezpośrednio przed zgonem wynosiła w tej grupie chorych od 0,7 do 18 G/L.

Grupa 3. Przypadki z naciekami białaczkowymi bez krwotoków

W 15 przypadkach obserwowano różnego stopnia leukocytozę i okołonaczyniowe nacieki białaczkowe w mózgowiu, proporcjonalnego do wartości leukocytozy. W kilku przypadkach z bardzo wysoką leukocytozą stwierdzono pojedyncze gęste nacieki białaczkowe ostro odgraniczone od otoczenia, podobne do opisanych w grupie 1.

W 30 przypadkach nie stwierdzono krwotoków i obecności komórek białaczkowych w mózgowiu.

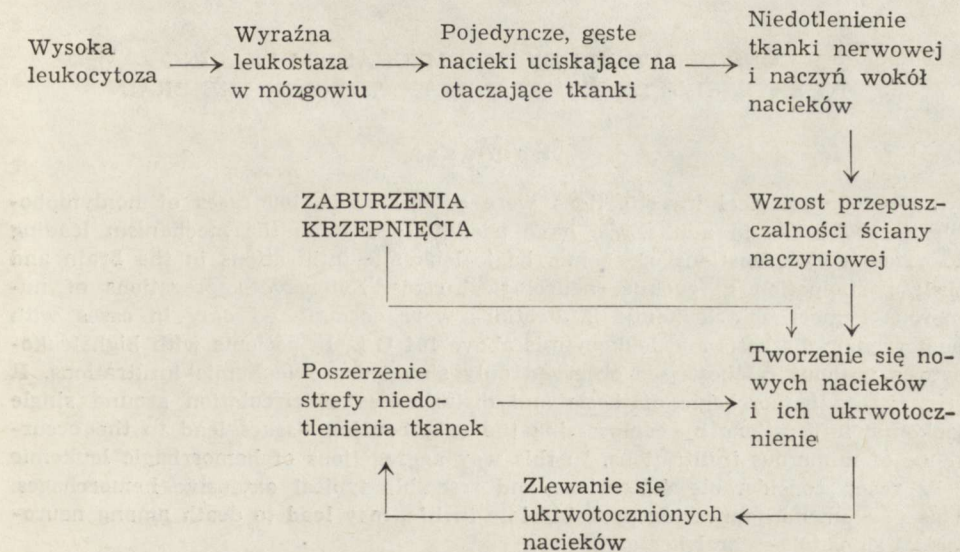
OMÓWIENIE

Jedną z postaci skupisk komórek białaczkowych w mózgowiu są gęste nacieki dobrze odgraniczone od tkanki nerwowej. Zdaniem wielu autorów (Mossakowski i wsp. 1962; Heinrich i wsp. 1975; Nowacki i wsp. 1982) są to okołonaczyniowe nacieki białaczkowe, których kontaktu z naczyniem nie udaje się uchwycić ze względu na ich znaczne rozmiary. Istotną rolę w powstawaniu tego typu nacieków białaczkowych przypisuje się wysokiej leukocytozie we krwi i leukostazie w naczyniach mózgu (Heinrich i wsp. 1975; Iwanowski i wsp. 1985). Freireich i wsp. (1960) stwierdzili gęste nacieki białaczkowe ostro odgraniczone od tkanki nerwowej tylko w przypadkach z leukocytozą przekraczającą 200 G/L. W naszym materiale nacieki takie obserwowano jedynie w przypadkach, w których leukocytoza pod koniec życia chorego wyniosła przynajmniej 104 G/L. Ścisły związek tego typu nacieków z leukocytozą i leukostazą wskazuje na ich krwiopochodny i okołonaczyniowy charakter. Można bowiem przyjąć, że tylko w przypadkach z bardzo wysoką leukocytozą (ponad 100 G/L) panują dogodne warunki do tworzenia się tak masywnych białaczkowych nacieków okołonaczyniowych, że nierzadko nie udaje się wykazać ich związku z naczyniem.

W przypadkach z leukocytozą przekraczającą 100 G/L ogniska krwotoczne w mózgowiu zawsze współistniały z rozległymi, zlewającymi się naciekami białaczkowymi wewnątrz wynaczynienia i licznymi gęstymi naciekami w bezpośrednim jego sąsiedztwie. W pozostałych okolicach mózgowia występowały jedynie pojedyncze, gęste nacieki ostro odgraniczone od otoczenia, podobne do spotykanych w pobliżu ognisk krwotocznych. Odnosi się wrażenie, że tak wyraźna dysproporcja w rozmieszcze-

ntu tego typu nacieków wynika z wzajemnej zależności nacieków i skazy krwotocznej. Gęste nacieki białaczkowe uciskają na otaczające tkanki powodując ich niedokrwienie, w wyniku którego zwiększa się przepuszczalność naczyń. Dlatego też nacieki takie zwykle otoczone są rąbkim krwotocznym (Phair i wsp. 1964; Heinrich i wsp. 1975). Wokół ukrwotoczonych nacieków narastają zaburzenia krążenia w sieci drobnych naczyń, zwłaszcza włosowatych (Groch i wsp. 1954). Dochodzi do przekrwienia i zwolnienia przepływu krwi, przez co nasilają się warunki sprzyjające dalszemu powstawaniu wynaczynień oraz leukostazie i przenikaniu komórek białaczkowych do przestrzeni okołonaczyniowej. Kolejne ukrwotocznione nacieki zostają pochłonięte przez powstałe wcześniej ognisko krwotoczne, którego masa stopniowo wzrasta. W wyniku narastającego przekrwienia i niedotlenienia kolejnych naczyń coraz więcej komórek białaczkowych wydostaje się poza naczynia, tworząc następne nacieki, które także zostają pochłonięte przez główną masę wynaczynienia. Wytwarza się rodzaj reakcji lawinowej, w wyniku czego krwotoki mózgowe osiągają znaczne rozmiary (10—12 cm) (schemat 1). Wymieniona reakcja zostaje zapoczątkowana prawdopodobnie na krótko przed zgonem chorego (kilkanaście godzin ?) i trwa do jego śmierci. W obrazie klinicznym u chorych z opisanymi wyżej zmianami neuropatologicznymi występują objawy szybko narastającego krwotoku mózgowego, prowadzącego do zgonu. Spostrzeżenia kliniczne przemawiają na korzyść poglądu o tworzeniu się licznych ukrwotoczonych nacieków białaczkowych w wyniku skazy krwotocznej pod koniec życia chorego. Mało prawdopodobne wydaje się, by rozległe, gęste nacieki tworzyły się we wcześniej-

Schemat 1: Prawdopodobny mechanizm powstawania rozległych nacieków białaczkowych w mózgowiu



szym okresie choroby, nie wywołując objawów klinicznych. Wcześniej bowiem u tych chorych nie stwierdza się objawów, które by wskazywały na występowanie w mózgowiu tego rodzaju nacieków. Pojedyncze nacieki białaczkowe o opisanym wyżej charakterze pojawiają się w mózgowiu prawdopodobnie w każdym okresie wysokiego wzrostu leukocytozy (Nowacki 1986), ale nie wywołują uchwytynych objawów neurologicznych.

Nieliczne, rzadkie skupiska komórek białaczkowych w rozległych krwotokach mózgowych powstają prawdopodobnie na innej drodze. W przypadkach z niewielkim lub umiarkowanym wzrostem leukocytozy komórki białaczkowe nie tworzą gęstych nacieków okołonaczyniowych, lecz wydostają się z naczyń w czasie krwawienia i gromadzą się w ognisku krwotocznym w rzadkie skupiska dzięki zdolności do leukergii.

WNIOSKI

1. Gęste nacieki białaczkowe ostro odgraniczone od otoczenia, występujące w mózgowiu, są masywnymi naciekami okołonaczyniowymi, których kontaktu z naczyniem nie udaje się uchwycić. Powstają one w okresie wysokiego wzrostu leukocytozy we krwi.

2. Skaza krwotoczna i zaburzenia krążenia wokół pojedynczych, gęstych nacieków białaczkowych, uciskających na otaczające tkanki, są przyczyną powstawania kolejnych nacieków, zlewających się w rozległe ogniska krwotoczne.

3. Rozległe skupiska ukrwotoczniowanych nacieków białaczkowych w mózgowiu powstają prawdopodobnie pod koniec życia chorego, wywołując objawy szybko narastającego krwotoku mózgowego.

CONSIDERATIONS ON THE MECHANISM LEADING TO EXTENSIVE LEUKEMIC INFILTRATIONS IN THE BRAIN

Summary

Neuropathological investigations were performed in 100 cases of nonlymphoblastic leukemias in adults. We have tried to determine the mechanism leading to extensive aggregations of hemorrhagic leukemic infiltrations in the brain and their participation in evoking neurological signs. Extensive aggregations of numerous hemorrhagic leukemic infiltrations were encountered only in cases with hemorrhagic diathesis and leukocytosis above 104 G/L. In patients with high leukocytosis without diathesis we observed only single dense leukemic infiltrations. It seems, that hemorrhagic diathesis and disturbances of circulation around single leukemic infiltrations by compressing the neighbouring tissues lead to the occurrence of numerous infiltrations. In this way aggregations of hemorrhagic leukemic cells reach considerable dimensions and resemble typical extensive hemorrhages. This phenomenon appearing probably late in life, may lead to death among neurological signs of cerebral hemorrhage.

ПО ВОПРОСУ МЕХАНИЗМА ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОБШИРНЫХ
ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ ИНФИЛЬТРАТОВ В МОЗГУ

Резюме

Проведено невропатологическое исследование 100 случаев нелимфобластических лейкемии у взрослых, пробуя выяснить механизм ведущий к обширным накоплениям геморрагических лейкемических инфильтратов в мозгу и их участия в возникновению клинических симптомов повреждения центральной нервной системы. Обширные накопления геморрагических сливающихся лейкемических инфильтратов были констатированы только в случаях с геморрагическим диатезом и лейкоцитозом выше 104 г/л. У больных без геморрагического диатеза, несмотря на большой лейкоцитоз в крови, в мозгу появлялись только единичные густые лейкемические инфильтраты, резко отделенные от окружающей среды. Установлено, что геморрагический диатез и нарушения кровообращения вокруг единичных лейкемических инфильтратов в мозгу ведут к возникновению все большего количества инфильтратов путем цепной реакции. Причиняется это к тому, что накопления внутри мозговых геморрагических инфильтратов достигают значительной величины, имитируя обширные кровоизлияния. Описанные явления возникают вероятно в конце жизни больного и ведут к смерти, с симптомами тяжелого мозгового кровоизлияния.

PIŚMIENNICTWO

1. Freireich J. E., Thomas L. B., Frei E., Fritz D., Forkner C. E.: A distinctive type of intracerebral hemorrhage associated with „blastic crisis” in patients with leukemia. *Cancer*, 1960, 13, 146—154.
2. Groch S. N., Sayre G. P., Heck F. J.: Cerebral hemorrhage in leukemia. *Arch. Neurol.*, 1954, 2, 439—451.
3. Heinrich D., Müller W., Heinrich Ch. M., Fischer R.: Vorkommen und Häufigkeit leukämischer Knötchen (leukemic nodules) im Gehirn. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 512—514.
4. 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.
5. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Iwanowski L.: Zespoły neuropatologiczne w białaczkach. *Rozpr. Wydz. Nauk Med. PAN*, 1962, 7, 157—184.
6. 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.
7. Nowacki P.: Patogeneza zmian neuropatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w ostrych białaczkach nieлимfoblastycznych i przełomie blastycznym przewlekłej białaczki szpikowej u dorosłych. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1986, 20, 176—179.
8. Phair J. P., Anderson R. E., Namiki H.: The central nervous system in leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1964, 61, 863—875.

Adres autora: Klinika Neurologii PAM w Szczecinie, ul. Unii Lubelskiej 1, 71-344 Szczecin.

PRZEMYSŁAW NOWACKI

UDZIAŁ KOMÓREK BIAŁACZKOWYCH W POWSTAWANIU KRWOTOKÓW DO OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO W BIAŁACZKACH NIELIMFOBLASTYCZNYCH U DOROSŁYCH

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

Krwotoki do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) są częstym i zwykle śmiertelnym powikłaniem białaczki. Mechanizm skaz krwotocznych w białaczkach jest złożony; największe znaczenie przypisuje się małopłytkowości i niedoborowi czynników krzepnięcia w osoczu (Gaydos i wsp. 1962; Friedman i wsp. 1964; De Queiroz 1978). Dotychczas nie ustalono, jaką rolę w powstawaniu krwotoków mózgowych odgrywają komórki białaczkowe. Wielu zwolenników ma teoria wiążąca krwotoki do OUN z zajęciem układu nerwowego przez komórki białaczkowe (Simone i wsp. 1972; Hoagland, Perry 1976). Niektórzy autorzy uważają, że krwotoki są spowodowane uszkodzeniem ścian naczyń przez komórki białaczkowe, a zaburzenia krzepnięcia ułatwiają jedynie przenikanie krwi poza zmienione naczynia (Groch i wsp. 1954; Moore i wsp. 1960; Phair i wsp. 1964). Inni autorzy są zdania, że w powstawaniu krwotoków biorą udział zarówno zaburzenia hemostazy, jak i nacieki białaczkowe OUN (McCormick 1973; Pedal, Oehmichen 1981; Ławińska i wsp. 1982). Wreszcie trzecia grupa badaczy uznaje za przyczynę krwotoków jedynie zaburzenia krzepnięcia (Bernard i wsp. 1964; Żukowskaja, Chwątowa 1973).

Celem pracy jest próba ustalenia, jaką rolę odgrywają komórki białaczkowe w etiopatogenezie krwotoków do OUN w białaczkach nieлимfoblastycznych u dorosłych.

MATERIAŁ I METODY

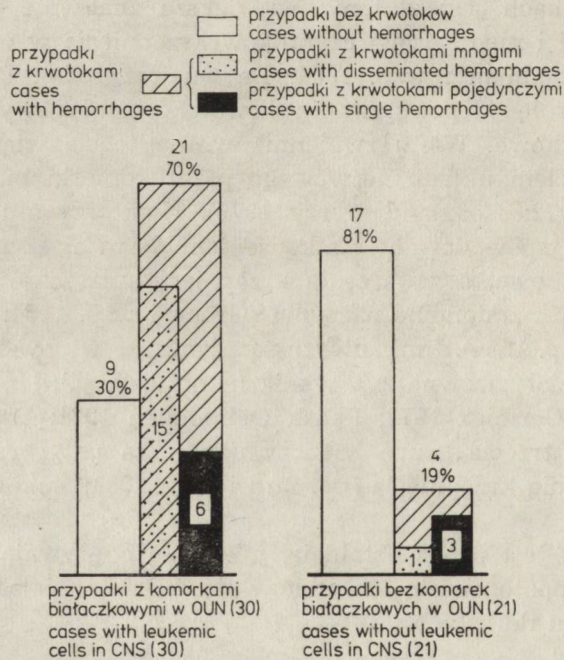
Przebadano mózgowia 51 osób obu płci w wieku 17—68 lat (średnia wieku — 38,4 lata), zmarłych z powodu białaczki w latach 1976—1984 w Klinice Hematologii PAM. W 32 przypadkach rozpoznano ostrą bia-

łaczkę mieloblastyczną, w 6 przypadkach — ostrą białaczkę mielomonocytową, w 13 przypadkach — przełom blastyczny przewlekłej białaczki szpikowej. Typ białaczki ustalano na podstawie badania morfologicznego szpiku i krwi oraz cytoenzymatycznych blastów (reakcja peroksydazowa metodą Sato i reakcja na obecność esterazy naftylo-octanowej) i cytochemicznych (reakcja PAS)*. Badania neuropatologiczne przeprowadzono po utrwaleniu materiału w 8% roztworze formaliny. Preparaty uzyskane z bloczków parafinowych barwiono fioletem krezyłu, hematoksyliną-eo-zyną oraz metodą PAS. Opracowanie statystyczne materiału wykonano przy użyciu współczynnika Yulea.

WYNIKI

Badanie neuropatologiczne obejmuje przypadki, w których nie stwierdzono mikrozakrzepów w OUN (udział wykrzepiania wewnątrznaczyniowego w powstawaniu krwotoków mózgowych zostanie omówiony w innym opracowaniu).

Krwotoki mózgowo i podpajęczynówkowe występowały znacznie częściej w przypadkach z komórkami białaczkowymi w OUN, niż u cho-

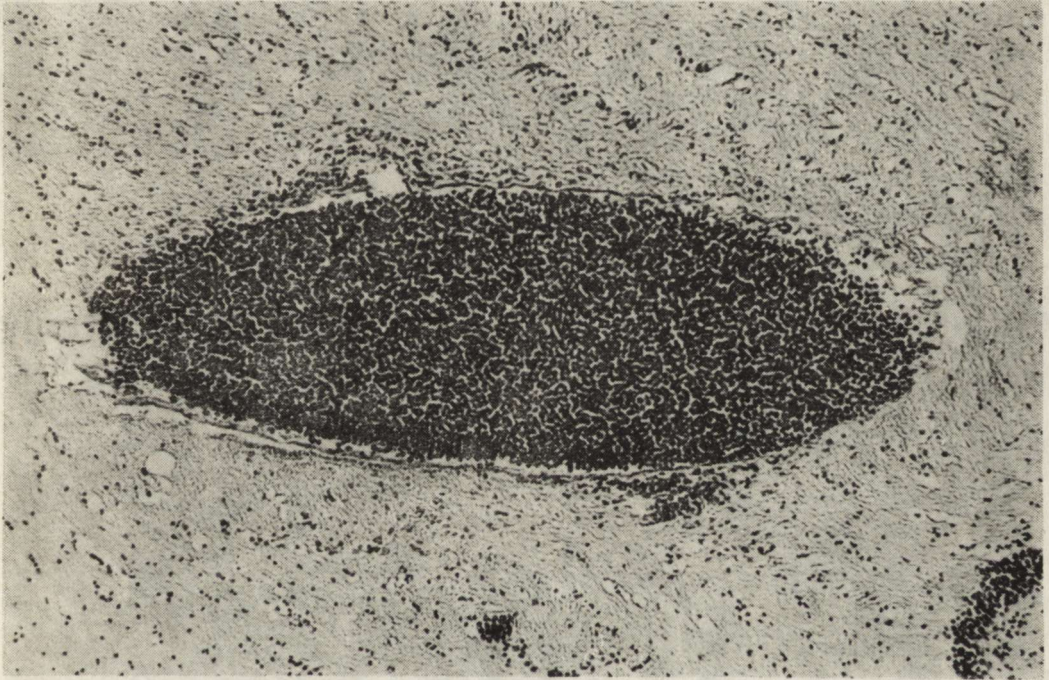


Ryc. 1. Komórki białaczkowe w ośrodkowym układzie nerwowym, a występowanie krwotoków śródmózgowych i podpajęczynówkowych

Fig. 1. Leukemic cells in the central nervous system and occurrence of intracerebral and subarachnoidal hemorrhages

* Badania wykonano w Klinice Hematologii PAM w Szczecinie.

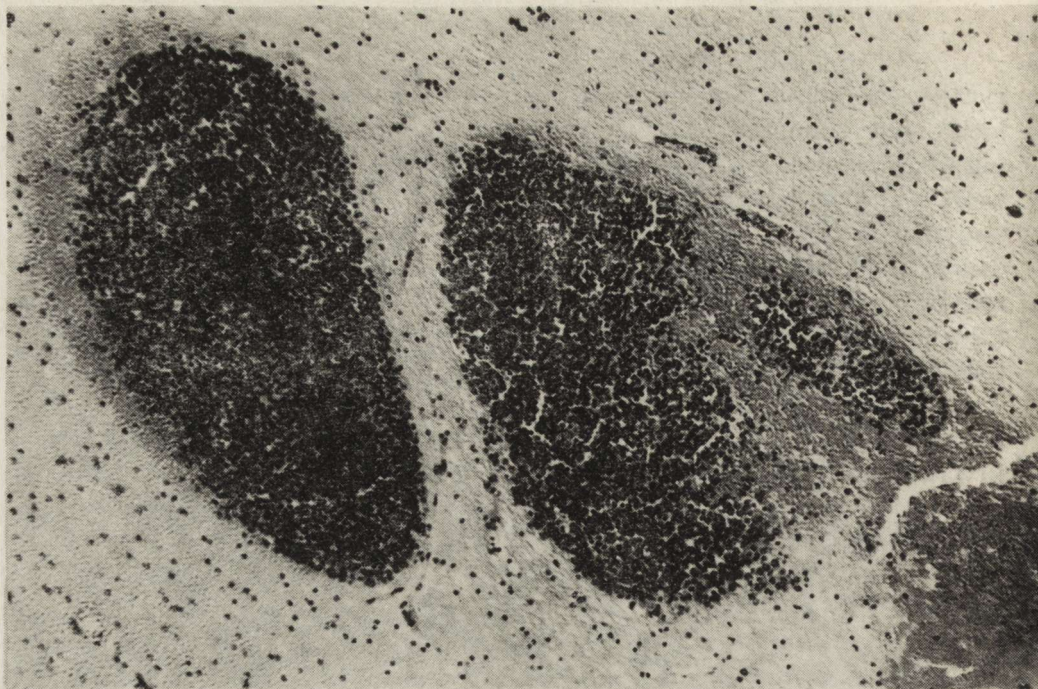
rych, u których w badaniu pośmiertnym nie stwierdzono komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich ($Q = 0,82$: zależność dodatnia i bardzo wysoka). W grupie przypadków z komórkami białaczkowymi w OUN nieco większa była również liczba krwotoków o charakterze rozsiałym (ryc. 1). Z przedstawionych danych na rycinie 1 wynika, że wprawdzie grupa przypadków ze współistnieniem krwotoków i skupisk komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich jest najliczniejsza (21 przypadków), ale obok niej występują przypadki bądź tylko z krwotokami (4 przypadki), bądź jedynie ze skupiskami komórek białaczkowych w OUN (9 przypadków). Wokół naczyń z leukostazą i niewielkimi białaczkowymi naciekami okołonacyniowymi nie obserwowano cech krwawienia (ryc. 2). Gęste nacieki białaczkowe w mózgowiu, uciska-



Ryc. 2. Masywna leukostaza w poszerzonym, cienkościennym naczyniu żylnym. Wokół naczynia brak cech krwawienia. H—E. Pow. 100×

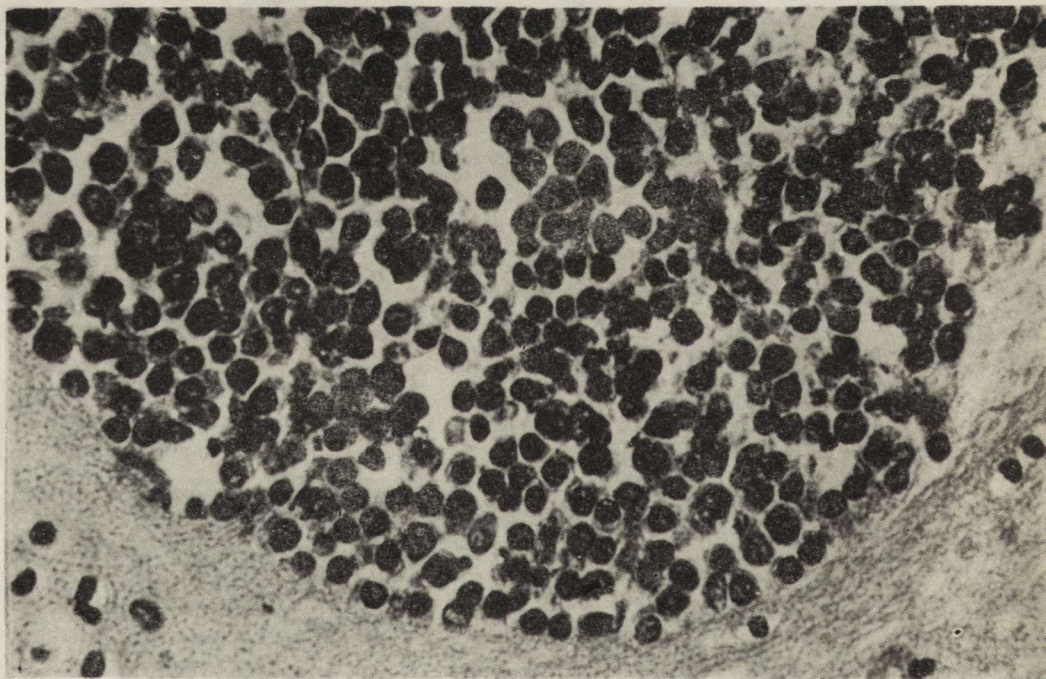
Fig. 2. Massive leukostasis in enlarged, thinwalled vein. No hemorrhagic features around the vessel. H—E. $\times 100$

jące otaczającą tkankę, otaczał zwykle wyraźny rąbek krwotoczny (ryc. 3). W utkaniu tego typu nacieków krwinki czerwone nie występowały, bądź ich ilość była niewielka (ryc. 4). Gęste nacieki otoczone rąbkiem krwotocznym, zlewające się zwykle z główną masą wynacynienia, obserwowano przede wszystkim wokół dużych ognisk krwotocznych. W obrębie krwotoków występowały również liczne, rozległe nacieki białaczkowe.



Ryc. 3. Gęste nacieki białaczkowe w istocie białej półkuli mózgu otoczone rąbkim krwotocznym. H—E. Pow. 63 ×

Fig. 3. Dense leukemic infiltrations in the white matter of the cerebral hemisphere surrounded by a hemorrhagic border. H—E. × 63



Ryc. 4. Gęsty nacieki białaczkowy ściśle przylegający do otaczającej tkanki nerwowej. W utkaniu nacieku nie występują krwinki czerwone. H—E. Pow. 240 ×

Fig. 4. Dense leukemic infiltration closely adjoin to the surrounding nervous tissue. No red cells within the infiltration. H—E. × 240

W przypadkach z wysoką leukocytozą, w których obserwowano krwotoki do OUN, niedobór płytek krwi był mniejszy, niż w przypadkach z niską lub nieznacznie podwyższoną leukocytozą (tab. 1).

Tabela 1. Leukocytoza i poziom płytek krwi u pacjentów z krwotokami do OUN

Table 1. Leukocytosis and platelet count in patients with CNS hemorrhages

Leukocytoza Leukocytosis	Poziom płytek krwi (tys. w mm ³) Platelet count (×1000/mm ³)
poniżej 15 G/L below 15 G/L	2 – 60 $\bar{x} = 16$
powyżej 150 G/L above 150 G/L	8 – 160 $\bar{x} = 47,3$

OMÓWIENIE

Odpowiedź na pytanie, jaką rolę odgrywają komórki białaczkowe w powstawaniu krwotoków do OUN, zawarta jest być może w charakterystyce zmian krwotocznych i nacieków białaczkowych u poszczególnych chorych. W przebadanym materiale występowały przypadki z krwotokami i naciekami białaczkowymi w OUN, z krwotokami bez współistniejących nacieków oraz z naciekami bez towarzyszących im krwotoków. Najliczniejszą grupę stanowiły przypadki z krwotokami i komórkami białaczkowymi w OUN. W przypadkach tych wokół naczyń, w których stwierdzono leukostazę, bądź otoczonych niewielkimi naciekami białaczkowymi, nie występowały cechy krwawienia. Obserwowano je natomiast, podobnie jak Mossakowski i wsp. (1962) oraz Heinrich i wsp. (1975), na obrzeżu gęstych nacieków białaczkowych. Ze względu na swą wielkość nacieki te rozpierają przestrzeń okołonacyniową i uciskają na otaczającą tkankę nerwową i naczynia.

Powyzsze spostrzeżenia sugerują, że komórki białaczkowe biorą udział w powstawaniu krwotoków do OUN w dwojaki sposób. Z jednej strony, gęste, rozległe nacieki uciskają na tkankę nerwową, wywołując w swym bezpośrednim sąsiedztwie zastój, przekrwienie i niedotlenienie naczyń, zwłaszcza włosowatych. Na tego typu zmiany zwrócili wcześniej uwagę Groch i wsp. (1954). W wyniku opisanych zjawisk nacieki te zostają otoczone strefą wynacynienia. Ukrwotocznione nacieki zlewają się w duże ogniska krwotoczne na zasadzie reakcji lawinowej, której prawdopodobny mechanizm przedstawiono w innej pracy (Nowacki 1987). Z drugiej strony, przenikanie komórek białaczkowych przez ścianę naczynia prowadzi prawdopodobnie do osłabienia jej spistości. Stanowi to dodatkowo czynnik usposabiający do powstawania ognisk krwotocznych.

Warunkiem niezbędnym do powstawania krwotoków w OUN w białaczkach są jednak zaburzenia w układzie krzepnięcia, natomiast skupiska komórek białaczkowych pełnią jedynie rolę czynnika wydatnie sprzyjającego krwawieniom. Świadczą o tym przypadki z krwotokami bez komórek białaczkowych w mózgowiu i oponach miękkich oraz przypadki z dużą ilością komórek białaczkowych bez cech krwawienia do OUN. Skupiska komórek białaczkowych nie powodują bezpośrednio krwawienia, jednak bardzo zwiększają ryzyko krwotoków, przy współistniejących zaburzeniach w układzie krzepnięcia. Stąd też, jak wykazały nasze obserwacje oraz wcześniejsze doniesienia Moora i wsp. (1960) i Niezabitońskiego (1965), krwotoki do OUN występują najczęściej, gdy towarzyszą im nacieki białaczkowe.

Być może udział komórek białaczkowych w powstawaniu krwotoków mózgowych polega także na nacieczeniu szpiku, w wyniku czego dochodzi do małopłytkowości (Uszyński 1977). Tym niemniej, u naszych chorych z wysoką leukocytozą obserwowaliśmy mniejszy niedobór płytek, niż w przypadkach z niewielkim wzrostem leukocytozy lub leukopenią. Hoagland i Perry (1976) także stwierdzili, że w większości opisanych przez nich przypadków śmierć występowała w okresie umiarkowanego niedoboru płytek krwi, choć w innych okresach trwania choroby małopłytkowość była bardzo wyraźna.

WNIOSKI

1. W przebadanym materiale przeważały przypadki, w których krwotoki w OUN współistniały z naciekami białaczkowymi w mózgowiu i oponach miękkich.
2. Zaburzenia w układzie krzepnięcia wydają się najważniejszą, o ile nie jedyną przyczyną krwotoków do OUN u chorych na białaczki nielinfoblastyczne.
3. Przy istniejących zaburzeniach hemostazy nacieki białaczkowe zwiększają ryzyko krwawienia do OUN.

ROLE OF LEUKEMIC CELLS IN EVOKING CENTRAL NERVOUS SYSTEM HEMORRHAGES IN NONLYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS IN ADULTS

Summary

In 21 cases out of 51 patients suffering from nonlymphoblastic leukemia, leukemic cells and hemorrhages occurred in the brain and meninges. In 9 cases only hemorrhages were found, whereas in 4 leukemic cells appeared without hemorrhagic foci. Hemorrhages were noted mostly around dense leukemic infiltrations, less frequently within them. There were no hemorrhagic changes around vessels with leukostasis. It would seem that the hemorrhages into the central nervous system may be due to hemostatic disturbances. Leukemic cells tend to induce

hemorrhages in the central nervous system, probably as a consequence of reduced compactness of the blood vessels at the beginning of formation of the leukemic perivascular infiltrations, and of ischemic changes in the neighbouring tissue compressed by increasing infiltration.

УЧАСТИЕ ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ КЛЕТОК В ВОЗНИКНОВЕНИИ КРОВОИЗЛИЯНИЙ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ В НЕЛИМФОБЛАСТИЧЕСКИХ ЛЕЙКЕМИЯХ У ВЗРОСЛЫХ

Резюме

Среди 51 случая нелимфобластических лейкомии больные в возрасте 17—68 лет, в 21 случае появились в мозгу и мягких оболочках лейкомические клетки и кровоизлияния в 9 случаях только кровоизлияния, а в 4 случаях — лейкомические клетки без проявления геморрагического диатеза. Симптомы кровоизлияния были найдены вокруг густых лейкомических инфильтратов, а реже в пределе самих инфильтратов. Не было кровоизлияний вокруг сосудов с лейкостазом. Можно думать, что нарушения свертываемости крови ответственны за кровоизлияние в центральной нервной системе; в место того, в присутствии нарушений гемостаза, увеличивают риск кровоизлияния в связи с повреждением сосудистой стенки, особенно капиллярной сети вокруг обширных инфильтратов, давивших окружающие ткани.

PIŚMIENNICTWO

1. Bernard J., Boiron M., Manus A., Levy J. P., Briere J., Dumont J.: Etude des facteurs influençant la survie dans les leucemies aiguës. *Schweiz. Med. Wschr.*, 1964, 84, 709—714.
2. De Queiroz A. G.: Leukemic changes of the brain: The involvement of choroid plexus. *Arg. Neuropsiquiatr.*, 1978, 36, 332—339.
3. Friedman J. A., Schwartz S. O., Leithold S. L.: Platelet function defects with bleeding. Early manifestation of acute leukemia. *Arch. Int. Med.*, 1964, 113, 177—185.
4. Gaydos L. A., Freireich E. J., Mantel N.: The quantitative relation between platelet count and hemorrhage in patients with acute leukemia. *New Eng. J. Med.*, 1962, 266, 905—909.
5. Groch S. N., Sayre G. P., Heck F. J.: Cerebral hemorrhage in leukemia. *Arch. Neurol.*, 1954, 2, 439—451.
6. Heinrich D., Müller W., Heinrich Ch. M., Fischer R.: Vorkommen und häufigkeit Leukämischer Knötchen (leukemic nodules) im Gehirn. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 512—514.
7. Hoagland H. C., Perry M. C.: Blast cell crisis in acute or chronic leukemia. *JAMA*, 1976, 235, 1888—1889.
8. Ławińska B., Pawlak L., Frydecka J., Podolak-Dawidziak M., Krzysztoń Z., Dzik T., Kotlarek-Haus S.: Zająęcie ośrodkowego układu nerwowego w różnych postaciach ostrej białaczki dorosłych. *Przegl. Lek.*, 1982, 39, 649—653.
9. McCormick W. F.: Massive brain hemorrhage. A review of 144 cases and an examination of their causes. *Stroke*, 1973, 4, 946—954.
10. Moore E., Thomas L. B., Shaw R., Freireich E.: The central nervous system in acute leukemia. *Arch. Intern. Med. (Chic.)*, 1960, 105, 451—468.
11. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Iwanowski L.: Zespoły neuropatologiczne w białaczkach. *Rozpr. Wydz. Nauk Med. PAN*, 1962, 7, 157—184.
12. Niezabitowski A.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu białaczek. Praca doktorska. Akademia Med., Kraków, 1965.

13. Nowacki P.: W sprawie mechanizmu powstawania rozległych nacieków białaczkowych w mózgowiu. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 219—225.
14. Pedal J., Oehmichen M.: Trauma und intracerebrale blutung bei leukose. *Med. Welt*, 1981, 32, 1017—1021.
15. Phair J. P., Anderson R. F., Namiki H.: The central nervous system in leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1964, 61, 863—875.
16. Simone J. V., Holland E., Johnson W.: Fatalities during remission of childhood leukemia. *Blood*, 1972, 39, 754—770.
17. Uszyński L.: Hemorrhagic diatheses in myeloproliferative disorders. W: Disorders of hemostasis in surgery. Red. W. Rudowski. University Press, New England, Hanover, New Hampshire, 1977, 378—386.
18. Żukowskaja E. S., Chwatowa N. W.: Sistema svertyvanija krovi bolnych s različnymi formami ostrogo lejkoza. *Probl. Gematol.*, 1973, 18, 41—47.

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

СОДЕРЖАНИЕ

Мечислав Вендер, Зофия Адамчевска-Гонцажевич, Янина Станиславска, Ядвига Панкрац, Данута Тальковска, Алина Гроховальска: Влияние острой гипоксии на липиды миеллина	107
Анна Заремба-Ковальска, Ежи Борович: Влияние временной ишемии мозга на ультраструктуру гигантоцеллюлярной области ретикулярного вещества продолговатого мозга крыс	117
Барбара Гайковска: Влияние кратковременной полной ишемии мозга на n. supraopticus и n. paraventricularis гипоталамуса крысы	131
Анджей Лозш: Секреционные аксоны нервной части гипофиза крысы после реанимации в связи с инцидентом клинической смерти	147
Лех Ивановски: Исследования ультраструктуры капилляров мозга кролика в перинатальном периоде	163
Мария Сконачна, Иоанна Крушевска, Влодзимеж Бич: Оксидативные процессы в митохондриях мозга крыс подвергнутых тепловой экспозиции	177
Анджей Сулински, Эльжбета Берлинска, Влодзимеж Бич: Влияние повышенной температуры среды и физического напряжения на пероксидацию липидов и содержание избранных фосфолипидов в микрозоме мозга и печени крысы	187
Теофан Домжал, Кристина Ренкавек, Божена Залеска: Случай болезни Meige'a. Клинико-морфологическое исследование	197
В. Миллер, И. Рейфферсхейдт, Р. Фиршинг: Онкоцитарная трансформация папилломата сосудистого сплетения. Исследование двух случаев в световой микроскопии	205
Изабела Кухна: Синдром паранеоплазматического воспаления мозга	211
Пжемислав Новацки: По вопросу механизма возникновения обширных лейкоцитарных инфильтратов в мозгу	219
Пжемислав Новацки: Участие лейкоцитарных клеток в возникновении кровоизлияний в центральной нервной системе в нелимфобластических лейкомиях у взрослых	227

SPIS TREŚCI

Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Janina Stanisławska, Jadwiga Pankrac, Danuta Talkowska, Alina Grochowalska: Wpływ ostrego niedotlenienia na lipidy mieliny	107
Anna Zaręba-Kowalska, Jerzy Borowicz: Wpływ przejściowego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę obszaru olbrzymiokomórkowego w tworze siatkowatym rdzenia przedłużonego szczura	117
Barbara Gajkowska: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe podwzgórza szczura	131
Andrzej Loesch: Aksony sekrecyjne przysadki nerwowej szczura po reanimacji w związku z incydem śmierci klinicznej	147
Lech Iwanowski: Badania ultrastruktury włóścinek mózgu królika w okresie okołoporodowym	163
Maria Skonieczna, Joanna Kruszewska, Włodzimierz Bicz: Procesy utleniania w mitochondriach mózgu szczurów poddanych ekspozycji cieplnej	177
Andrzej R. Suliński, Elżbieta Berlińska, Włodzimierz Bicz: Wpływ podwyższonej temperatury i wysiłku fizycznego na peroksydację lipidów i zawartość wybranych fosfolipidów w mitochondriach mózgu i wątroby szczura	187
Teofan Domżał, Krystyna Renkawek, Bożena Zaleska: Przypadek choroby Meige'a. Badanie kliniczno-morfologiczne	197
W. Müller, I. Reifferscheidt, R. Firsching: Onkocytarna transformacja brodawczaka splotu naczyniówkowego. Badanie dwóch przypadków w mikroskopie świetlnym	205
Izabela Kuchna: Zespół paranowotworowego zapalenia mózgu	211
Przemysław Nowacki: W sprawie mechanizmu powstawania rozległych nacieków białaczkowych w mózgowiu	219
Przemysław Nowacki: Udział komórek białaczkowych w powstawaniu krwotoków do ośrodkowego układu nerwowego w białaczkach nielimfoblastycznych u dorosłych	227

CONTENTS

Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Jadwiga Stanisławska, Jadwiga Pankrac, Danuta Talkowska, Alina Grochowalska: Effect of acute hypoxia on myelin lipids	107
Anna Zaręba-Kowalska, Jerzy Borowicz: Effect of transient cerebral ischemia on the ultrastructure of the gigantocellular region of the medullary reticular formation in the rat	117
Barbara Gajkowska: Effect of short-term cerebral ischemia on the supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei of the rat	131
Andrzej Loesch: Ultrastructure of neurohypophysial axons of the rat after reanimation in connection with experimentally induced clinical death	147
Lech Iwanowski: Ultrastructural studies of the rabbit brain capillaries in perinatal period	163
Maria Skonieczna, Joanna Kruszewska, Włodzimierz Bicz: Oxidation in brain mitochondria of rats exposed to heat	177
Andrzej R. Suliński, Elżbieta Berlińska, Włodzimierz Bicz: Effect of high ambient temperature and exercise on lipid peroxidation and phospholipid content in microsomes of rat brain and liver	187
Teofan Domżał, Krystyna Renkawek, Bożena Zaleska: A case of Meige's disease. Clinical and morphological study	197
W. Müller, I. Reifferscheidt, R. Firsching: Oncocytic transformation in choroid plexus papilloma. Lightmicroscopic study of two cases	205
Izabela Kuchna: A syndrome of paraneoplastic encephalitis	211
Przemysław Nowacki: Considerations on the mechanism leading to extensive leukemic infiltrations in the brain	219
Przemysław Nowacki: Role of leukemic cells in evoking central nervous system hemorrhages in nonlymphoblastic leukemias in adults	227