

201.92 CMDiK

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

A-23

TOM 26

1988

ZESZYT 3

---

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

<http://rcin.org.pl>



# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

## KWARTALNIK

---

TOM 26

1988

ZESZYT 3

---

### KOMITET REDAKCYJNY

Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Janusz Groniowski, Józef Kałuża, Adam Kunicki, Agnieszka Jędrzejewska, Tadeusz Majdecki, Mirosław J. Mossakowski, Przemysław Nowacki, Wielisław Papierz, Mieczysław Wender, Irmina B. Zelman

### PRZY WSPÓLPRACY

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

### REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina B. Zelman

### REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski  
Zastępca Redaktora Naczelnego: Irmina B. Zelman  
Sekretarz Redakcji: Irena Wilkoszewska

### ADRES REDAKCJI

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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Maszynopis niniejszego nru przekazano Wydawcy 18 kwietnia 1988



IRENA HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ

## THE EMERY-DREIFUSS DISEASE\*

Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw and Neuromuscular Unit, Medical Research Centre, Warsaw

Although dystrophy with early contractures already has been described in 1902 (Cestan, Lejonne 1902), in the last two decades it has become a subject of growing interest. The modern neurological tools have a much greater possibility to contribute to its diagnosis than was the case at the beginning of the century. Many cases of dystrophy with early contractures and cardiomyopathy have remained, however, undiagnosed properly uptill now; they came often first to the attention of cardiologists. It is difficult to evaluate how many cases have been diagnosed as various myopathies, scapulo-peroneal dystrophy, Backer dystrophy, rigid spine syndrome etc. Strange enough Emery-Dreifuss (E-D) dystrophy is not mentioned in important text book classification (Gardner-Medwin, Walton 1974).

The modern approach to the understanding of dystrophy with early contractures started with the papers of Becker and Kiener (1955), Dreifuss and Hogan (1961) and Emery and Dreifuss (1966). Since that time the disease has been characterized by the following criteria: early contractures, most often starting at the elbow and neck; involvement of the proximal muscles in upper extremities and distal muscles in legs (at least distal muscles are affected earlier than pelvic muscles) with absence of pseudohypertrophy. The pattern of inheritance is X-linked recessive. Cardiac conduction abnormalities found usually later in the course of the disease are an important part of the syndrome (Seitz 1958; Rothauwe et al. 1972; Camman et al. 1974; Petty et al. 1986).

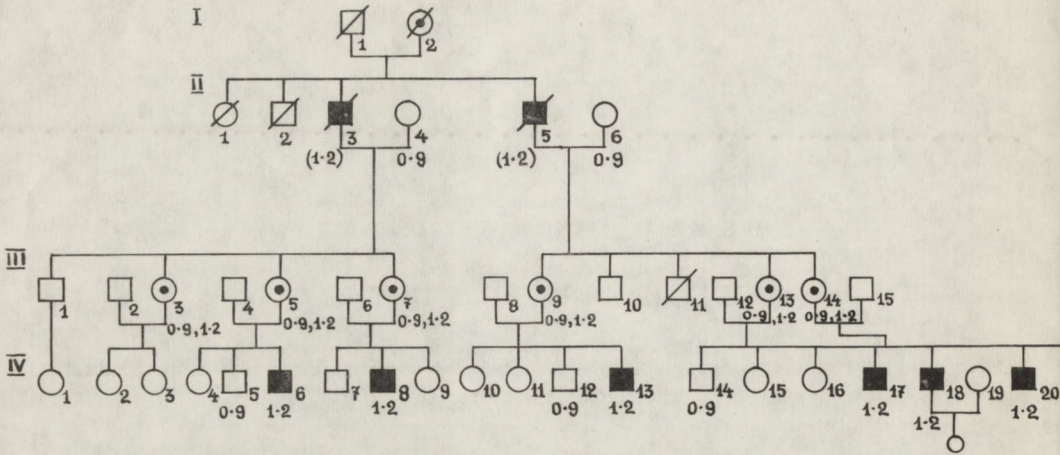
The first papers were followed by other reports, some of them concerning actually the same disease, but some others rather confusing. In a review of E-D cases Merlini et al. (1986) reported that until then only six families with 73 affected subjects had been described in a reliable way; they also reported on a new case of an Italian family. Since then four more families have been described

---

\* Work supported partly by Polish Academy of Sciences, partly by MDA grant 1986—1987.



M.D. EMERY-DREIFUSS TYPE. PEDIGREE P



FACTOR VIII PROBE. /F 8 A/.  
FRAGMENTS 0-9 Kb, 1-2 Kb.



Fig. 1. Pedigree of P. family. Propositus IV-17 M. P.

Ryc. 1. Rodowód rodziny P. Proband IV-17 M. P.

Fig. 1A. Propositus IV-17 M. P. at age of 21 years and his brother IV-20 M. P. at age of 10 years

Ryc. 1A. Proband IV-17 M. P. w wieku lat 21 z bratem IV-20 M. P. w wieku lat 10



in the literature and three families have been observed in Warsaw. We feel that the report on the familial cases may be a further contribution to the knowledge of this peculiar syndrome, we therefore describe these three families with 10 affected males.

— 1. Family P. (Figs 1 and 1a).

Propositus M. P. (IV-17) and 5 members were examined in our Department (see Table 1).

M. P. IV-17, born in 1963 in asphyxia, developed since early childhood contractures at the elbows and neck, and later also ankles. His gait was always wadding. He was examined in our Department for the first time at the age of 15 years. On examination the muscles were generally very thin, particularly *biceps brachii*, *triceps brachii* and *tibialis anterior*. There was no hypertrophy. He walked on tiptoe and had difficulty in climbing stairs and getting up from the floor. Flexion of the neck was limited to 20% of movement. Elbow extension was limited to 75%. *Pectus excavatus* and winging scapulae were noted. Dorsiflexion of the ankles was very limited. Tendon reflexes were abolished. There was pronounced lumbar lordosis, at present he is weaker and has more difficulty in walking. For laboratory data see Table 1.

All the living (affected and nonaffected) members of the family P. were personally seen by one of our staff. All the living affected males were examined as inpatients and enzymes estimation, electrocardiography, electromyography, biopsy were done in all of the cases (Table 1). The members II-3 and II-5 (Fig. 1) died suddenly of "heart attacks". Two of the affected members are briefly described here because of a very different clinical expression of disease:

M. P. IV-20, born 1968. He was seen in our Department at the age of 10 years as a "healthy" brother of the propositus. The family had not noticed any abnormalities in the child. Our only finding was that he was unable to walk uphill. For laboratory tests see Table 1.

T. Sz. IV-13, born 1980 as a premature infant (his birth weight was 2200 g). Since early childhood he had had a wadding gait. He was examined for the first time at the age of 5 years. Examination revealed slimness of the limb muscles, winging scapulae, muscular hypotonia, weakness of the shoulder muscles. In the lower limbs there was weakness of the hip flexors and toe extensors. Knee reflexes were absent, he had difficulty in rising from the floor. The disease has been rapidly progressing and at present he can hardly walk. For laboratory data see Table 1. The EMG needs more detailed description: there was a considerable shortening of potentials, increased percentage of polyphasic potentials and the full interference pattern, in spite of weak concentration, indicates myopathic lesion. Nerve conduction velocity (both motor and sensory) was normal.

The *quadriceps femoris* muscle was examined in all patients. In none of them was this muscle normal. All had fiber type 2 predominance. The NADH reaction shows type 1 fibers to be significantly smaller than type 2 fibers (Fig. 2). The type 2 fibers measured  $70 \mu \pm 4$ , the type 1 fibres  $20 \mu \pm 3$ . In one patient



Table 1. Clinical and laboratory findings in affected males in family P  
 Tabela 1. Kliniczna i laboratoryjna charakterystyka chorych w rodzinie P

	IV-6	IV-8	IV-13	IV-17	IV-18	IV-20
Delivery	normal	normal	premature	asphyxia	normal	complic. pregnancy
Age of onset of symptoms	4	4	2	3	5	
Age of first examination	10	7	5	15	13	10
Ambulant	+	+	-	+	+	+
Lumbar lordosis	+	+	+	-	-	-
Winging scapulae	+	+	+	+	+	-
Wasting						
of upper limb m.m.						
distal	-	-	+	-	-	-
proximal	++	+	++	+	+	-
of lower limb m.m.						
distal	++	+	++	++	-	-
proximal	+		+	+	-	-
Weakness						
of upper limb m.m.						
distal*	+/-	+	++	-	-	-
proximal	+	++	++	+	+	-
of lower limb m.m.						
distal	+/-	+	+++	++	+	+
proximal	+	+	+++	-	+/-	-
Contractures						
neck	+	-	-	-	-	-
elbow	+	-	-	++	++	+
ankle	+++	+	+	+++	+	+
hip	-	-	-	-	-	-
other	-					
Reflex arms/legs	-/-	+	+/-K +A	-/-	+/-K +A	+/+
Calf hypertrophy	-	-	-	-	-	-
Course	progr.	progr.	rapidly	slowly	progr.	stat.
I.Q.	101	120	96	120	117	104
Creatinine Kinase (CK)**	212	147	123	78.5	185	68.6
Electromyography	Miop.	Miop.	severe Miop.	Miop.	Miop.	Miop.
Biopsy:						
type 1 atrophy	+	+		+	+	+
type 2 predominance	++	++	+	+		+
other	-	-	+°	-	-	-
Abnormal ECG	-	-	+	+	-	-

° The biopsy was different from other biopsies in this family — it is shown in Fig. 5

\* Predominantly wrist extensor

+/- slight

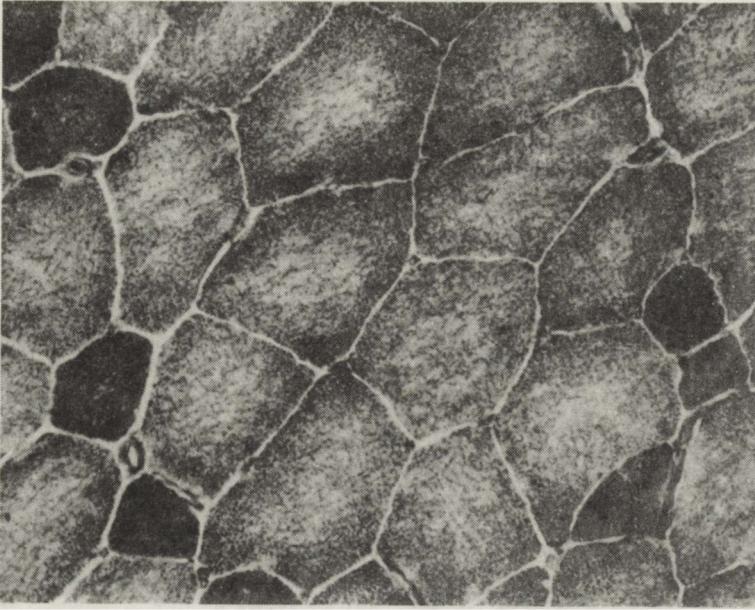
\*\* Normal range 0 — 34 I.U.

+

++ moderate

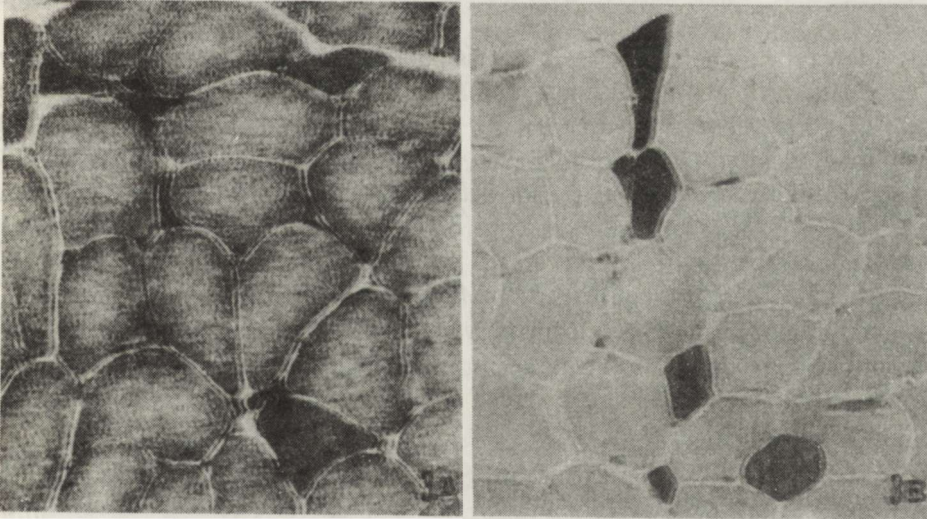
+++ severe





*Fig. 2.* Quadriceps femoris (patient from pedigree P. IV-20). NADH staining shows type 1 fibers to be significantly smaller than type 2 fibers ( $20 \mu\text{m} \pm 3$  and  $70 \mu\text{m} \pm 4$ , respectively)

*Ryc. 2.* Mięsień czworogłowy uda (chory z rodziny P. IV-20). Barwienie NADH wykazuje, że włókna typu 1 są znacznie mniejsze od włókien typu 2 (odpowiednio  $20 \mu\text{m} \pm 3$  i  $70 \mu\text{m} \pm 4$ )



*Fig. 3.* Quadriceps femoris (patient PA from pedigree P., IV-6). Small angulated fibers type 1 seen against background of type 2 fibers: 3A — NADH,  $\times 224$ . 3B — ATP-ase pH 4.3,  $\times 224$

*Ryc. 3.* Mięsień czworogłowy uda (chory P. A. z rodziny P. IV-6). Małe angularne włókna typu 1 widoczne na tle włókien typu 2. 3A — NADH. Pow.  $224 \times$  3B — ATP-aza pH 4,3. Pow.  $224 \times$



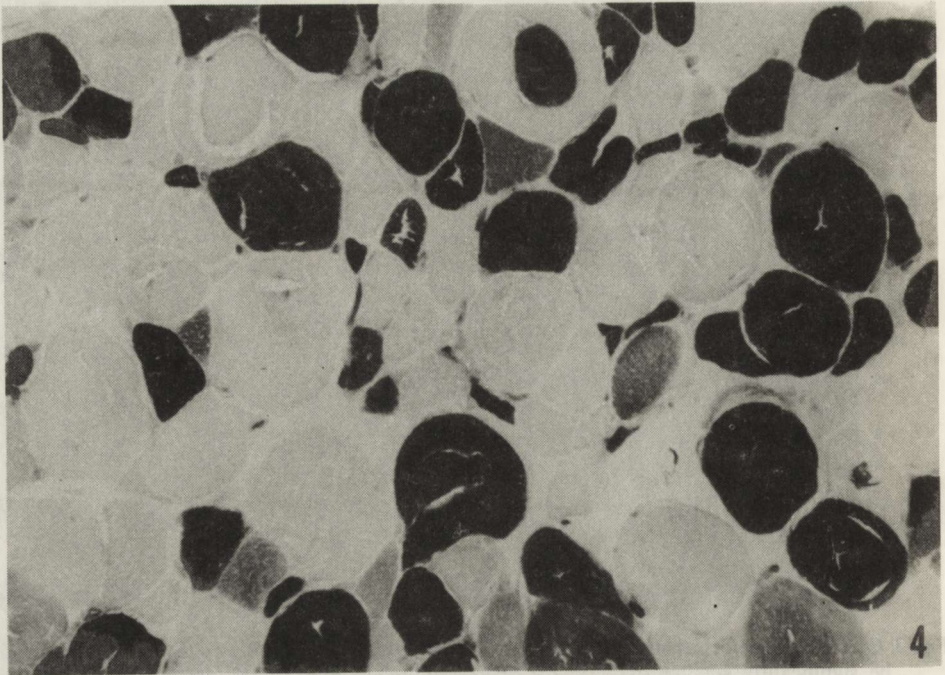


Fig. 4. Patient Sz. T. IV-13 from pedigree P. Quadriceps femoris, some variability of the size of fibers. ATP-ase pH 4.3.  $\times 224$

Ryc. 4. Chory Sz. T. IV-13 z rodziny P. Mięsień czworogłowy uda. Różnorodność średnicy włókien mięśniowych. ATP-aza pH 4,3. Pow. 224  $\times$

only a few type 1 fibers were seen. In this patient NADH reaction showed only a few small, dark, angulated fibers seen against a background of type 2 muscle fibers (Fig. 3A). The ATP-ase pH 4.3 reaction showed the small angulated fibers more clearly because of their very dark staining (Fig. 3B). In case IV-13 biopsy of the *quadriceps femoris* showed increased connective tissue between muscle fibers, the fibers were of very different diameters, in some fascicles hypertrophic fibers with central nuclei were seen (Fig. 4). In 60% of fibers small vacuoles were present (Fig. 5A). Metabolic differentiation was preserved, the predominance of type 2 fibers was, however, very pronounced. No PAS-positive accumulation was seen, vacuoles showed fat content above normal. Electron microscopy revealed an excess of lipid droplets between myofibrils (Fig. 5B).

In case IV-13 the muscle was tested for calcium-binding protein just for differentiation from Duchenne muscle. No abnormality in calcium-binding protein was noted (Niebrój-Dobosz et al., in preparation). No colour blindness was found in any of the family members. Blood samples from 19 members of family P. were tested in Glasgow for recombination of DNA and it was found that E-D was linked to several DNA markers on distal Xq. The results have



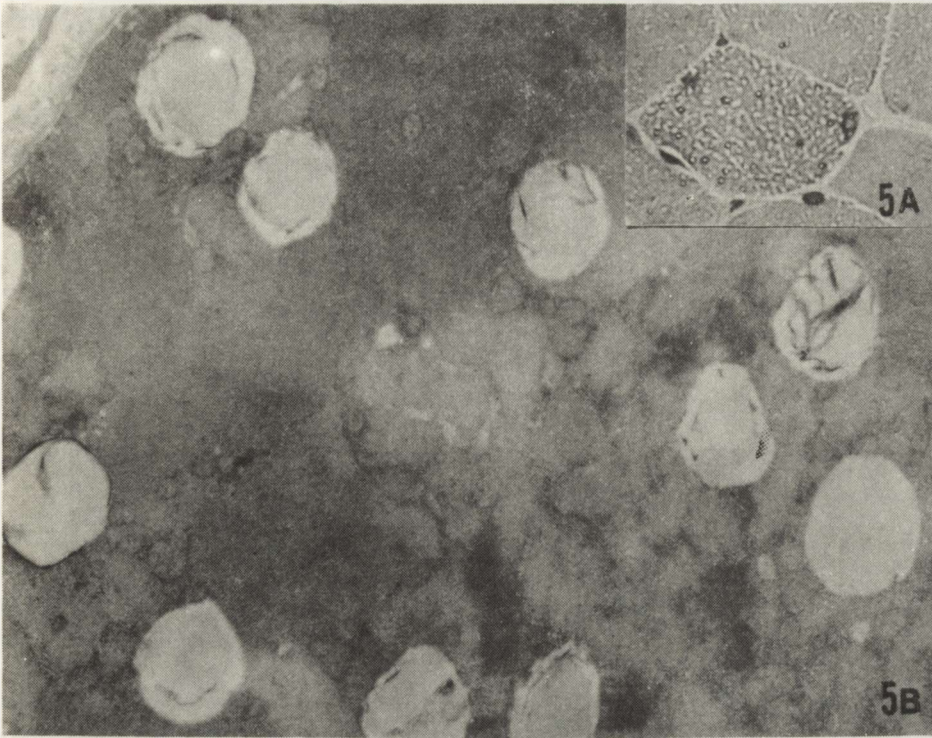


Fig. 5. Patient Sz. T. IV-13 from pedigree P. Quadriceps femoris 5A — muscle fiber with small vacuoles. H—E.  $\times 448$ . 5B — Lipid droplets seen between myofibrils.  $\times 17000$

Ryc. 5. Chory Sz. T. z rodziny P. Mięsień czworogłowy uda. 5A — Włókno mięśniowe z małymi wodniczkami. H—E. Pow. 448  $\times$ . 5B — Kropelki tłuszczu między miofibrilami. Pow. 17000  $\times$

been reported previously (Yates et al. 1986), the previously published figure of pedigree shows only the family members included in the linkage study.

## 2. Family K. (Figs 6 and 7).

Propositus III-4 examined in 1986 at the age of 30 years. The contractures at the elbows and ankles started in early childhood at the age of 3–4 years, and were followed by neck and hip contractures. However, he has been able to walk and has been working as an architect. The muscles were very thin, there was no pseudohypertrophy, except maybe for the *extensor digitorum brevis*. There was slight weakness of *triceps brachii* and *biceps brachii*. Reflexes in upper and lower extremities were absent except for the ankle reflexes. He was very bright. He has never complained about his heart. CK was 110 IU, aldolase 46, EMG showed significantly shortened action potentials, increased percent of polyphasic potentials, full interference at maximal effort pattern. These signs indicated myopathic changes. Biopsy of *quadriceps femoris dexter* revealed increased connective tissue content between muscle fibers, some necrosis, metabolic differentiation into types was absent. Routine ECG was normal,



EMERY-DREIFUSS TYPE DYSTROPHY  
 PEDIGREE K

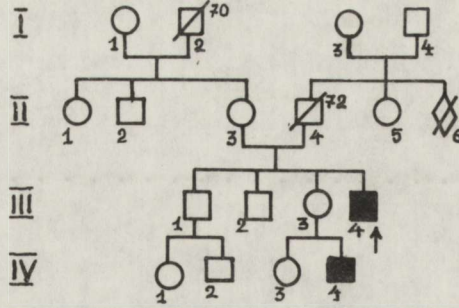


Fig. 6. Pedigree K. Propositus III-4  
 Ryc. 6. Rodowód rodziny K. Proband III-4



Fig. 7. Z. K. at 32 years of age, III-4 pedigree K  
 Ryc. 7. Z. K. III-4 z rodziny K. w wieku 32 lat



Holter monitoring, however, revealed abnormal sinu-atrial and atrio-ventral conduction. The patient refuse to use a pacemaker.

His sister's son IV-4, 16 years old had contractures since childhood, EMG, ECG, were normal, CK was 57.3, aldolase 30. No colour blindness was found in any of them.

3. Family D. (Fig. 8).

Propositus Z. D., III-4, born 1972. According to his mother since the age of 6 years he started walking on tiptoe and ankle contractures appeared. He was examined for the first time in our Department at the age of 12 years. In the upper limbs the muscles, particularly the proximal ones, were very thin. He had winging scapulae, slight elbow and Achilles contractures, and areflexia. Electromyography showed very slight changes indicative of myopathy. CK was 39 IU, ECG was normal. Biopsy of the *m. biceps brachii* showed type 2 fibers predominance, and the few spread out type 1 fibers were of very small diameter.

Z. J., II-4, the maternal uncle of Z. D., born in 1946. Since the age of 11 years he has had gait difficulties and muscles weakness. The first examination in our Department was carried out in 1984. In the upper limbs, weakness and slimness of *biceps brachii*, *pronator teres*, *extensor carpi radialis*, *extensor carpi ulnaris*, *extensor digitorum communis* were noted. In the lower limbs *extensor hallucis longus*, *interossei dorsalis* and *m. plantaris* were moderately weak. There were elbow and Achilles contractures. For many years he had had heart problems. Laboratory tests showed the following data: EMG revealed advanced myogenic changes, ECG and echocardiography showed conduction block, atrial fibrillation and bradykinesia. CK was 102.5 IU, and aldolase 18.5. His 3 brothers died suddenly in early childhood from unknown cause. In both patients no colour blindness was observed.

EMERY-DREIFUSS TYPE DYSTROPHY  
PEDIGREE D

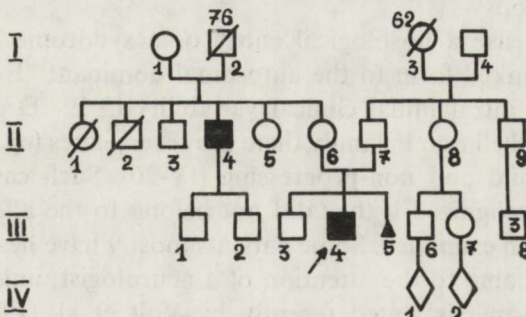


Fig. 8. Pedigree D. Propositus III-4  
Ryc. 8. Rodowód rodziny D. Proband III-4



Table 2. Emery-Dreifuss syndrome\*. The familial cases with X-linked transmission

Tabela 2. Zespół Emery-Dreifussa\*. Przypadki rodzinne ze sprzężonym z płcią dziedziczeniem

Authors Autorzy	Year Rok	No. of cases Liczba przypadków
Emery and Dreifuss	1966	8
Rotthauwe et al.	1972	17
Thomas et al.	1974	8
Camman et al.	1975	18
Hopkins et al.	1981	17
Merlini et al.	1986	5
Johnston and McKay	1986	3
Voit et al.	1988	6
Present series	1988	10 (in 3 families) (w 3 rodzinach)

\* Sporadic cases even the most convincing, are omitted

\* Przypadki sporadyczne, nawet najbardziej przekonujące, zostały pominięte

#### DISCUSSION

The described families meet all criteria of E-D disease and in the largest of the examined kindred, the disease is not only confirmed by the mode of inheritance but also by linkage study. Recently several excellent reviews on the E-D disease have been published (Rowland et al. 1979; Merlini et al. 1986; Petty et al. 1986) and there is no need to repeat them. Only some selected problems will be discussed, namely:

1. Intrafamilial clinical variability of E-D disease
2. Is the course of the disease as mild as it is thought to be?
3. Relation between contractures and other symptoms
4. Confusing meaning of some laboratory data, particularly EMG, sometimes also biopsy
5. Is E-D disease a nosological entity or a syndrome and what is the relation of the X-linked form to the autosomal dominant "E-D type" form?

*Ad. 1.* Striking intrafamilial clinical variability in E-D disease has been observed by us. In the large P. family there are severe cases (eg. IV-13, Fig. 1) or cases which are mild and non-progressing (IV-20). Such cases as the latter would remain unrecognized if they did not belong to the affected family and would not have been examined. Some patients mostly have heart problems and they would never come to the attention of a neurologist, unless referred by a cardiologist. The same is stated recently by Voit et al. (1988).

*Ad. 2.* The other question which should be answered is whether the E-D disease is justifiably considered to be mild. This question was already raised by



Merlini et al. (1986) and we do agree with them that there is no reason to call this disease mild. As Merlini et al. (1986) mention 30 out of 73 reported cases died suddenly. In the family P. there were also two (II-3, II-5, Fig. 1) and in family D. three sudden deaths. In E-D disease the risk of sudden death is very high and it should also be stressed that death is very often unexpected and patients usually have no cardiac symptoms before acute heart failure (only one of our patients in family D., II-2 had cardiac complaints). Our patient II-4 from family K. had never complained about any cardiac problem, and first Holter monitoring revealed a severe atrio-ventricular block of which he was not aware. Cardiac disturbances such as conduction block and rhythm abnormalities are nearly always present in adult patients (Emery, Dreifuss 1966; Rothauwe et al. 1972; Waters et al. 1975; Hopkins et al. 1981; Voit et al. 1988). In children the cardiac problem may not be present and develops later in the course of the disease, or it is so mild that it may be missed in routine ECG. It is confirmed by others (Voit et al. 1988) and for instance the patient from original E-D family, who developed elbow contractures at the age of 3, developed cardiac symptoms after 23 years (McKusick 1971). It seems, however, that in some children cardiac disturbances may appear early and be so severe that they lead to sudden death in infancy even before any skeletal muscular problem is observed and diagnosed. Since the disease seems to be rather severe prenatal diagnosis is very important and is at present possible (Thomas et al. 1986).

*Ad. 3.* The next puzzling question is, why do the patients have contractures so early, i.e. at the stage when the muscles are often still quite strong. Usually the contractures precede weakness and frequently are out of proportion to muscle weakness. There is also no correlation between these contractures and cardiac involvement, or between cardiac involvement and muscle weakness (Waters et al. 1975; Voit et al. 1988). In older literature Trömmner (1925) discussed the nature of the phenomenon which he called "*dystrophia myosclerotica*" (one of his cases seems to be a true E-D dystrophy) and in more recent papers these disproportions have always been stressed but rarely explained. Some authors (Schenk, Mathias 1920; Hallen 1966) tried to explain the condition termed as "*dystrophia muscularis progressive retrahens*" which they considered to be the result of muscle fibrosis (only one out of two cases of Hallen (1966) was familial and indicated an autosomal dominant inheritance). There are no sufficient modern data on muscle itself in E-D disease or on the nervous system either. In necropsy of the E-D case described by Thomas et al. (1972) the spinal cord was not examined. In a case described by Dubowitz and Brooke (1973) in necropsy the nervous system was entirely normal. As concerns the primary cause for early contractures the central mechanism should be also taken into account.

*Ad. 4.* Interpretation of EMG and biopsy in the E-D disease is sometimes difficult. In papers on E-D disease electromyographic examination is evaluated in a very confusing way. In some papers conclusions refer to the myopathic character, but in others such findings as high potentials, fibrillation,



positive sharp waves beside full recruitment pattern are stressed. Some authors refer to EMG as neuromyopathic, some describe a mixed character of findings – in one muscle – apparently neurogenic, in another – myopathic. Lin (1982) states clearly that the EMG indicates longstanding benign myopathy, and also stresses the frequency of complex potentials with satellite components. The reason for this confusion may be either too schematic interpretation of EMG changes or, as we believe may be the case, truly complex conditions of shortened muscle. Witt et al. (1987) believe that in the dominant autosomal form of the E–D syndrome EMG is neurogenic. In our series EMG is definitely indicative of myopathy in all the patients, fiber density is normal, some very peculiar signs in the EMG findings will be discussed elsewhere (Hausmanowa-Petrusewicz, Rowińska – in preparation). Many authors point out that it is often difficult to decide, whether even the biopsy should be evaluated as neuro- or myogenic. In children with E–D disease the muscle fibers are well preserved and no abnormalities, except fiber type disproportions are noted. In case IV-13 from the family P., beside predominance of type 2 fibres, and smallness of type 1 fibers, lipid vacuoles are observed. These findings have also been mentioned in the literature (Merlini et al. 1986).

Type 1 fiber smallness and predominance of type 2 fibres are unusual in muscle dystrophies and the first assumption is often to recognize this pattern as neurogenic. Some authors indicate that reinnervation is not the only mechanism responsible for fiber type disproportion, others (Guth, Yellin 1981) showed that the feedback mechanism from the muscle itself may change the nerve impulses supplying the muscle. So far in “myopathic” patients (with the exception of myotonic dystrophy) only the shift in fiber type composition towards slowing of muscle has been described, i.e. increase in the proportion of type 1 fibers (Johnson et al. 1973). In E–D patients the shift is obviously towards the predominance of type 2 fibers. It could be also possible as Sarnat (1986) proposes in some cerebral dysgeneses that the following phenomena occur: a) maturation delay or arrest, i.e. incomplete histochemical differentiation of muscle fibers, b) one fiber type predominance of more than 80 %, c) selective hypotrophy of type 1 muscle fibers. In addition the complex condition of muscle restricted so early in its normal function, which is the case in E–D myopathy, should also be stressed. Changes in type 2 fibers with splitting, described by some authors (Rowland et al. 1979; Merlini et al. 1986) speak also in favour of myopathy. The uniform metabolic pattern in the adult patient II-4 from family K. could be the result of progressing changes (atrophy?) of type 1 fibers and their subsequent disappearance and replacement by connective tissue. In adult patients we generally observed moderately increased connective tissue content, but no splitting. Voit et al. (1988) evaluate their biopsies as just dystrophic.

CK is slightly or moderately raised. In our cases its level did not exceed 220 IU (normal range 0-34 IU) and an approximately similar increase has been mentioned in the literature. When the level of CK was followed up over ten



years (Johnson, McKay 1986) it could be observed that CK increased in the course of the disease, contrary to what is seen, e.g. in Duchenne dystrophy. It is possible that the CK rise is related to muscle shortening and to secondary muscle changes.

*Ad. 5.* We will not discuss the difficulties in differential diagnosis from other similar syndromes such as rigid spine syndrome (Dubowitz 1973; Goto et al. 1981) or from some obviously neurogenic E-D-like syndromes (Mawatari, Katayama 1973; Takahashi et al. 1974). Differential diagnosis has already been done in a very detailed way by Rowland et al. (1979). It is worth stressing that the rigid spine syndrome occurs in some families only in males (Dubowitz 1973; Goto et al. 1981) and, at least in some children, it is quite similar to E-D disease.

What manifestations should be called E-D disease and which should be excluded? Should the form "disease" or "syndrome" be used? No doubt some cases of E-D disease are unrecognized or misdiagnosed. It is particularly true in sporadic or atypical cases e.g. with predominance of cardiac symptoms (Waters et al. 1975; Voit et al. 1988). On the other hand, some cases are described as E-D disease without convincing evidence, e.g. the very interesting family described by Wadia et al. (1976). In the affected members of this family the contractures appeared late in the course of disease, in most patients the clinical features are suggestive of Becker dystrophy. In some doubtful sporadic cases it is safer to avoid what Rowland et al. (1979) call "compulsive need to assign near diagnostic slots for every patient". In their excellent paper on the E-D disease Rowland et al. discuss all the cases reported in the literature, including sporadic ones and stress the typical homogeneous clinical expression in E-D dystrophy. This expression seems to be far from homogeneous and we agree with Merlini et al. (1986) that at present only familial cases with a known mode of inheritance should be the basis for studying the nature of E-D dystrophy. We feel that the diagnosis of E-D disease should be limited to X-linked recessive inheritance, by now also confirmed by gene studies (Boswinkel et al. 1985; Thomas et al. 1986; Yates et al. 1986), which map the gene in the distal part of the long arm of the X chromosome. The autosomal dominant "dystrophy" which has strong clinical resemblance to the E-D X-linked disease is of course a separate nosological entity. This dominant autosomal muscular "dystrophy" with early contractures and cardiomyopathy was described much earlier than the X-linked form. As authors of the first clinico-genetical description of the autosomal dominant form, Hauptmann and Thannhauser (1941) should be accepted or — if we do not like to multiply eponyms — the term "Emery-Dreifuss syndrome" should be introduced instead E-D dystrophy or E-D disease and two nosologically distinct entities might be called by the same name of syndrome. After publication of the original paper, more families with autosomal dominant type of transmission have been described (Chakrabarti, Pearce 1981; Fenichel et al. 1982; Miller et al. 1985; Witt et al. 1987).

Is a clear distinction between these two diseases possible? According to



Becker (1982, 1986) it is up till now impossible. He suspects, however, that the dominant type is more variable as regards severity of the disease and the age of its onset. Miller et al. (1985) suggest that the kind of cardiac involvement may be different in these two types. According to our experience, the X-linked type of E–D disease exhibits an extremely high intrafamilial variability, since the criterion of clinical expression does not seem to be valid. According to the paper of Miller et al. (1985), who also reviewed the cases from the literature, the onset of the disease seems to be the same in both types. One sign is striking, in the cases of Miller et al. (1985) – the patient has large calves which have never been seen in our series. According to Miller et al., (1985) cardiac involvement of ventral character occurs only in the dominant autosomal type, but Becker (1986) is probably right in saying that this problem needs further investigation and the experience of Voit et al. (1988) speaks in favour of similar cardiac involvement in both forms. Consequently, the clinical picture is unique but not so homogeneous as Rowland et al. (1979) suppose and it is the reason why some mild cases remain unrecognized or some are under the care of cardiologists, because the muscle involvement is overlooked being so unimportant. Some other, particularly sporadic cases, are frequently misdiagnosed.

#### CONCLUSIONS

The E–D syndrome includes at least two distinct nosological entities with the same (or very similar) phenotypic expression.

The name E–D disease should be limited to the X-linked form of muscle involvement with early contractures and cardiomyopathy.

This disease shows extremely high intrafamilial variability and in some cases it is far from being benign, not because of muscle weakness, but owing to increasing contractures and cardiac failure.

#### CHOROBA EMERY–DREIFUSSA

##### Streszczenie

W pracy przedstawiono 10 przypadków choroby Emery–Dreifussa pochodzących z trzech rodzin, w których stwierdzono sprzężone z płcią dziedziczenie tej choroby. Autor podkreśla: 1) wewnątrzrodzinną zmienność obrazu klinicznego, 2) niewyjaśniony patomechanizm przykurczy, 3) ciężki przebieg choroby u niektórych chorych, zależny od niewydolności sercowej oraz 4) trudności w interpretacji czynności elektrycznej i obrazu morfologicznego mięśnia. U 19 członków jednej z omawianych rodzin, w której było 6 chorych, stwierdzono lokalizację genu na długim ramieniu chromosomu X (w jego części dystalnej). Dystroficzny charakter choroby Emery–Dreifussa jest jeszcze niedostatecznie udowodniony. Autor sugeruje zachowanie eponymu „Emery–Dreifussa” wyłącznie do zespołu o dziedziczeniu sprzężonym z płcią.



## БОЛЕЗНЬ EMERY-DREIFUSSA

## Резюме

Представлено 10 случаев болезни Emery-Dreifussa, происходящих из 3-х семей, в которых обнаружена связанная с полом наследственность этой болезни. Автор подчеркивает: 1) внутрисемейную изменчивость клинической картины; 2) невыясненный патогенез контрактур; 3) тяжелое течение болезни у некоторых больных, зависимое от сердечной недостаточности и 4) трудности в интерпретации электрической активности и морфологической картины мышц. У 19 членов одной из вышеупомянутых семей, в которой болело 6 человек, найдена локализация гена на длинной части хромосомы X, в ее дистальном участке.

Дистрофический характер болезни Emery-Dreifussa еще недостаточно доказан. Автор настаивает на том, чтобы эпоним „болезнь Emery-Dreifussa” употреблять только при синдромах с наследственностью, связанной с полом.

## REFERENCES

1. Becker P. E.: Neues zur Genetik und Klassifikation der Muskeldystrophien. *Hum. Genet.*, 1982, 17, 1–22.
2. Becker P. E.: Dominant autosomal muscular dystrophy with early contractures and cardiomyopathy (Hauptmann-Tannhauser). *Hum. Genet.*, 1986, 74, 184.
3. Becker P. E., Kiener F.: Eine neue X-chromosomale Muskeldystrophie. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1955, 193, 427–448.
4. Boswinkel E., Walker A., Hodgson S. et. al.: Linkage analysis using eight DNA polymorphism along length of the X chromosome locates the gene for Emery–Dreifuss muscular dystrophy to distal Xq. *Cytogenet. Cell Genet.*, 1985, 40, 586–591.
5. Camman R., Vehreschild T., Ernst K.: Eine neue Sippe von X-chromosomal benigner Muskeldystrophie mit Frühkontrakturen (Emery–Dreifuss). *Psychiatr. Neurol. Med. Psychol.*, 1974, 26, 431–438.
6. Chakrabarti A., Pearce J.: Scapuloperoneal syndrome with cardiomyopathy: report of a family with autosomal dominant inheritance and unusual features. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1981, 44, 1146–1152.
7. Cestan R., Lejonne N. J.: Une myopathie avec retractions familiales. *Nouv. Iconogr. Salpetriere.* 1902, 155, 38–52.
8. Dreifuss F. E., Hogan G. R.: Survival in X-chromosomal muscular dystrophy. *Neurology*, 1961, 11, 734–737.
9. Dubowitz V.: Rigid spine syndrome a muscle syndrome in a search of a name. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1973, 66, 219–220.
10. Dubowitz V., Brooke H. M.: *Muscle biopsy: a modern approach.* Saunders, London, 1973.
11. Emery A. E. M., Dreifuss F. E.: Unusual type of benign X-linked muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1966, 29, 338–342.
12. Fenichel G. M., Sul J. C., Kilroy A. W., Blouin R.: An autosomal dominant dystrophy with humeropericlavicular distribution and cardiomyopathy. *Neurology*, 1982, 32, 1399–1401.
13. Gardner-Medwin D., Walton J. N.: The clinical examination of the voluntary muscles. In: *Disorders of voluntary movements.* Ed. J. N. Walton, Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1974, pp. 546–560.
14. Goto J., Muraoka S., Fuji N., Ohta M., Kuroiwa Y.: Rigid spine syndrome: clinical and histological problems. *J. Neurol.*, 1981, 226, 143–148.
15. Guth R., Yellin H.: The dynamic nature of the so-called “fiber types” of mammalian skeletal muscles. *Exp. Neurol.*, 1981, 31, 277–300.
16. Hallen O.: Über die Dystrophia muscularis progressiva retrahens. In: *Progressive Muskel-dystrophie-Myotonie-Myasthenie.* Ed. E. Kuhn, Springer, Heidelberg, 1966, pp. 85–86.



17. Hauptmann A., Thannhauser S. J.: Muscular shortening and dystrophy. A hereditary disease. *Arch. Neurol. Psychiatr.*, 1941, 46, 654–666.
18. Hopkins L. C., Jackson J. A., Elsas L. J.: Emery-Dreifuss humeroperoneal dystrophy: an X-linked myopathy with unusual contractures and bradycardia. *Ann. Neurol.*, 1981, 10, 230–239.
19. Johnson M. A., Sideri G., Weightman A., Appleton D. A.: A comparison of fibre size, fibre type constitution and spatial fibre distribution in normal human muscle and in muscle from cases of spinal muscular atrophy and from other neuromuscular disorders. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 20, 345–361.
20. Johnston W. A., McKay E.: X-linked muscular dystrophy with contractures. *J. Med. Genet.*, 1986, 23, 591–595.
21. Lin J. T.: EMG in Emery-Dreifuss syndrome. *Muscle a. Nerve*, 1982, 5, 562.
22. Mawatari S., Katayama K.: Scapulooperoneal muscular dystrophy with cardiopathy. *Arch. Neurol.*, 1973, 28, 55–59.
23. McKusick, V.: X-linked muscular dystrophy benign form with contractures. *Birth Defects Orig. Art. Series*, 1971, 7, 113–123.
24. Merlini L., Granata C., Dominici P., Bonfiglioli S.: Emery–Dreifuss muscular dystrophy: report of five cases in a family and review of the literature. *Muscle a. Nerve*, 1986, 9, 481–485.
25. Miller R. G., Layzer R. B., Mellethin M. A., Golabi M., Francoz R. A., Mall J. C.: Emery–Dreifuss muscular dystrophy with autosomal dominant transmission. *Neurology*, 1985, 35, 1230–1233.
26. Petty R. K. H., Thomas P. K., Landon D. N.: Emery–Dreifuss syndrome. *J. Neurol.*, 1986, 233, 108–114.
27. Rothauwe H. W., Mortier W., Beyer M.: Neue Typ einer rezessive X chromosomal vererbten Muskeldystrophie: scapulo-humero-distal Muskeldystrophie mit frühzeitigen Kontrakturen und Herzrhythmusstörungen. *Hum. Genet.* 1972, 16, 181–200.
28. Rowland L. P., Fetell M., Olarte M., Hays A., Singh N., Wanat F. E.: Emery–Dreifuss muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, 1979, 5, 111–117.
29. Sarnat H. B.: Cerebral dysgeneses and their influence on fetal muscle development. *Brain Dev.*, 1986, 8, 495–499.
30. Schenk P., Mathias E.: Zur Kasuistik der Dystrophie musculorum progressiva retrahens. *Berl. Klin. Wschr.*, 1920, 57, 557–558.
31. Seitz D.: Über eine ungewöhnliche durch ausgedehnte Kontrakturen gekennzeichnete Muscelfeaktion. *Deutsch Z. Nervenheilk.*, 1958, 178, 547–552.
32. Takahashi K., Nakamura H., Nakashima R.: Scapulooperoneal dystrophy associated with neurogenic changes. *J. Neurol. Sci.*, 1974, 23, 575–593.
33. Thomas P. K., Calne O. B., Elliot C. F.: X-linked scapulooperoneal syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1972, 35, 208–219.
34. Thomas N. S. T., Williams H., Elsas L. J., Hopkins L. C., Safarazi M., Harper P. S.: Localisation of the gene for Emery–Dreifuss muscular dystrophy to the distal long arm of the X-chromosome. *J. Med. Genet.*, 1986, 23, 596–598.
35. Trömmer E.: Dystrophia myosclerotica. *Deutsch. Z. Nervenheilk.*, 1925, 85, 196–226.
36. Voit T., Krogmann O., Lenard H. G., Neuen-Jacob E., Wechsler W., Goebel H. H., Rahl G., Lindinger A., Niehaber B.: Emery–Dreifuss muscular dystrophy. *Neuropediatrics*, 1988 (in press).
37. Wadia R. S., Wadgonkar S. U., Amin R. B., Sardisa H. V.: An unusual family of benign X-linked muscular dystrophy with cardiac involvement. *J. Med. Genet.*, 1976, 13, 352–356.
38. Waters D. D., Nutter D. O., Hopkins L. D., Dorney E. R.: Cardiac features of an unusual X-linked humeroperoneal neuromuscular disease. *N. Eng. J. Med.*, 1975, 293, 1017–1022.
39. Witt Th. N., Gamer C. G., Pongratz D.: Emery–Dreifuss syndrome: a comparative electrophysiological and myopathological study in 3 cases. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 1987, 66, 212.



40. Yates J. R. W., Affara N. A., Jamieson D. M., Ferguson M. A., Hausmanowa-Petrusewicz I., Zaremba J., Borkowska J., Johnston A. W., Kelly K.: Emery–Dreifuss muscular dystrophy: localisation to Xq 27.3 qter confirmed by linkage to factor VIII gene. *J. Med. Genet.*, 1986, 23, 587–590.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, 1A Banacha Str., 02-097 Warszawa.



JOLANTA FINOWICKA, ANNA M. KAMIŃSKA

## EFFECT OF DENERVATION ON MUSCLE MATURATION IN RATS\*

Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw

The neonatal rat muscle is immature at birth and in the short period of postnatal development reaches its morphologic (Dubowitz 1963; Kamińska 1979) and physiologic (Close 1964; Boëthius 1971) maturation. As such it can serve as a most suitable model to study the role of innervation in muscle fiber maturation and differentiation. From the studies of muscle development in tissue culture by Konigsberg (1963) and Holzer (1970) it is clear that the early stages of myogenesis are independent of neural control. The development of more mature fibers, however, requires intact innervation (Zelena, Hnik 1957; Shafiq et al. 1972). Therefore, we investigated the development of normal and denervated rat gastrocnemius muscle up to 8 weeks after birth by means of histochemistry and electron microscopy to determine the influence of innervation on rat muscle maturation.

### MATERIAL AND METHODS

Normal gastrocnemius muscles of Wistar rats were examined 1, 5, 7, 14, 28 and 56 days after birth. Each group consisted of 3 rats. Denervation was performed surgically by removing about 3 mm of the right sciatic nerve at trochanteric level within 6 hours post partum under cold anesthesia. Muscle samples taken from the central region of the gastrocnemius muscle were examined 7, 14, 21, 28 and 56 days after denervation. Each group consisted of 5 rats. For histochemical investigations the specimens were bathed in isopentane, cooled in liquid nitrogen and cross sectioned into 10-micron slices in a cryostat. The sections were stained with hematoxylin and eosin, modified Gomori trichrome and a battery of histochemical methods, including: NADH-TR, SDH, ATPase with preincubation at pH 9.4 and 4.35. To permit counting and diameter measurement, random microscopic fields from the

---

\* Work supported in part by grant from Polish Academy of Sciences No. 06-02.II.5.1.



medial gastrocnemius muscle were examined and photographs were taken. Morphological patterns were analyzed and the percentage of myotubes was calculated. The size of the muscle cells was determined by measuring the lesser fiber diameter according to Dubowitz and Brooke (1973). The mean fiber diameter was calculated from histograms of 100 normal muscle fibers and from 200 denervated muscle fibers.

Along with histochemical examinations the samples from the gastrocnemius muscle of normal and denervated rats were taken for electron microscopic study. Small strips of muscle were stretched, fixed in 5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 hours, postfixed in 2% osmium tetroxide in cacodylate buffer (pH 7.4) for 2 hours and dehydrated in graded series of alcohol and acetone. The specimens were embedded in Epon, sectioned to a thickness of 1.5  $\mu\text{m}$  and stained with methylene blue for light microscopy. Thin sections from selected areas of the blocks were stained with uranyl acetate and lead citrate for examination in a JEM 100S electron microscope (Jeol).

Cross sections were used for estimation of arrangement of muscle cells, measurement of the mean diameter and percent content of particular types of muscle cells. The mean diameter of muscle fibers was calculated after measuring of the lesser fiber diameter of 100 normal muscle fibers and 200 fibers from denervated muscle. The content of different types of muscle cells was estimated, excluding presumptive myoblasts (which cannot be clearly distinguished from other undifferentiated cells), i.e. early fibroblasts. On the longitudinal sections the arrangement of myofibrils, the length of sarcomeres, the width of the Z-line, the content of mitochondria and the degree of development of sarcoplasmic reticulum were assessed. The parameters mentioned above formed the baseline for evaluation of metabolic types of muscle fibers (Padykula, Gauthier 1967).

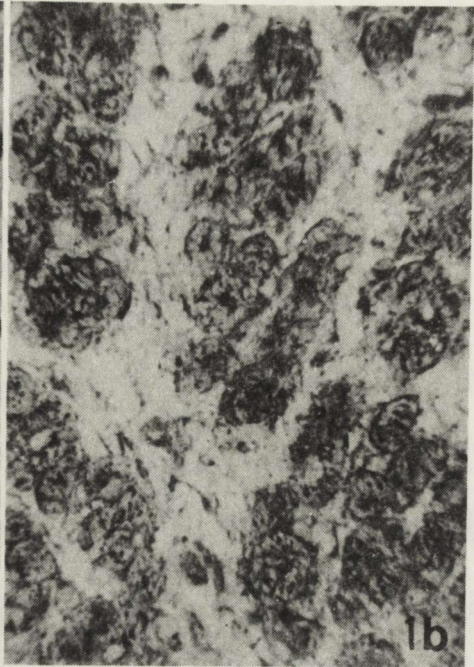
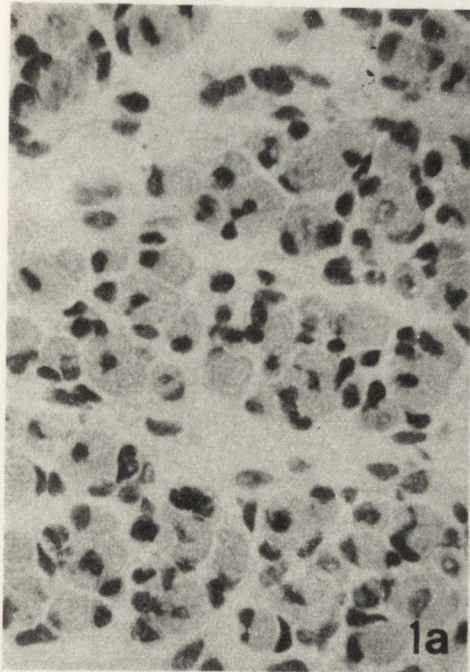
## RESULTS

### *Normal muscle*

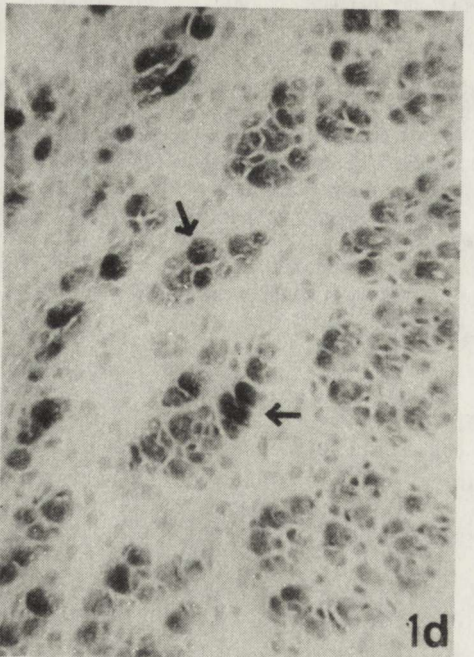
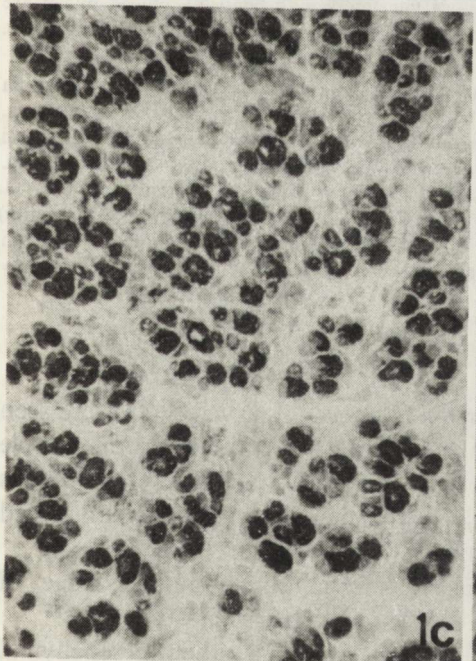
Light microscopy (LM): in the gastrocnemius muscle of newborn rats 35% of all muscle cells within 24 hours of age were in the myotube stage of development (Fig. 1a). As myotube, in light microscopy, the extrafusal muscle fibers were recognized by: 1) the centrally placed single nucleus in cross section with HE staining, 2) central rim of myofibrils seen with ATPases reactions, 3) increase or decrease of activity in the central part of the muscle cell with NADH-TR reaction.

Fiber density was low with a large amount of inter-fiber connective tissue. NADH-TR (Fig. 1b), SDH and ATPase at pH 9.4 (Fig. 1c) failed to differentiate fiber types at this age. All fibers showed high myosin ATPase activity with both alkaline and acid preincubation, as well as with oxidative enzymes. Only with ATPase reaction after acid preincubation some variation in enzyme activity was observed (Fig. 1d).

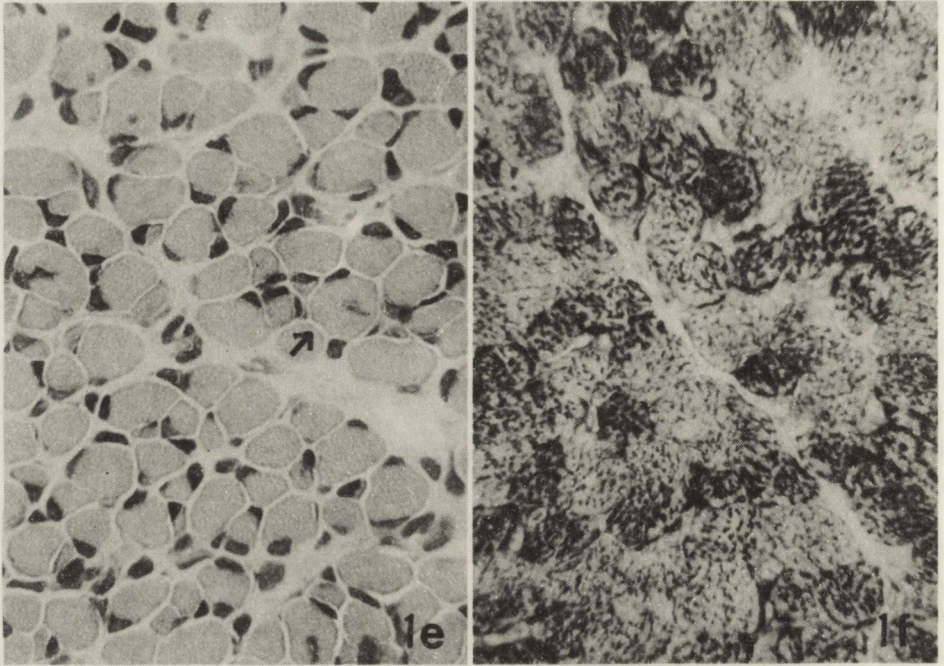




Copyright © 2013  
www.rcin.org.pl  
All rights reserved.  
No part of this publication  
may be reproduced, stored  
in a retrieval system, or  
transmitted, in any form  
or by any means, without  
the prior written permission  
of the publisher.







*Fig. 1a–1f.* Normal rat gastrocnemius muscle. *1a.* First day of life. Muscle fibers at different stages of development, loosely arranged. HE.  $\times 400$ . *1b.* First day of life. Many myotubes show accumulation or lack of staining in the center of the cell. No differentiation into muscle fiber types. NADH.  $\times 400$ . *1c.* First day of life. Note the uniform, high activity. ATP-ase, pH 9.4.  $\times 200$ . *1d.* First day of life. Majority of cells show low activity, note several cells with high activity (arrows). ATP-ase, pH 4.35.  $\times 200$ . *1e.* Fifth day of life. Very few fibers with centrally placed nuclei are observed (arrow). HE.  $\times 400$ . *1f.* Fourteenth day of life. Mixed pattern of muscle fiber types. NADH.  $\times 200$

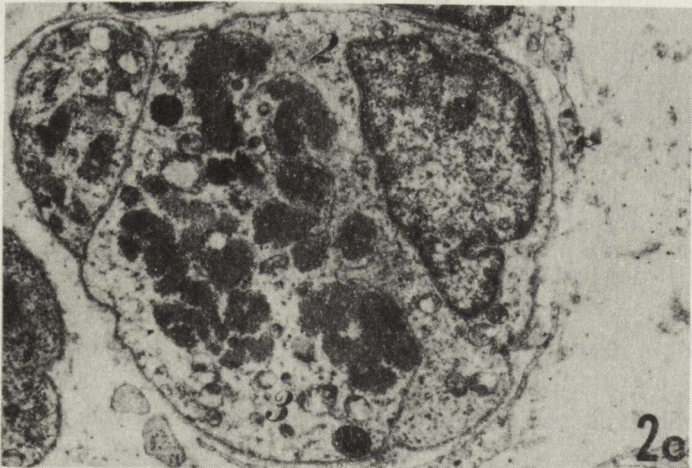
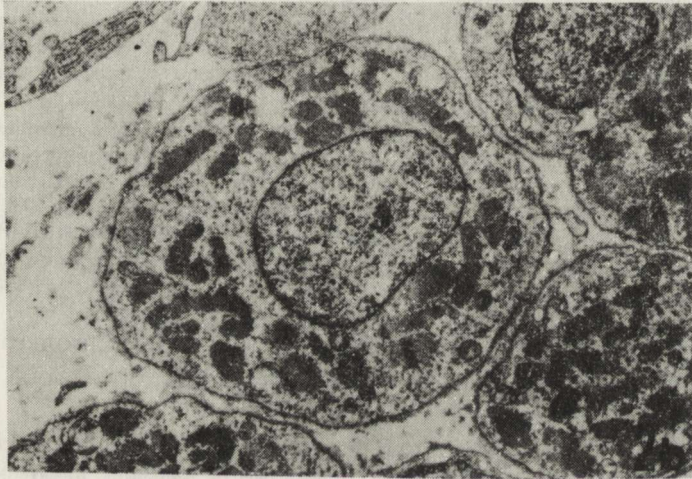
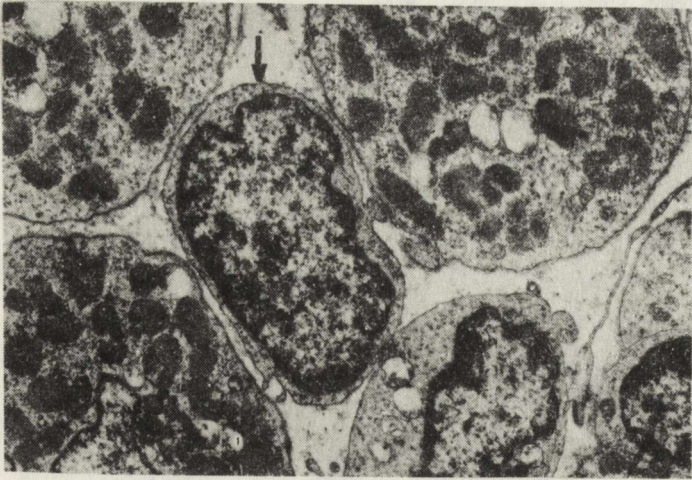
*Ryc. 1a–1f.* Prawidłowy mięsień brzuchaty łydki szczura. *1a.* Pierwszy dzień życia. Włókna mięśniowe w różnych stadiach rozwoju, luźno ułożone. HE. Pow.  $400\times$ . *1b.* Pierwszy dzień życia. Włókna w stadium miotuby wykazują nagromadzenie lub brak aktywności w środkowej części komórki. Nie ma różnicowania włókien na typy. NADH. Pow.  $400\times$ . *1c.* Pierwszy dzień życia. Widoczna jednolita, wysoka aktywność. ATP-aza, pH 9,4. Pow.  $200\times$ . *1d.* Pierwszy dzień życia. Większość włókien wykazuje niską aktywność, tylko niektóre mają wysoką aktywność (strzałki) ATP-aza, pH 4,35. Pow.  $200\times$ . *1e.* Piąty dzień życia. Nieliczne włókna z centralnie położonymi jądrami (strzałka). HE. Pow.  $400\times$ . *1f.* Czternasty dzień życia. Włókna różnych typów metabolicznych, nieregularnie przemieszane. NADH. Pow.  $200\times$

By 5 days only a few myotubes near the connective tissue septae were seen (Fig. 1e). There was no regular fiber type differentiation although some muscle fibers showed diversified activity with both ATPases. At 14 days myotubes were no longer recognized, at 21 days all histochemical methods demonstrated an adult checker-board pattern of activity (Fig. 1f).

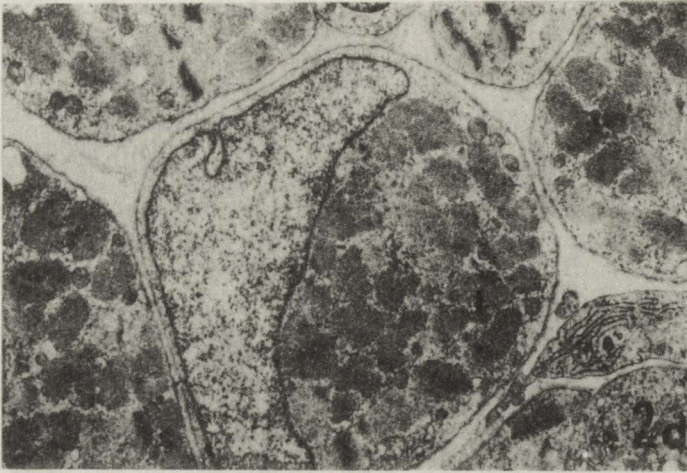
Electron microscopy (EM): in the gastrocnemius muscle multiple stages of myogenesis could be seen simultaneously at birth (Figs 2a–2d):

- 1) Presumptive myoblasts: similar in morphology to other mesenchymal









*Fig. 2a–2d.* First day of life. Normal gastrocnemius muscle. Muscle cells at different stages of development, loosely arranged. *2a.* Undifferentiated cell presumptive myoblast without myofibrils and hyperchromatic nucleus (arrow)  $\times 6000$ . *2b.* Myotube with well developed myofibrils and centrally located nucleus.  $\times 6000$ . *2c.* Immature muscle fiber (cluster of three cells under common basal lamina).  $\times 6000$ . *2d.* Mature muscle fiber with peripherally located nucleus.  $\times 6000$

*Ryc. 2a–2d.* Pierwszy dzień życia. Prawidłowy m. brzuchaty łydki. Komórki mięśniowe w różnym etapie dojrzewania, o luźnym układzie. *2a.* Komórka niezróżnicowana przypuszczalny mioblast z hyperchromatycznym jądrem, nie zawierająca miofibryli (strzałka). Pow.  $6000\times$ . *2b.* Miotuba z dobrze wykształconymi miofibrilami i ośrodkowo położonym jądrem. Pow.  $6000\times$ . *2c.* Nie-dojrzałe włókno mięśniowe (skupienie 3 komórek pod wspólną błoną podstawną). Pow.  $6000\times$ . *2d.* Dojrzałe włókno mięśniowe z obwodowo położonym jądrem. Pow.  $6000\times$

cells, mononucleated cells without myofibrils, with hyperchromatic nucleus, numerous ribosomes, scant mitochondria and well developed Golgi apparatus (Fig. 2a).

2) Myotubes – elongated multinucleated cells with centrally placed nucleus surrounded by sarcoplasm (Fig. 2b). Early myotubes had small bundles of myofilaments, numerous free ribosomes, some glycogen granules and sparse canals of sarcoplasmic reticulum. More mature myotubes had well developed myofibrils with a hexagonal array in the A band in cross section. Each myotube was enveloped by its own basal lamina, closely adjacent to the plasmalemma. Some of the more mature myotubes had single undifferentiated cells lying under their basal lamina. The amount of myotubes was 47% of all cells with myofibrils.

3) Immature muscle fibers – cluster of several cells at different stage of maturity under a common basal lamina. These clusters constituted 49% of all cells with myofibrils (Fig. 2c).

4) Mature muscle fibers – with nuclei located at the periphery and with sarcoplasm tightly filled with myofibrils (Fig. 2d). The mitochondria were numerous and elongated and the sarcoplasmic reticulum was developed. The quantity of such cells was only 4% of all cells with myofilaments.



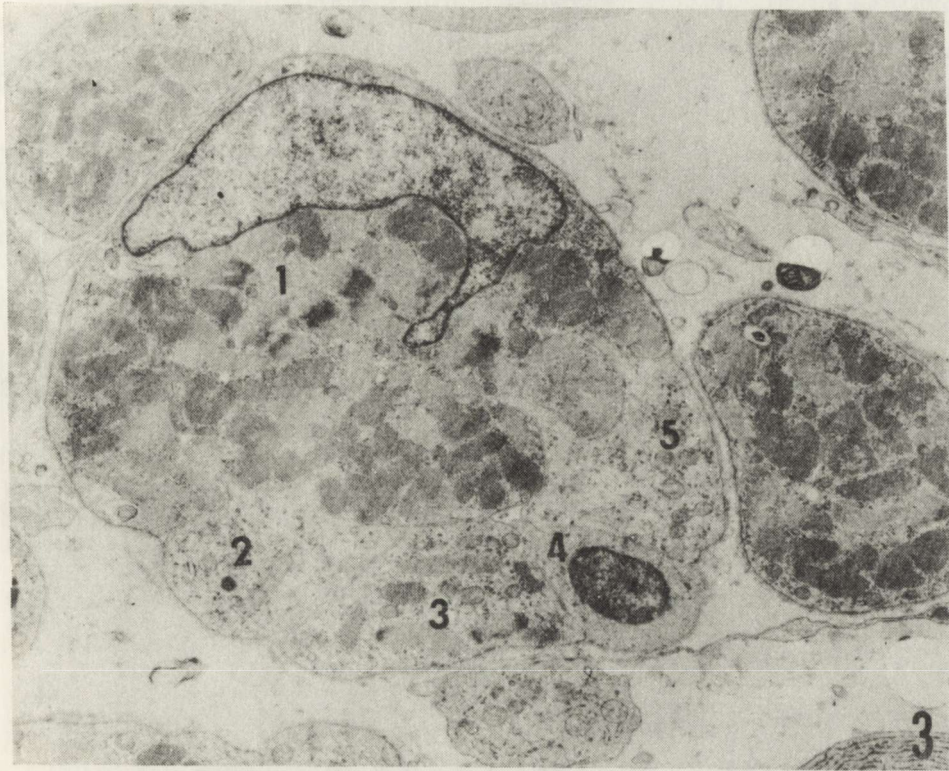


Fig. 3. Fourth day of life. Normal gastrocnemius muscle. Immature muscle fiber with five cells at different stages of development under the common basal lamina.  $\times 6000$

Ryc. 3. Czwarty dzień życia. Prawidłowy m. brzuchaty łydki. Niedojrzałe włókno mięśniowe z pięcioma komórkami w różnym etapie dojrzewania pod wspólną błoną podstawną. Pow. 6000  $\times$

By 4 days after birth the number of myotubes gradually decreased. Clusters of several cells at the same stage of maturation with undifferentiated cells wedged between them were often observed (Fig. 3). They were closely connected and enveloped by common basement membrane. Sarcoplasmic bridges extending between two cells were seen within the cluster (Fig. 4). This phenomenon usually involved two myotubes, or a myotube and a myoblast.

By 7 days the gastrocnemius muscle contained 8% myotubes, 28% immature muscle fibers and 64% of mature muscle fibers (Fig. 5). The muscle fibers were arranged in bundles. All of them were mature with well developed myofibrils and peripheral nuclei. 10% of muscle fibers calculated in cross sections had satellite cells. These fusiform mononucleated cells located between the sarcolemma and the basal lamina of muscle fibers had usually abundant cytoplasm, which was rich in organelles i.e. free ribosomes, Golgi apparatus, numerous mitochondria. Sometimes mitotic figures were seen within the satellite cells.



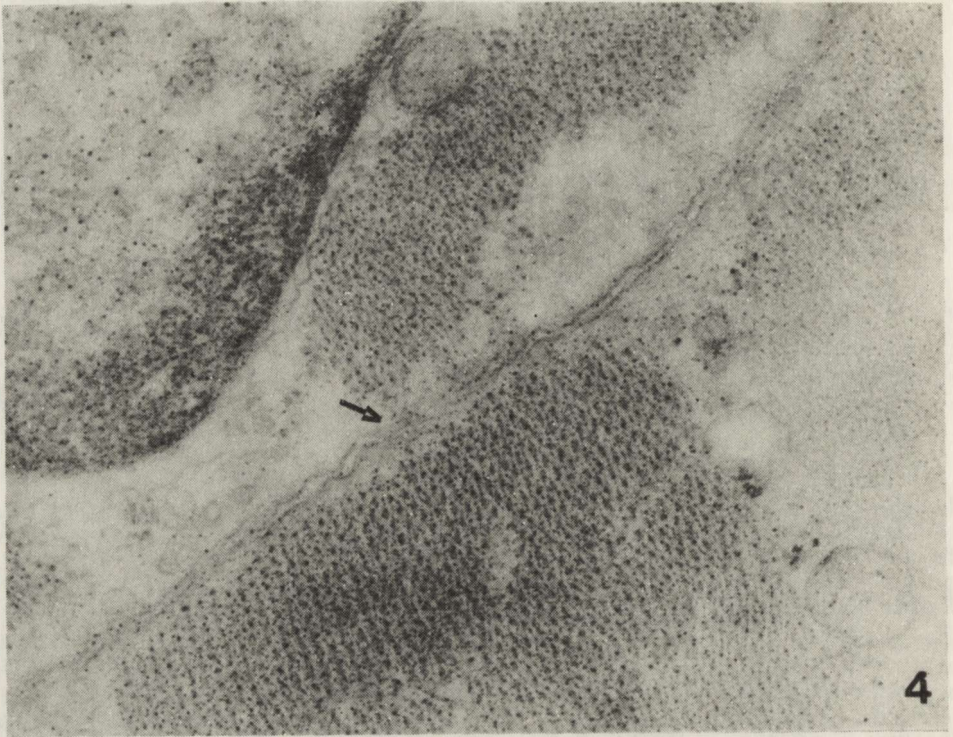


Fig. 4. Fourth day of life. Normal gastrocnemius muscle. Immature muscle fiber: sarcoplasmic bridge extending between two cells (arrow).  $\times 24000$

Ryc. 4. Czwarty dzień życia. Prawidłowy m. brzuchaty łydki. Niedojrzałe włókno mięśniowe: mostek sarkoplazmatyczny pomiędzy dwiema komórkami (strzałka). Pow.  $24000 \times$

The muscle reached the structural features of maturity on the 14th day after birth. By 21 days after birth the content of muscle fibers with satellite cells decreased to 4%. As the satellite cells were more "quiescent" than before, with scant cytoplasm, sparse organelles and hyperchromatic nuclei. The ultrastructural differences between two metabolic types of muscle fibers became distinguishable; type I fibers had wider Z-lines, more numerous mitochondria and a less developed sarcoplasmic reticulum than type II fibers. In further periods up to the 56th day after birth the only changes was increase in diameter of muscle fibers.

#### *Denervated muscle*

7th day after denervation:

LM: Denervation performed at birth produced uniform atrophy of muscle fibers. The mean diameter of muscle fibers was reduced to  $12 \pm 4 \mu$  as



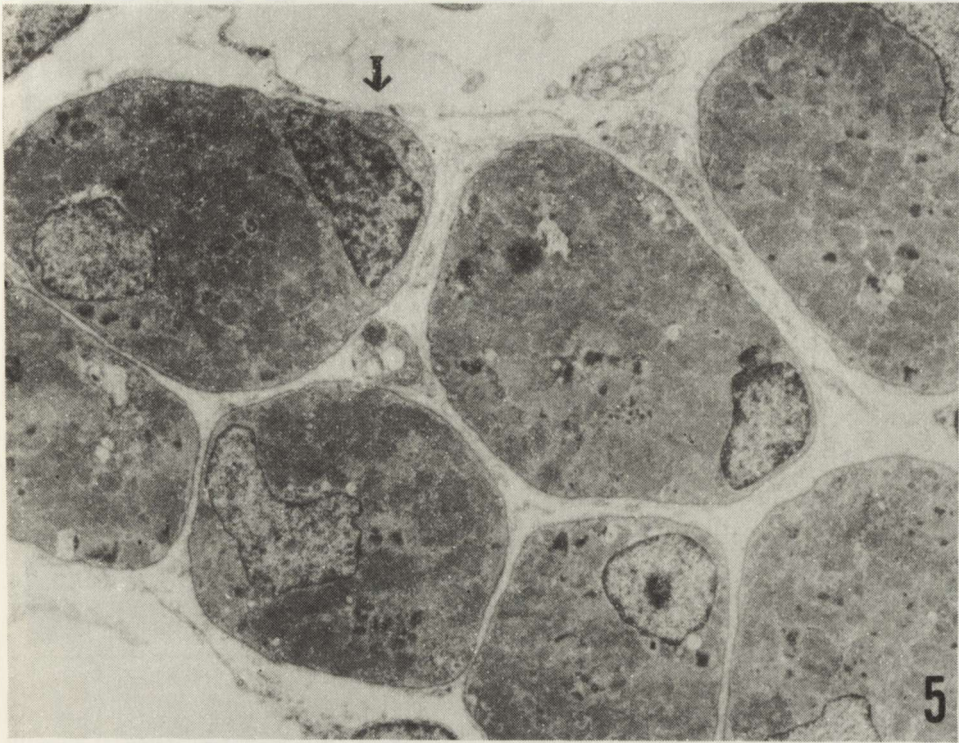


Fig. 5. Seventh day of life. Normal gastrocnemius muscle. More compact than at birth arrangement of muscle fibers. Note the presence of muscle with satellite cell (arrow).  $\times 3400$

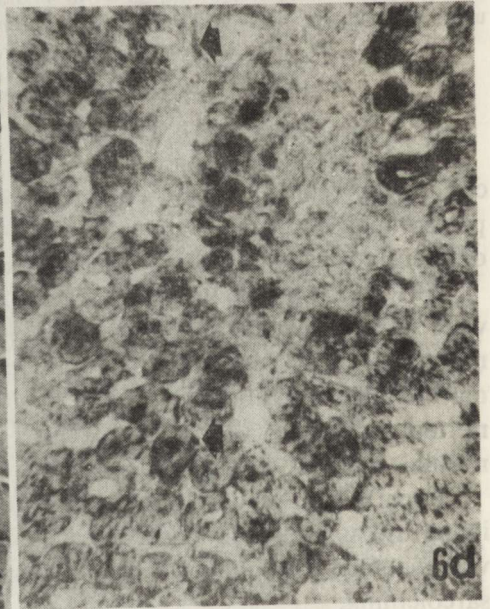
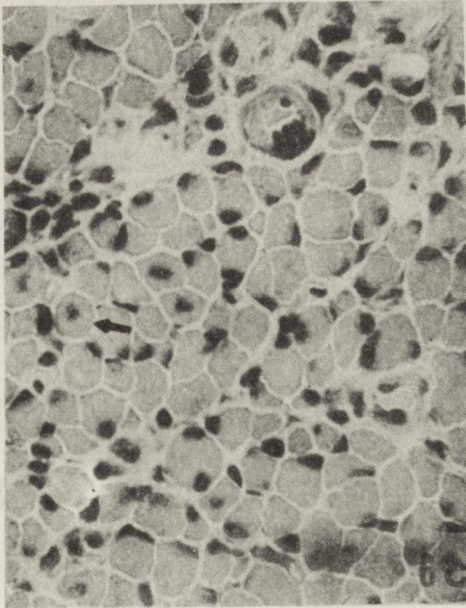
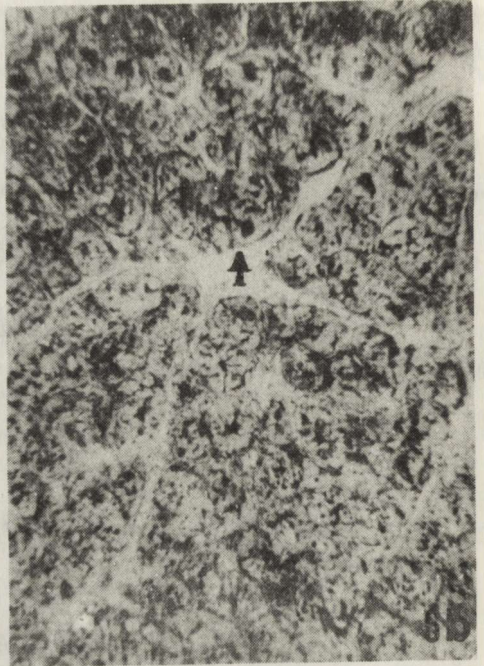
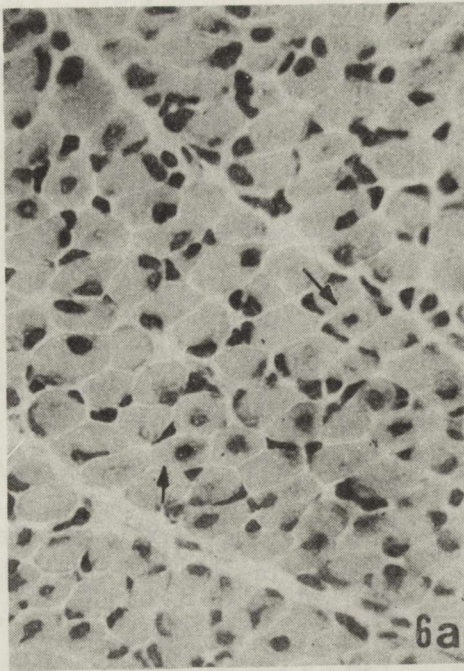
Ryc. 5. Siódmy dzień życia. Prawidłowy m. brzuchaty łydki. Bardziej ścisły, niż tuż po urodzeniu układ włókien mięśniowych. Zwraca uwagę obecność włókna mięśniowego z komórką satelitarną (strzałka). Pow.  $3400 \times$

compared with  $18 \pm 5 \mu$  in normal muscle. 28% of muscle cells had centrally placed nuclei (Fig. 6a). In contrast with normal muscle of that age no fiber type differentiation was observed in any histochemical method (Fig. 6b).

EM: In comparison with normal muscle from the same age group there were signs of delayed maturation: 18% of muscle cells still showed features of myotubes, 50% were immature muscle fibers and only 32% were completely mature. The myotubes were smaller and contained less myofibrils than those in normal muscle of that age, therefore they resembled the myotubes seen in normal rats on the 2nd and 3rd day of life.

Focal disintegration and/or depletion of myofibrils was observed in some immature as well as in mature fibers. Nevertheless the structure of muscle cells was generally well preserved and the basal lamina was in close contact with the sarcolemma.







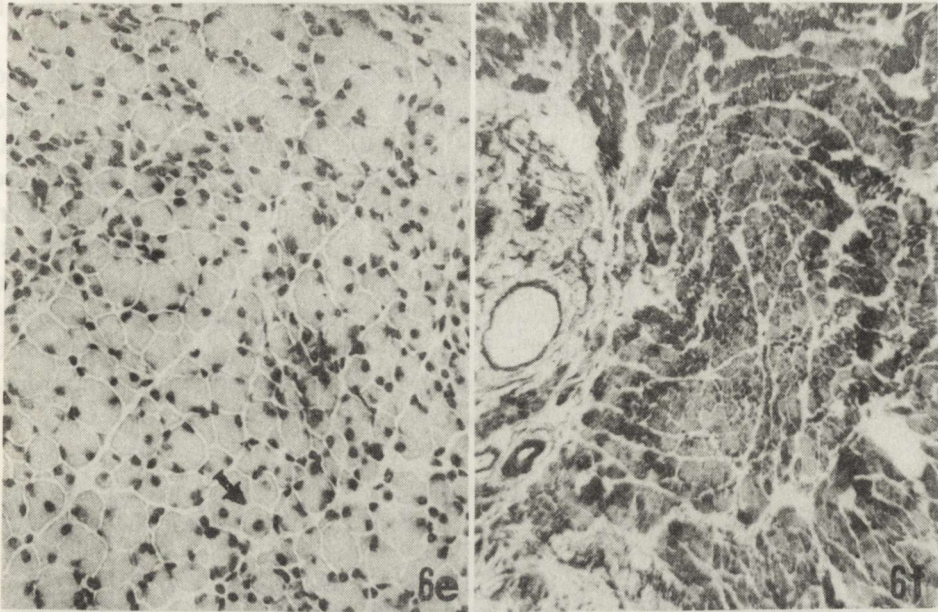


Fig. 6a–6f. Denervated rat gastrocnemius muscle. 6a. One week after denervation. Note the increased variability in size and the presence of many myotubular forms (arrow). H–E.  $\times 400$ . 6b. One week after denervation. Many cells show increased activity in the center (arrow) no differentiation into muscle fiber types is observed. NADH.  $\times 400$ . 6c. Two weeks after denervation. Note atrophy of the majority of fibers and persistence of muscle cells with central nuclei (arrow). H–E.  $\times 400$ . 6d. Two weeks after denervation. Uniform activity of all muscle fibers and persistence of myotubular forms with accumulation or lack of activity in the center (arrows). NADH.  $\times 400$ . 6e. Four weeks after denervation. Uniform atrophy of the muscle with numerous fibers with central nuclei (arrow). Note variability in size. HE.  $\times 200$ . 6f. Six weeks after denervation. Uniform marked atrophy and lack of metabolic differentiation. NADH.  $\times 100$

Ryc. 6a–6f. Odnerwiony mięsień brzuchaty łydki szczura. 6a. Tydzień po odnerwieniu. Włókna mięśniowe o różnej średnicy, niektóre z centralnie położonymi jądrami. H–E. Pow. 400  $\times$ . 6b. Tydzień po odnerwieniu. Wiele komórek wykazuje nagromadzenie aktywności w części środkowej, nie ma różnicowania na typy. NADH. Pow. 400  $\times$ . 6c. Dwa tygodnie po odnerwieniu. Zanik większości włókien, widoczne włókna z centralnie położonymi jądrami. H–E. Pow. 400  $\times$ . 6d. Dwa tygodnie po odnerwieniu. Ujednolicona aktywność wszystkich włókien. Obecność włókien w stadium miotuby z nagromadzeniem lub brakiem aktywności w środku włókna. NADH. Pow. 400  $\times$ . 6e. Cztery tygodnie po odnerwieniu. Zanik włókien mięśniowych oraz liczne włókna z centralnie położonymi jądrami. Zwraca uwagę różnorodność rozmiarów włókien. H–E. Pow. 200  $\times$ . 6f. Sześć tygodni po odnerwieniu. Znaczny zanik włókien mięśniowych; brak różnicowania na typy metaboliczne. NADH. Pow. 100  $\times$

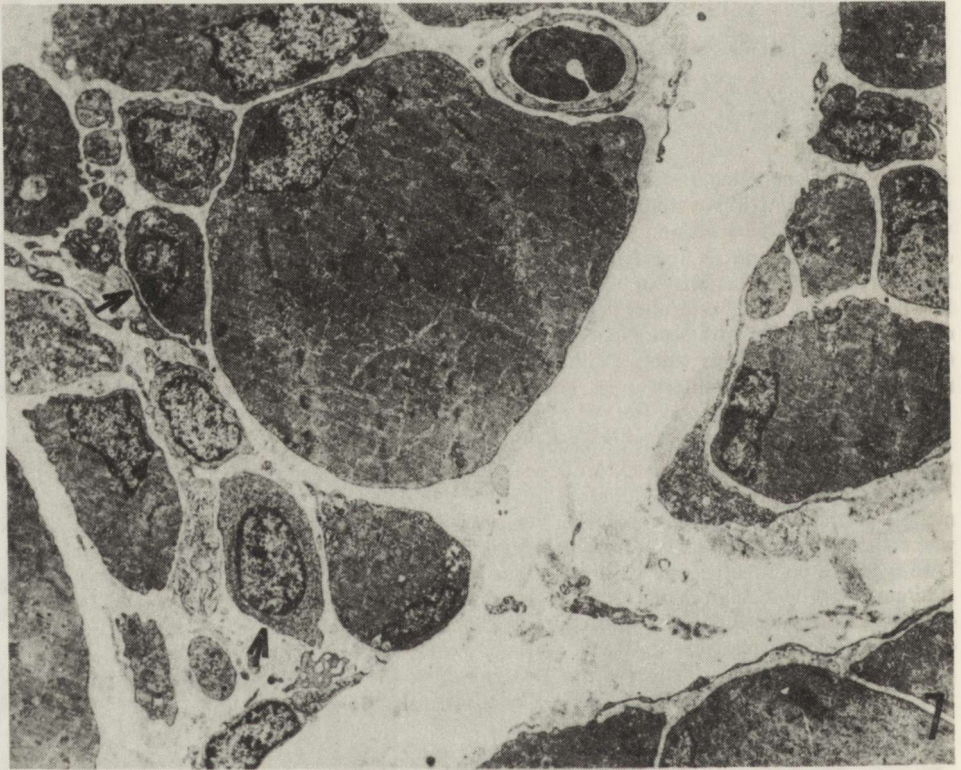
#### 14th day after denervation:

LM: As the process of denervation proceeded, the muscle diameter decreased to  $11 \pm 6 \mu$  (compared with  $23 \pm 5 \mu$  in normal muscle of the same age group), 26% muscle fibers contained centrally placed nuclei (Fig. 6c). Peri-fascicular connective tissue became slightly hyperplastic. Muscle fibers were



undifferentiated into muscle fiber types and displayed moderate activity in all histochemical methods (Fig. 6d).

EM: A loose arrangement of muscle fibers was noticed in denervated muscle. There was greater variation in the diameter of muscle cells and diminution of mean diameter value ( $9.5 \pm 6.1 \mu$ ) in comparison with normal muscle of this age ( $21.4 \pm 5.4 \mu$ ). Many fibers with centrally placed nuclei were still present. Some of them were smaller ( $5.7 \pm 2.5 \mu$ ) than the smallest fibers in normal muscles of that age, 28% of muscle fibers contained satellite cells. In normal muscle of the same age group only 10% of muscle fibers had satellite cells. Some of fibers with central nuclei and mature muscle fibers showed focal areas of disintegration of myofibrils. Immature muscle fibers containing more than one cell with myofibrils were not noticed in this experimental group.



*Fig. 7.* Four weeks after denervation. The gastrocnemius muscle. Loose arrangement of muscle fibers. Note the wide variation of fiber size with presence of very narrow fibers with central nuclei and well preserved myofibrils (arrows).  $\times 2400$

*Ryc. 7.* Cztery tygodnie po odnerwieniu. M. brzuchaty łydki. Zwracają uwagę duże różnice rozmiarów włókien mięśniowych z obecnością bardzo wąskich włókien z ośrodkowo położonymi jądrami i dobrze zachowanymi miofibrilami (strzałki). Pow. 2400  $\times$



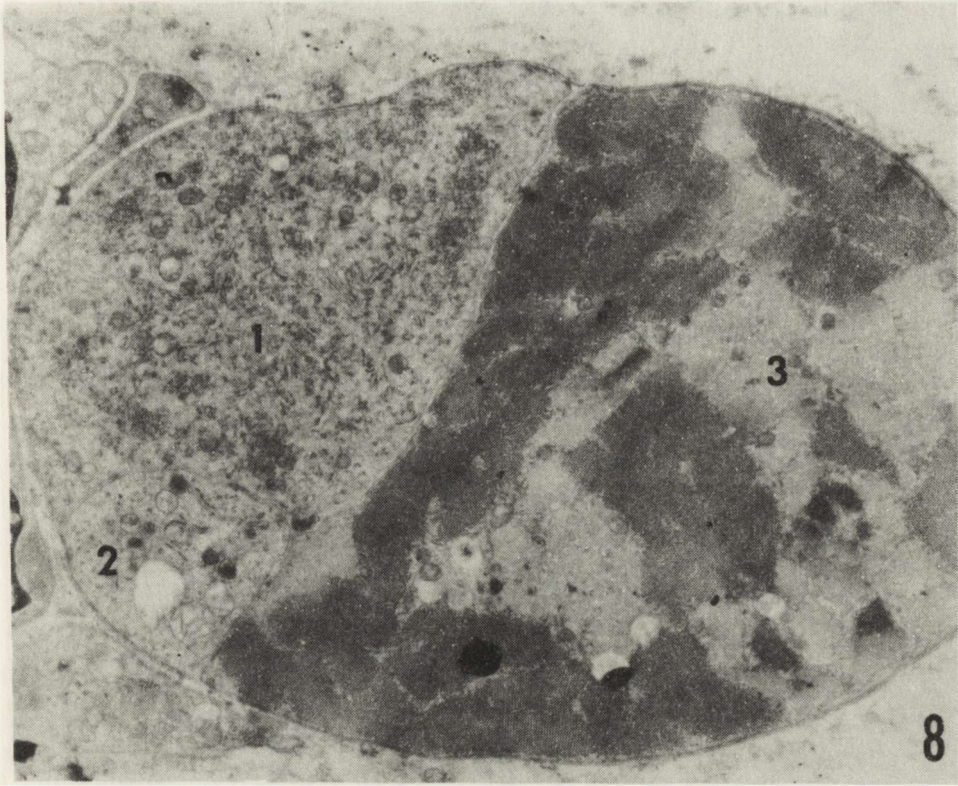


Fig. 8. Four weeks after denervation. The gastrocnemius muscle. Immature muscle fiber (three cells — 1, 2, 3 — at different stages of development, under the common basal lamina).  $\times 9000$

Ryc. 8. Cztery tygodnie po odnerwieniu. M. brzuchaty łydki. Niedojrzałe włókno mięśniowe (trzy komórki — 1, 2, 3 — w różnym etapie dojrzewania, pod wspólną błoną podstawną). Pow.  $9000 \times$

28th day after denervation:

LM: Significant atrophy of denervated muscle was observed (Fig. 6e). The mean diameter of muscle fibers was reduced to  $11 \pm 7 \mu$  as compared with  $33 \pm 6$  in normal muscle. Central nuclei were observed in 23% of muscle cells of different sizes. There was no evidence of histochemical differentiation of the muscle fibers.

EM: The loose arrangement of muscle fibers was distinct. There was a great variation in muscle fiber diameter (Fig. 7). Among the fibers of nearly normal size, we found many very narrow, round ones with well preserved myofibrils and centrally located nuclei. The plasmalemma was in close contact with the basal lamina. A few immature muscle fibers were found in this group (Fig. 8) whereas in normal rats this was observed only up to the 7th day of life. The amount of muscle fibers containing satellite cells increased up to 12% (sporadic in the normal group). Simultaneously signs of progressive secondary dege-



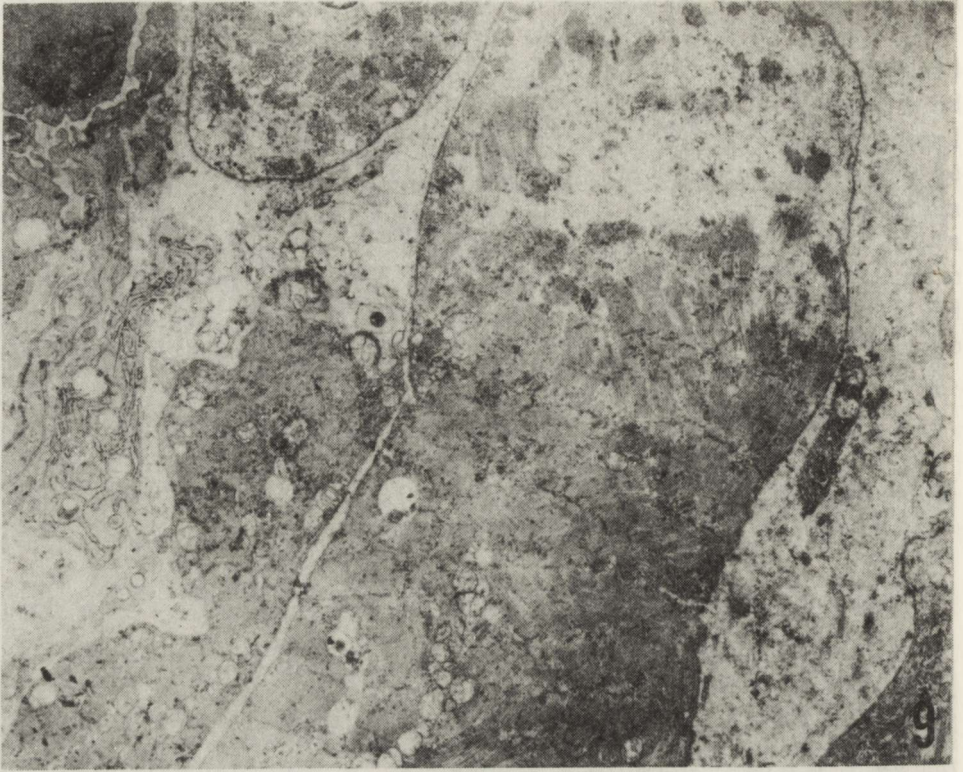


Fig. 9. Four weeks after denervation. The gastrocnemius muscle. Muscle fiber with local depletion of myofibrils.  $\times 5100$

Ryc. 9. Cztery tygodnie po odnerwieniu. M. brzuchaty łydki. Włókno mięśniowe z miejscowym ubytkiem miofibryli. Pow.  $5100 \times$

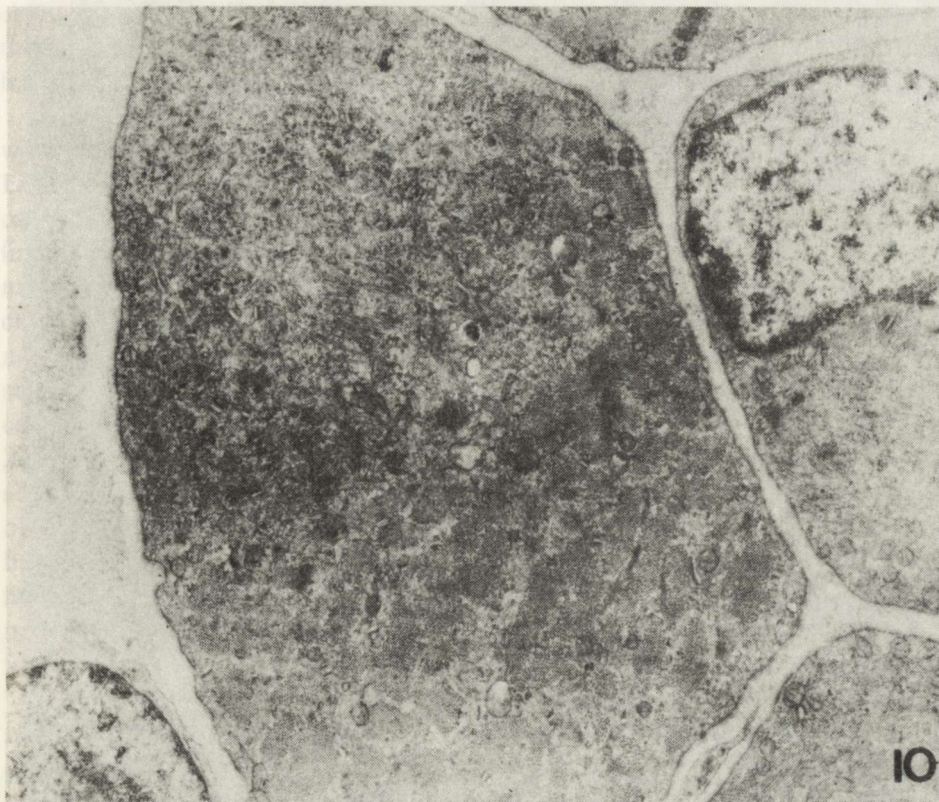
neration of muscle fibers could be observed. Those changes consisted of: 1) uniform depletion of myofibrils. 2) focal areas of complete depletion of myofibrils (Fig. 9); 3) focal areas of disintegration of myofibrils arranged in different directions (Fig. 10); 4) foci of severe destruction of myofibrils with dense osmophilic structures, resembling target-like changes.

The areas of disintegration or destruction of myofibrils were sometimes very distinctly separated from other parts of the muscle fiber with well preserved structure (Fig. 11).

56th day after denervation:

LM: It was evident from the cross-section that atrophy was diffuse and most of the muscle fibers were affected. The mean fiber diameter was decreased as compared with normal muscle ( $11 \pm 6 \mu$  and  $41 \pm 9 \mu$  respectively). Only 12% of muscle fibers were of normal size. The percentage of muscle fibers with





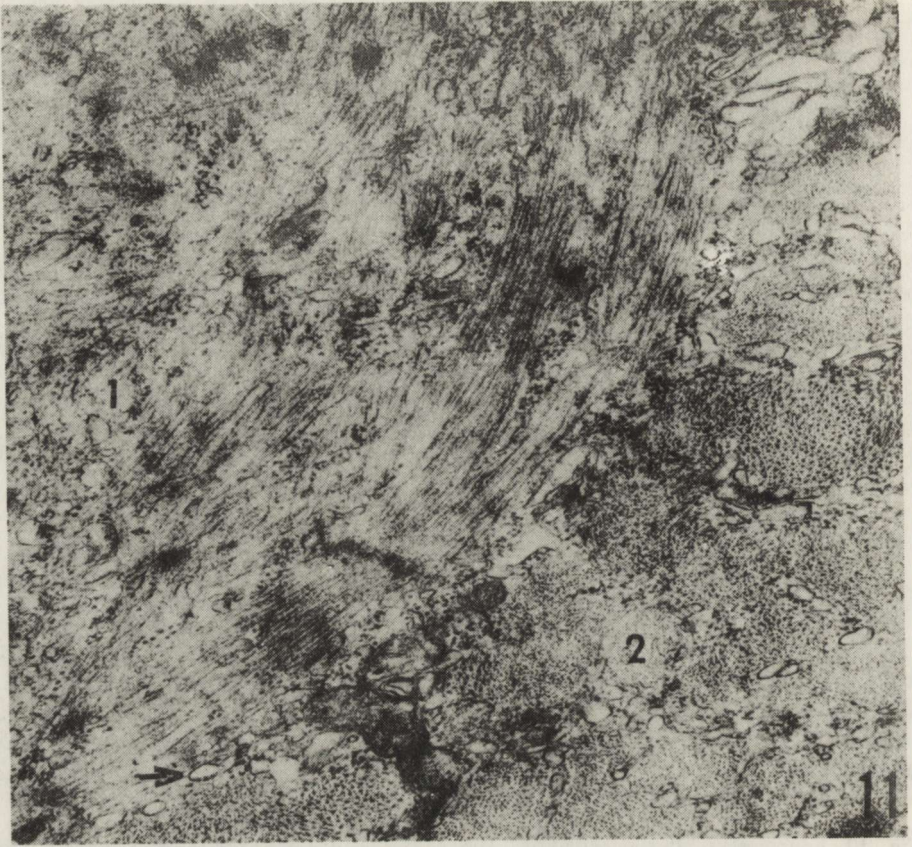
*Fig. 10.* Four weeks after denervation. The gastrocnemius muscle. Focal disintegration of myofibrils.  $\times 6500$

*Ryc. 10.* Cztery tygodnie po odnerwieniu. M. brzuchaty łydki. Ogniskowa dezintegracja miofibryli (strzałka). Pow.  $6500 \times$

centrally placed nuclei was 21%. Marked hyperplasia of connective tissue was present. All histochemical methods failed to show fiber differentiation (Fig. 6f).

EM: Uniform atrophy of denervated muscle was observed. The intercellular spaces became very extensive, usually filled by collagen. Myotube fibers usually became angular in shape; sometimes folds of basal lamina were seen. Diminution of mean diameter of muscle fibers was distinct:  $10.0 \pm 7.7 \mu$  as compared with  $38.6 - 7.5 \mu$  in normal rats at this age. Many muscle cells at different stages of maturation demonstrated severe disintegration of myofibrils or even their complete focal absence. Some mature muscle fibers contained more than one nucleus visible in cross-section. In normal muscle we have seen only single nuclei in cross section within one muscle fiber. Up to this time there were no ultrastructural features of muscle fiber differentiation into metabolic types.





*Fig. 11.* Four weeks after denervation. The gastrocnemius muscle. The area of disintegration of myofibrils (1) and the area of well preserved structure (2) coexisting in one muscle fiber. Note the presence of channels separating these two parts (arrow).  $\times 16500$

*Ryc. 11.* Cztery tygodnie po odnerwieniu. M. brzuchaty łydki. Obszar dezintegracji miofibrili (1) i obszar z dobrze zachowaną strukturą (2) w obrębie jednego włókna mięśniowego. Zwraca uwagę obecność kanalików oddzielających te dwie części włókna mięśniowego. Pow. 16500  $\times$

#### DISCUSSION

Our results confirmed previous reports that rat muscle is immature and histochemically undifferentiated at birth. The number of myotubes in light microscopy differed in the literature from few (Kelly, Schotland 1972) to many (Shafiq et al. 1972). In our material the content of myotubes was 35% when counted in the light microscope and 47% in the electron microscope. This probably reflects the limitations of light microscopy to determine whether a small cells is a muscle fiber. On the other hand the content of mature muscle fibers is higher in the light than in the electron microscope since it is difficult to recognize immature muscle fibers (clusters) on optical micrographs.

In newborn rats all muscle fibers in the gastrocnemius muscle preserve



characteristics of type 2c fibers. Differentiation into fiber types starts around the 7th day and is completed around the 21st day. Our observations appear to be consistent with earlier reports (Dubowitz 1963).

Ultrastructural investigations of skeletal muscle in fetal and newborn rats were performed by several authors (Diamond, Miledi 1962; Kelly, Zacks 1969; Landon 1970). All of them described an asynchronous development of muscle cells where multiple stages of myogenesis could be seen at the same time. Our findings support the simultaneous presence of myoblasts, myotubes, immature and mature muscle fibers at birth. By several days post partum the content of clusters (i.e. immature muscle fibers) decreases, since they transform to mature muscle fibers. Opinions about the mechanism of disappearance of clusters are controversial. Most authors postulate fusion of muscle cells surrounded by the common basal lamina to form one large muscle fiber (Ishikawa 1966; Kelly, Zacks 1969; Landon 1970). Other authors feel that the cells of the cluster separate and that each cell acquires its own basal lamina (Ontell 1977). Our observations in rats of close contact of muscle cells lying under common basement membrane and formation of sarcoplasmic bridges are strongly in favor of fusion. Since no mode of nuclear replication is known to occur in multinucleated muscle cells (Stockdale, Holzer 1961) sarcoplasmic bridges formation results from muscle cell fusion.

The time of complete ultrastructural maturation of rat skeletal muscle is not strictly determined in the literature. In 1978 Ontell and Dunn found few immature muscle fibers on the 8th day post partum. Our findings support this opinion. In our material these fibers disappear on the 10–14th day of life. In this period we found under the common basal lamina of muscle fibers only satellite cells. This is in accordance with Ontell (1977) and Schultz (1978). In our material the ultrastructural features of metabolic differentiation were completed on the 21st day post partum. Hanzlikova and Schiaffino (1973) found these features after 2 weeks, Shafiq et al. (1972) after 2–3 weeks.

Neonatal denervation of immature muscle causes severe impairment of maturation with many myotubular forms and complete lack of metabolic differentiation. This is in agreement with Dubowitz (1963), Brooke et al. (1971) and Shafiq et al. (1972). Only Engel and Karpati (1968) observed that, following neonatal neurectomy, type I fibers developed normally and achieved normal size, whereas type II fibers remained arrested at the myotube stage.

Only a few authors have investigated the ultrastructural muscle changes occurring after neonatal denervation. Hanzlikova and Schiaffino (1973) described the presence of many narrow fibers, but they called them "atrophic". We considered such fibers as "myotube-like" fibers, because they resemble myotubes from the early period of normal myogenesis. They are rather arrested in development than atrophied because they have a rounded shape, well preserved structure, no folds of basal lamina and no multiplication of myonuclei in cross section, which is characteristic for denervated muscle cell. Nevertheless in later periods after neonatal denervation, secondary atrophy of



these "myotube-like" fibers occurs. They become angular, with scant sarcoplasm and with folds of basal lamina. Another sign of delayed maturation of denervated muscle is the persistence of immature muscle fibers and increased number of satellite cells what is in accordance with Ontell (1974) and Schultz (1978).

From both light and electron microscopic evaluations it is apparent that some (12% and 14%, respectively) fibers reach normal size, despite of longstanding denervation. This finding suggests, that the denervated muscle of rapidly growing animals can respond to growth factors other than neural. Among these mechanical (stretching by growing bones) as well as hormonal (circulating growth hormone) should be taken into consideration. The present study indicates that abnormal nerve-muscle interactions during myogenesis arrest normal muscle maturation. Neonatal rat muscles provide an ideal experimental model for studying the effects of denervation before myofiber differentiation.

#### WPLYW ODNERWIENIA NA DOJRZEWANIE MIĘŚNI U SZCZURA

##### Streszczenie

Oceniano wpływ odnerwienia na rozwój mięśnia szkieletowego u szczura. Materiał stanowiło 25 szczurów rasy Wistar, u których w 6 godzin po urodzeniu dokonano przecięcia n. kulszowego oraz 18 szczurów zdrowych. Na podstawie wyników badań w mikroskopie świetlnym z użyciem metod histochemicznych oraz badań w mikroskopie elektronowym wykazano, że m. brzuchaty łydki u szczura uzyskuje dojrzałość morfologiczną w 2 tygodnie po urodzeniu. Odnerwienie dokonane bezpośrednio po urodzeniu hamuje rozwój mięśnia szkieletowego u szczura, powodując przetrwanie wielu niedojrzałych włókien mięśniowych do 8 tygodnia życia oraz zupełny brak różnicowania na typy metaboliczne.

#### ВЛИЯНИЕ ДЕНЕРВАЦИИ НА СОЗРЕВАНИЕ МЫШЦ КРЫСЫ

##### Резюме

Оценивалось влияние денервации на развитие скелетной мышцы крысы. Материал получен от 25 крыс линии Вистар, у которых через 6 часов после рождения производилась перерезка седалищного нерва, и от 18 здоровых крыс. На основании результатов исследований, проведенных с применением световой микроскопии, гистохимических методов и электронной микроскопии, показано, что икроножная мышца крысы становится морфологически зрелой через 2 недели после рождения. Денервация, произведенная сразу после рождения, приостанавливает развитие скелетной мышцы крысы, вызывая сохранение многих незрелых мышечных волокон до 8-й недели жизни, при полном отсутствии дифференциации на метаболические типы.



## REFERENCES

1. Boethius J.: Electrophysiological and morphological development of leg and neck muscles in the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 1971, 81, 492–507.
2. Brooke M. H., Williamson E., Kaiser K. K.: The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch. Neurol.*, 1971, 25, 360–366.
3. Close R.: Dynamic properties of fast and slow skeletal muscles of the rat during development. *J. Physiol. (London)*, 1964, 173, 74–95.
4. Diamond J., Miledi R.: A study of foetal and new born rat muscle fibers. *J. Physiol.*, 1962, 162, 393–408.
5. Dubowitz V.: Enzymatic maturation of skeletal muscle. *Nature*, 1963, 4873–1215.
6. Dubowitz V., Brooke M. H.: *Muscle biopsy: A modern approach*. W. B. Saunders Comp. LTD. London, Philadelphia, Toronto, 1973, p. 99.
7. Engel W. K., Karpati G.: Impairment of skeletal muscle maturation following neonatal neurectomy. *Develop. Biol.*, 1968, 17, 713–723.
8. Hanzlikova V., Schiaffino S.: Studies on the effect of denervation in developing muscle. III. Diversification of myofibrillar structure and origin of the heterogeneity of muscle types. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, 1973, 147, 75–85.
9. Holzer H.: Myogenesis. In: *Cell differentiation*. Eds. O. Schjede, J. De Vellis. Van Nostrand Reinhold, N. Y., 1970, pp. 476–503.
10. Ishikawa H.: Electron microscopic observation of satellite cells with special reference to the development of mammalian skeletal muscles. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, 1966, 125, 43–63.
11. Kamińska A.: *Effect of denervation on muscle development in the rat*. Doctoral Thesis (in Polish), 1979, Warsaw Medical Academy.
12. Kelly A. M., Schotland D. L.: The evolution of the “checkerboard” pattern in a rat muscle. In: *Research in muscle development and the muscle spindle*. Eds. R. Banker, R. T. Przybylski, J. P. Van der Meulen, M. Victor. Excerpta Medica, Amsterdam, 1972, pp. 32–48.
13. Kelly A. M., Zacks S. J.: The histogenesis of rat intercostal muscle. *J. Cell. Biol.*, 1969, 42, 135–153.
14. Konigsberg I.: Clonal analysis of myogenesis. *Science*, 1963, 140, 1273–1284.
15. Landon D. N.: Observations of the morphogenesis of rat skeletal muscle. *J. Anat.*, 1970, 107, 385–386.
16. Ontell M.: Muscle satellite cells: A validated technique for light microscopic identification and a quantitative study of changes in their population following denervation. *Anat. Rec.*, 1974, 178, 211–228.
17. Ontell M.: Neonatal muscle: an electron microscopic study. *Anat. Rec.*, 1977, 189, 669–690.
18. Ontell M., Dunn R. F.: Neonatal muscle growth: a quantitative study. *Am. J. Anat.*, 1978, 152, 539–556.
19. Padykula H. A., Gauthier G. F.: Ultrastructural features of three types of muscle fibers in the rat diaphragm. *Anat. Rec.*, 1967, 157, 296–297.
20. Shafiq S. A., Asiedu S. A., Milhorat A. T.: Effect of neonatal neurectomy on differentiation of fiber types in rat skeletal muscle. *Exp. Neurol.*, 1972, 35, 529–540.
21. Schultz E.: Changes in satellite cells of growing muscle following denervation. *Anat. Rec.*, 1978, 190, 299–312.
22. Stockdale F. E., Holzer N.: DNA synthesis and myogenesis. *Exp. Cell Res.*, 1961, 24, 508–520.
23. Zelena J., Hnik P.: Muscle atrophy in young rats. *Physiol. Biochem.*, 1957, 6, 193–199.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, 1A Banacha Str., 02-097 Warszawa.



ANNA ZARĘBA-KOWALSKA, BARBARA GAJKOWSKA

## WPLYW CAŁKOWITEGO NIEDOKRWIENIA MÓZGU NA ULTRASTRUKTURĘ JĄDRA OLBRZYMIOKOMÓRKOWEGO PNIA MÓZGU SZCZURA

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

Morfologia jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego (*nucleus reticularis gigantocellularis*), umiejscowionego w pniu mózgu, jest stosunkowo mało poznana, a piśmiennictwo z tego zakresu jest skąpe (Scheibel, Scheibel 1958; Bowsher, Westman 1970; Zaręba-Kowalska, Borowicz 1987). Jądro to ma podstawowe znaczenie czynnościowe jako ważny ośrodek kojarzeniowy. Z badań fizjologicznych wynika, że neurony tego jądra odbierają, kojarzą i przekazują impulsy z wielu ośrodków mózgu i rdzenia kręgowego (Bowsher i wsp. 1968; Guilbaud i wsp. 1973; Siegel 1979). Wiadomo również, że jądro olbrzymiokomórkowe stanowi ośrodek przekaźnictwa bodźców bólowych (Burton 1968; Casey 1969; 1971; Basbaum i wsp. 1976; 1978).

Pomimo bogatego piśmiennictwa na temat ischemicznych i poischemicznych zmian ultrastrukturalnych w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego (OUN), brak jest szczegółowych danych dotyczących zmian w jądrze olbrzymiokomórkowym. Wiadomo jednakże, że jądro to należy do struktur wybiórczo wrażliwych na niedokrwienie (Mossakowski i wsp. 1986).

Przedmiotem obecnej pracy, która stanowi kontynuację uprzednio prowadzonych badań, jest charakterystyka zmian ultrastrukturalnych w jądrze olbrzymiokomórkowym szczurów, które przeżyły incydent śmierci klinicznej, spowodowanej zatrzymaniem akcji serca i czynności oddechowej. W odróżnieniu od poprzednich doświadczeń (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1987) wydłużono czas trwania ischemii, a obserwacje prowadzono w odmiennych odstępach czasu po doświadczeniu.



## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 12 dojrzałych szczurach szczepu Wistar, samicach o masie ciała 160–180 g, pochodzących z normalnych warunków hodowlanych. U 8 szczurów spowodowano śmierć kliniczną według metody Korpaczewa i wsp. (1982). Zwierzętom w lekkiej narkozie eterowej wprowadzono do klatki piersiowej igłowy zacisk i uciskano pęczek naczyniowy serca przez okres 3 min. Prowadziło to w czasie 1,5–2 min do zatrzymania akcji serca i czynności oddechowej, utrzymującego się mimo usunięcia zacisku do momentu rozpoczęcia czynności reanimacyjnych, które podejmowano po upływie 5 min. Stosowano zewnętrzny masaż serca aż do przywrócenia jego spontanicznej czynności oraz kontrolowaną wentylację płuc powietrzem o normalnym składzie gazowym przy użyciu respiratora. Przerywano ją po uzyskaniu pełnosprawnej własnej czynności oddechowej. Według Mossakowskiego i wsp. (1986) już po kilkunastu sekundach od chwili ustania akcji serca i czynności oddechowej dochodzi w tych warunkach do śmierci klinicznej, co przejawia się zanikiem czynności bioelektrycznej mózgu. Zastosowanie czynności reanimacyjnych przywracało czynność serca w okresie 1–3 min. Spontaniczna czynność oddechowa wracała średnio po około 6 min.

Zwierzęta doświadczalne uśmiercano w dwóch grupach, wykonując przezsercową perfuzję zbuforowanym roztworem paraformaldehydu i aldehydu glutarowego według Karnovskiego. Pięć zwierząt zdekapitowano po 3 godzinach (I grupa doświadczalna) po reanimacji, 4 po upływie 7 dni (II grupa doświadczalna) po zabiegu. Kontrolę stanowiły 3 szczury, nie poddane żadnym zabiegom. Do badań mikroskopowo-elektronowych pobierano wycinki z pnia mózgu zawierające jądro olbrzymiokomórkowe. Utrwalano je przez imersję według Karnovskiego, dotrwalano 1% OsO<sub>4</sub>, odwadniano w alkoholu etylowym i tlenku propylenu oraz zatapiano w Eponie 812. Ultracienkie skrawki kontrastowano nasyconym wodnym roztworem octanu uranylu i cytrynianu ołowiu. Preparaty oglądano i fotografowano w mikroskopie JEM 1200 EX.

## WYNIKI

*Grupa kontrolna.* Prawidłowa organizacja ultrastrukturalna jądra olbrzymiokomórkowego pnia mózgu, została poprzednio opisana u królika (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1985). Ze względu na istotne podobieństwa pomiędzy jądrem olbrzymiokomórkowym u królika i u szczura, dokumentacja dotycząca prawidłowej budowy tego jądra u szczura została pominięta. Podobnie jak u królika, w jądrze olbrzymiokomórkowym szczura występowały dwa typy neuronów, różniące się znacznie zarówno wielkością, jak i kształtem. Neurony pierwszego typu – olbrzymie – odznaczały się znacznymi rozmiarami perykarionów oraz bogato rozwiniętymi i wtórnie rozgałęziającymi się dendrytami. Posiadały one zwykle duże, centralnie położone jądra z równomiernie rozproszoną chromatyną. Niektóre z nich wykazywały niewielkie wgłobienia



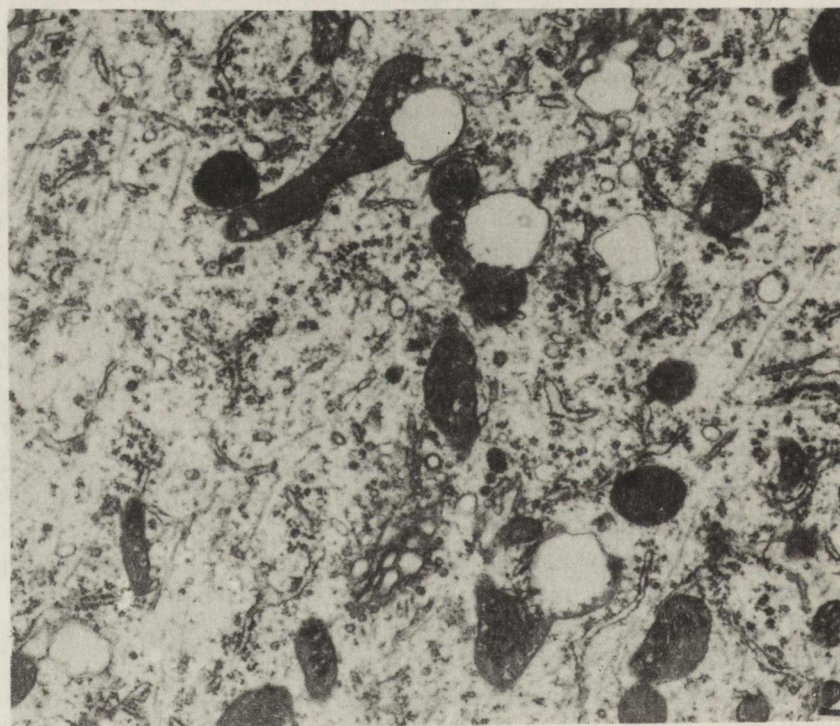
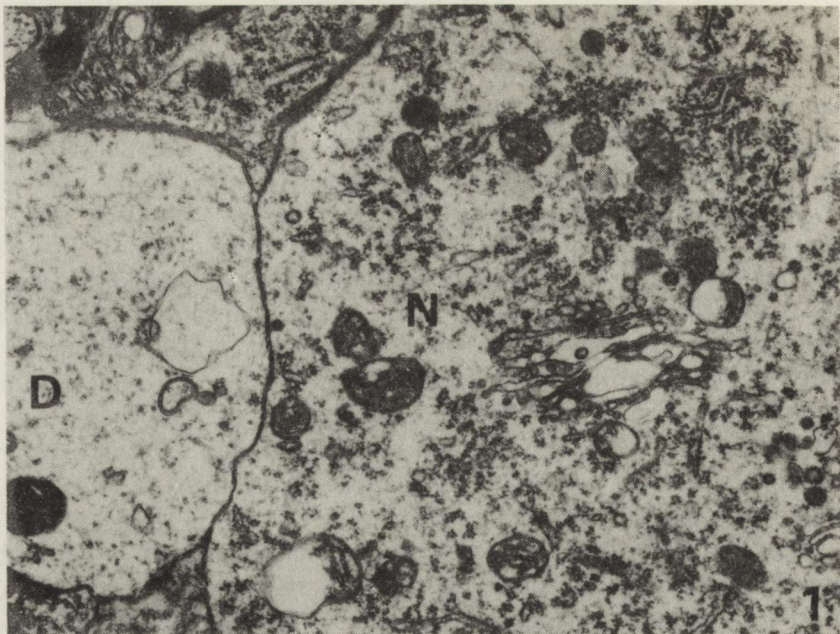
otoczki jądrowej. Charakterystyczną cechą neuronów olbrzymich była obfita siateczka śródplazmatyczna ziarnista, tworząca często równoległe ułożone kanały. Kompleks Golgiego był średnio rozwinięty. Powierzchnia ciała neuronów, jak również proksymalne części dendrytów były gęsto pokryte zakończeniami presynaptycznymi.

Neurony drugiego typu, o okrągłym lub owalnym kształcie, odznaczały się małymi rozmiarami oraz nielicznymi dendrytami. Centralnie położone jądra tych komórek były bogate w chromatynę i wykazywały zagęszczenia heterochromatyny pod otoczką jądrową. Kompleks Golgiego i siateczka śródplazmatyczna ziarnista były mniej rozwinięte. Na tych neuronach obserwowano tylko nieliczne zakończenia presynaptyczne. Znaczna część powierzchni małych neuronów kontaktowała się ze zmielinizowanymi aksonami, naczyniami lub komórkami glejowymi.

*I grupa doświadczalna* (3 godz. po reanimacji). Znaczna część obserwowanych neuronów olbrzymich nie wykazywała zmian w budowie ultrastrukturalnej jądra i cytoplazmy w porównaniu z kontrolą. Tylko nieliczne neurony olbrzymie, charakteryzujące się obfitością organelli komórkowych, zawierały obrzmiałe mitochondria oraz drobne, elektronowo-przeziernie wakuole. W cytoplazmie tych komórek licznie występowały lizosomy oraz elementy cytoskeletonu: neurotubule i neurofilamenty (ryc. 1, 2, 3). Drobne wakuole były obecne również w otaczającym neuropilu, w cytoplazmie astrocytów oraz w dendrytach (ryc. 1). Kolbki presynaptyczne połączeń akso-somatycznych na neuronach olbrzymich, jak również na ich dendrytach nie wykazywały nieprawidłowości poza obrzmieniem pojedynczych mitochondriów (ryc. 3). Nie obserwowano zmian obrzękowych w obszarach okołonaczyniowych. Neurony małe nie różniły się od kontroli (ryc. 4).

*II grupa doświadczalna* (7 dni po reanimacji). Podobnie jak w poprzedniej grupie, część neuronów olbrzymich nie wykazywała zmian ultrastrukturalnych. Jednakże część populacji tych neuronów różniła się w porównaniu z grupą kontrolną. Ich jądra wykazywały często głębokie wgłobienia. W jądrach sporadycznie występowały pałeczkowate wtręty w postaci wiązki filamentów. W cytoplazmie neuronów olbrzymich obserwowano elektronowo-przeziernie wakuole. Neurony te wykazywały niekiedy miejscowe przejaśnienia hialoplazmy (ryc. 5, 6, 7). W niektórych neuronach występowało znaczne poszerzenie poszczególnych cystern układu Golgiego (ryc. 7), lub wzrost liczności lizosomów. Synapsy akso-somatyczne na neuronach olbrzymich, jak również zakończenia presynaptyczne na ich dendrytach nie wykazywały nieprawidłowości. W kolbkach presynaptycznych tych połączeń były obecne liczne, drobne mitochondria (ryc. 8). W jednym polu widzenia cytoplazma neuronu olbrzymiego zawierała wtopiony profil wypustki, przypuszczalnie astrocytu z licznymi filamentami. W obszarach okołonaczyniowych obserwowano obrzmienie wypustek astrocytarnych (ryc. 9). Elektronowo-przezierna cytoplazma tych wypustek była uboga w struktury wewnątrzkomórkowe. Małe neurony nie wykazywały zmian w porównaniu z kontrolą.





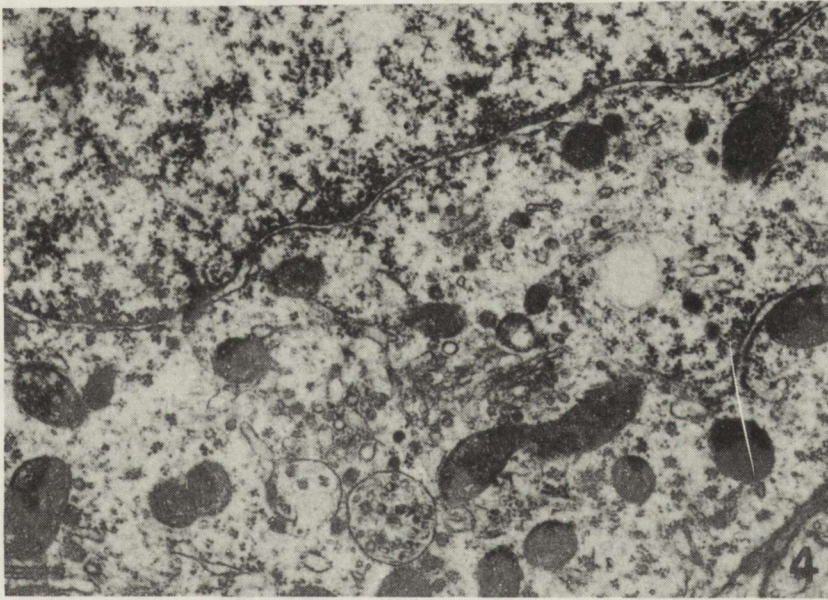
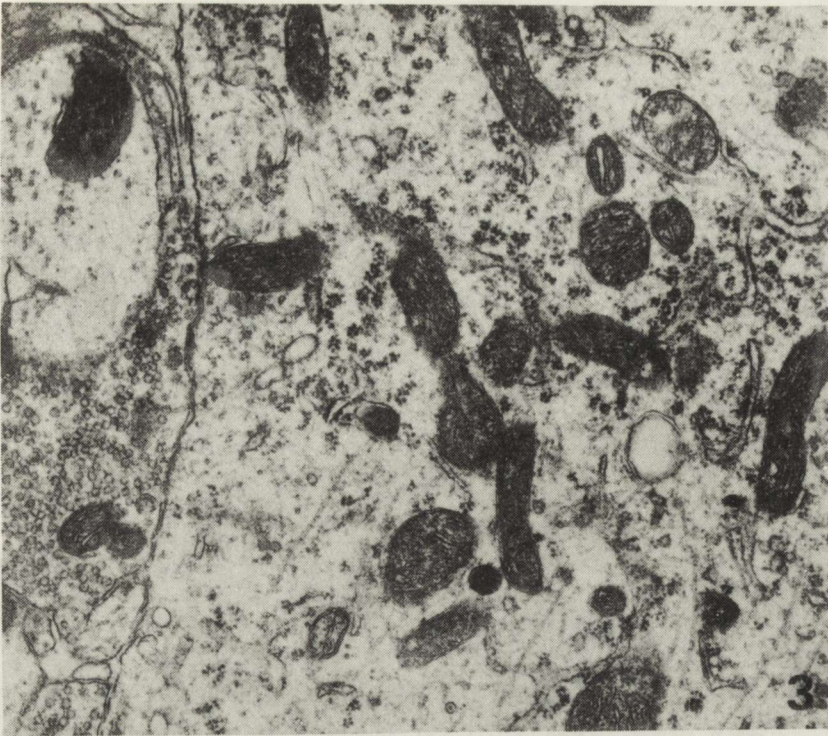
Ryc. 1. Szczur 3 godz. po ischemii. Fragment neuronu olbrzymiego (N) z przylegającą wypustką dendrytyczną (D). W cytoplazmie występują pojedyncze obrzmiałe mitochondria, w dendrycie widoczna wakuola. Pow. 18750 ×

Fig. 1. Rat 3 hours after ischemia. Fragment of large neuron (N) contacting with dendritic process (D). Swollen mitochondria are visible in neuronal cytoplasm, vacuole in dendritic process. × 18750

Ryc. 2. Szczur 3 godz. po ischemii. Fragment olbrzymiego neuronu. W cytoplazmie widoczne banieczkowato obrzmiałe mitochondria. Pow. 18000 ×

Fig. 2. Rat 3 hours after ischemia. Fragment of large neuron. In cytoplasm swollen mitochondria are visible. × 18000





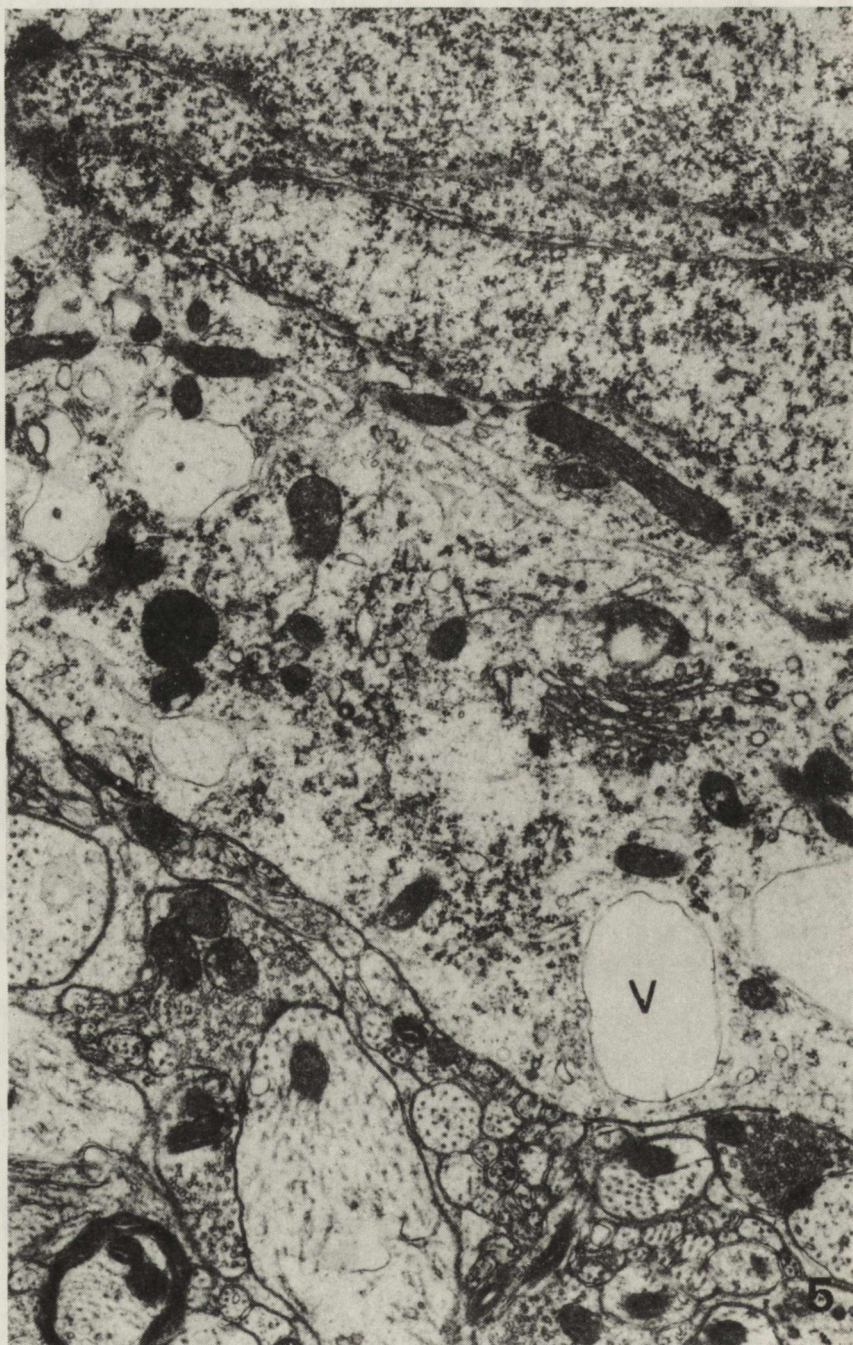
Ryc. 3. Szczur 3 godz. po ischemii. Fragment neuronu olbrzymiego o prawidłowej budowie z przylegającymi prawidłowymi zakończeniami synaptycznymi. Pow. 18750 ×

Fig. 3. Rat 3 hours after ischemia. Fragment of large neuron with presynaptic endings on its surface, exhibiting normal structure. × 18750

Ryc. 4. Szczur 3 godz. po ischemii. Mały neuron o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Pow. 22500 ×

Fig. 4. Rat 3 hours after ischemia. Small neuron of normal structure. × 22500

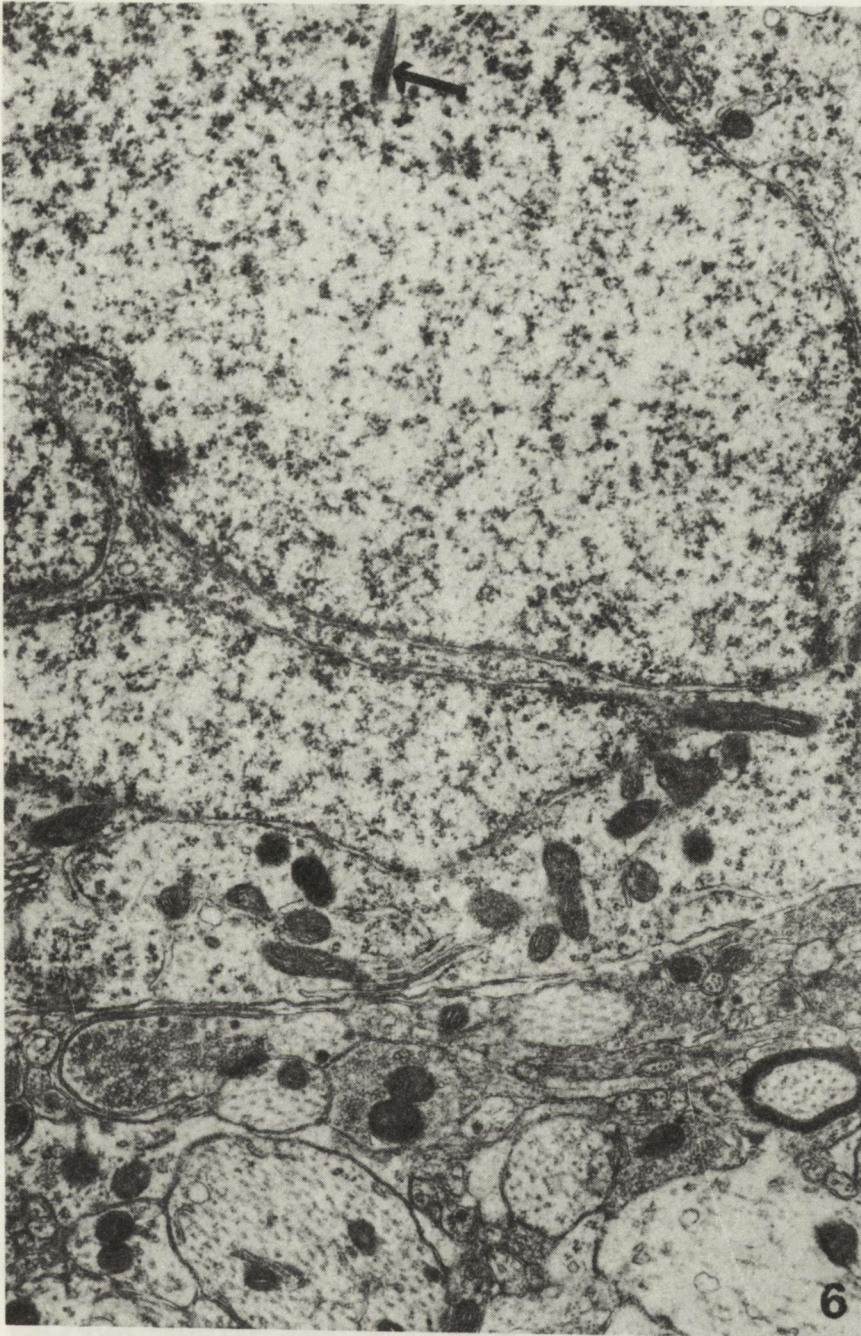




Ryc. 5. Szczur z 7 dniowym przeżyciem po resuscytacji. Fragment neuronu olbrzymiego. W cytoplazmie widoczne liczne wakuole (V), lizosomy i pojedyncze obrzmiałe mitochondria. Pow. 18750 ×

Fig. 5. Rat 7 days after resuscitation. Fragment of large neuron. Numerous vacuoles (V), lysosomes and some swollen mitochondria are present in cytoplasm. × 18750

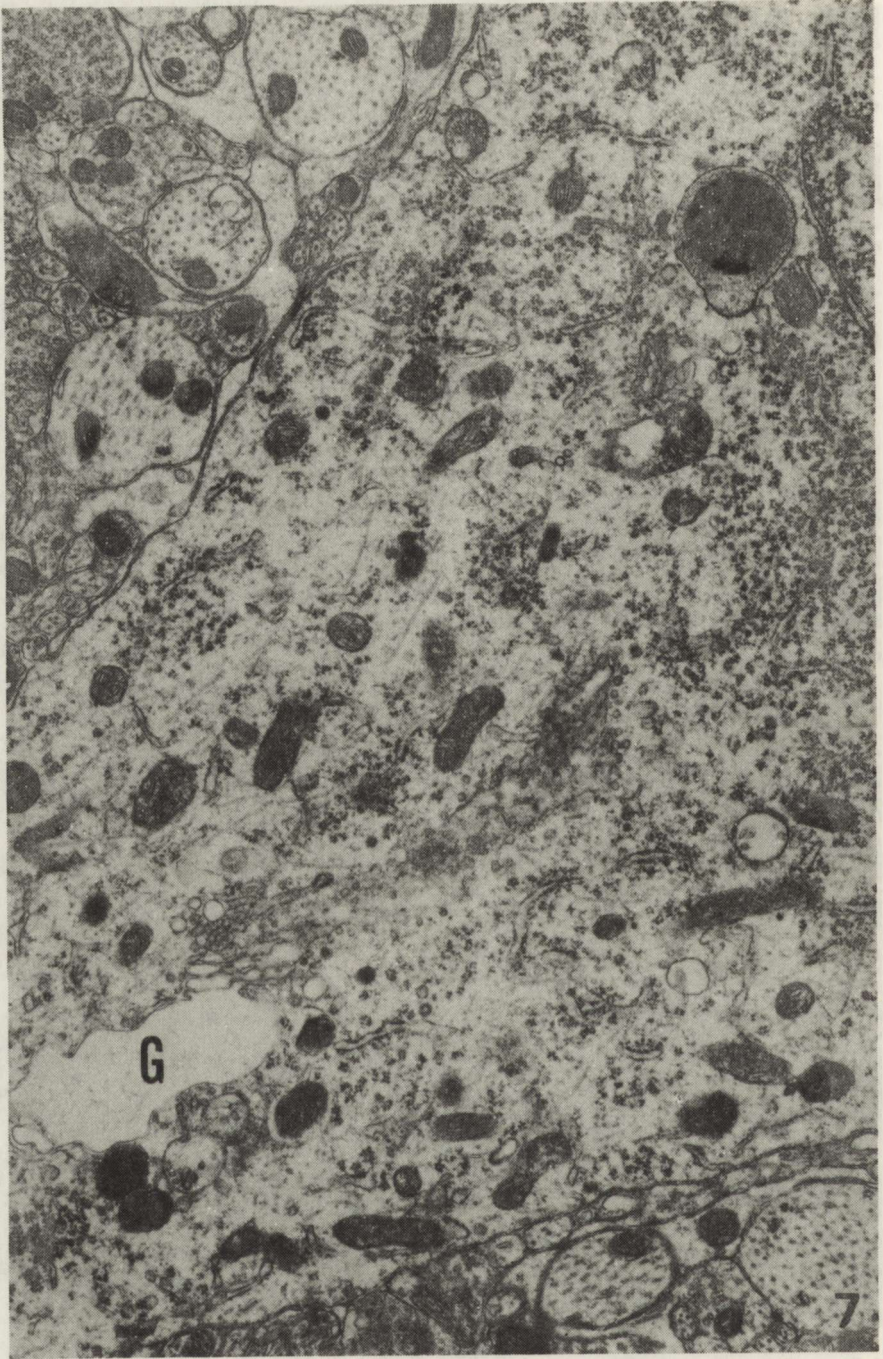




Ryc. 6. Szczur 7 dni po ischemii. Fragment neuronu olbrzymiego. Jądro komórkowe z wgłobieniem zawiera wrtęt jądrowy zbudowany z filamentów (strzałka). Pow. 18000 ×

Fig. 6. Rat 7 days after ischemia. Fragment of large neuron. Nucleus with invagination contains filamentous nuclear body (arrow). × 18000

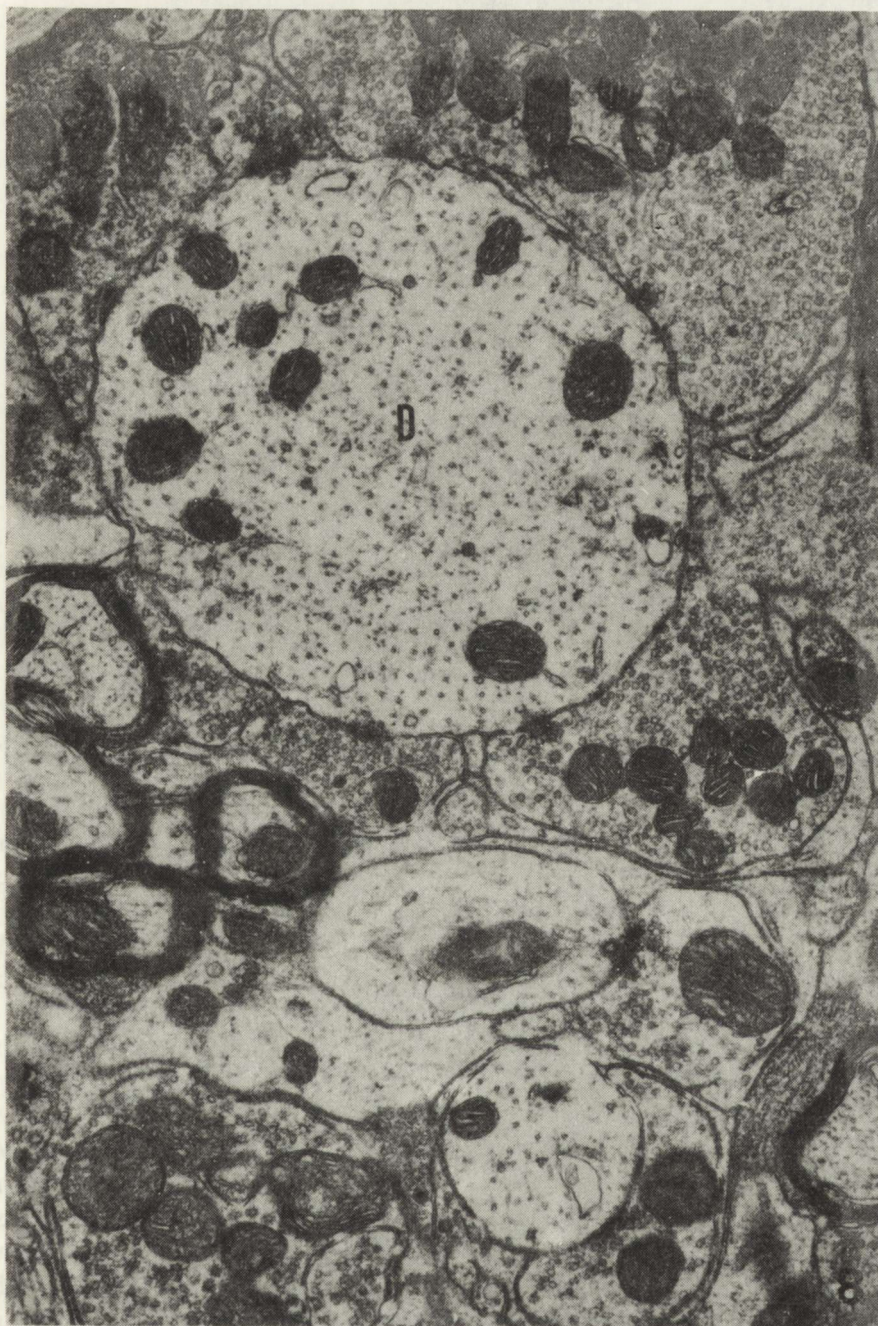




Ryc. 7. Szczur 7 dni po ischemii. Fragment neuronu olbrzymiego ze znacznie poszerzoną cysterną układu Golgiego (G) oraz lizosomami w cytoplazmie. Pow. 18750 ×

Fig. 7. Rat 7 days after ischemia. Fragment of large neuron. Note dilated Golgi cistern (G) and lysosomes in cytoplasm. × 18750

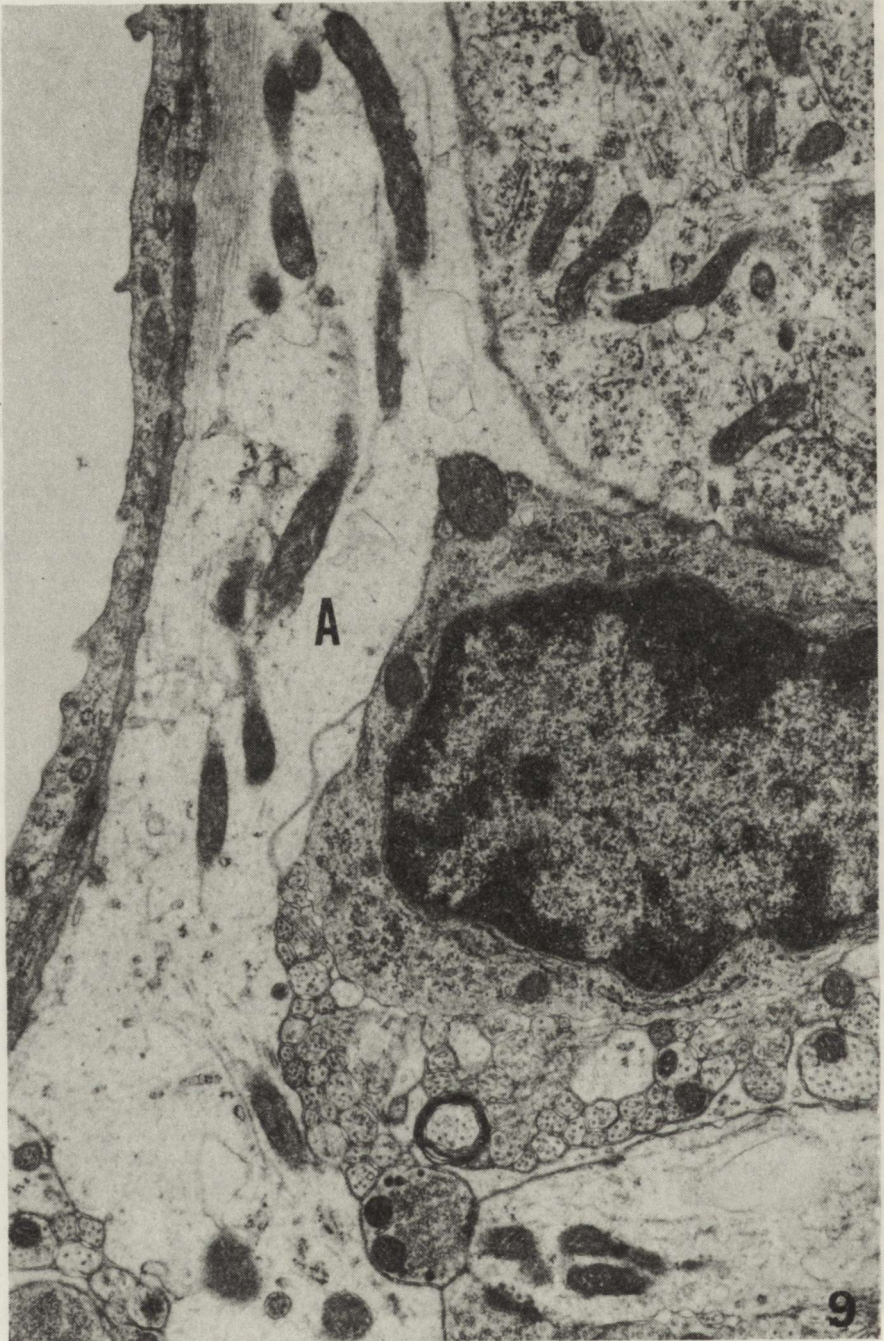




Ryc. 8. Szczur 7 dni po ischemii. Profil dendrytu neuronu olbrzymiego (D) z przylegającymi prawidłowo wykształconymi zakończeniami presynaptycznymi. Pow. 22500 ×

Fig. 8. Rat 7 days after ischemia. Presynaptic endings on dendrite (D) surface exhibit normal structure. They contain numerous microvesicles and mitochondria. × 22500





Ryc. 9. Szczur 7 dni po niedokrwieniu. Obszar okołonaczyniowy. Elektronowo przezierna wypustka astrocytu (A) uboga w organelle subkomórkowe, zawierająca wakuole. Pow. 18000 ×  
 Fig. 9. Rat 7 days after ischemia. Perivascular area. Astrocytic process (A) with electron-lucent cytoplasm poor in subcellular organelles and contains vacuoles. × 18000



## OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują na powstawanie stosunkowo niewielkich zmian ultrastrukturalnych w jądrze olbrzymiokomórkowym pnia mózgu szczura w następstwie 5-minutowego, całkowitego niedokrwienia mózgu, w przebiegu incydentu śmierci klinicznej. Dotyczy to zwłaszcza zmian obserwowanych w 3 godziny po reanimacji. Nieprawidłowości ultrastrukturalne obserwowane w jądrze olbrzymiokomórkowym były bardziej uchwytnie 7 dni po niedokrwieniu. Obserwacje te wskazują na nasilenie się zmian patologicznych wraz z upływem czasu po reanimacji. Zmiany w neuronach olbrzymich w 3 godziny po przywróceniu krążenia krwi były typowe dla niedokrwienia i polegały na obrzmieniu mitochondriów, co może odpowiadać drobnowodniczkom zmianom cytoplazmy komórek, obserwowanym w mikroskopie świetlnym (Mossakowski i wsp. 1986). Jak wykazały uprzednio prowadzone badania nad doświadczalnie wywołanym niedokrwieniem, mitochondria reagują bardzo szybko, a zmiany ultrastrukturalne tych organelli obserwuje się już w krótkim czasie po rozpoczęciu doświadczenia (Brierley i wsp. 1971; Karpati i wsp. 1974). We wczesnym okresie obserwacji stwierdziliśmy również w neuronach olbrzymich obecność licznych wakuoli w cytoplazmie. Pojawianie się wakuoli w neuronach można tłumaczyć występowaniem miejscowych zmian osmotycznych. Wiadomo, że w trakcie niedokrwienia i w okresie poniedokrwienym dochodzi do zaburzenia homeostazy wodno-elektrolitowej, powodującej wzrost osmolalności tkanki (Hossmann, Takagi 1976; Bandaranayake i wsp. 1978), jak również do zahamowania pompy jonowej oraz do zmian w przepuszczalności błon (Astrup 1982). Według niektórych autorów, zahamowanie działania pompy sodowo-potasowej może prowadzić do wzrostu stężenia jonów  $\text{Na}^+$  w komórkach nerwowych i glejowych, a wraz z nim do zwiększenia zawartości wody w ich cytoplazmie (Schneider, Dralle 1973; Jenkins i wsp. 1981).

W II grupie doświadczalnej, tj. 7 dni po incydencie śmierci klinicznej, w niektórych neuronach olbrzymich obserwowano podobne zmiany jak w poprzedniej grupie. Polegały one na wakuolizacji cytoplazmy oraz występowaniu miejscowych przejaśnień hialoplazmy. Ponadto pojedyncze neurony olbrzymie wykazywały poszerzenia cystern kompleksu Golgiego. Obecność wtrętów jądrowych mogłaby świadczyć o wzmożonej aktywności metabolicznej tych komórek. Podobne wtręty jądrowe zostały opisane przez Seitea i wsp. (1977) w neuronach zwojów sympatycznych kota. Wymienieni autorzy sądzą, że częstość występowania tych wtrętów zależy od stopnia aktywności komórek. Seite i wsp. (1977) podają, że częstość ich występowania wzrastała 185-krotnie po podaniu analogów cyklicznego AMP, lub w wyniku stymulacji elektrycznej. Biologiczne znaczenie tych struktur nie jest dotychczas w pełni wyjaśnione.

Częstym i powtarzalnym zjawiskiem, obserwowanym 7 dni po niedo-



krwieniu, było obrzmienie okołonaczyniowych wypustek astrocytarnych. Występowanie tego typu zmian w astrogleju w warunkach niedokrwienia i/lub niedotlenienia OUN jest zgodne z doniesieniami innych autorów (Chiang i wsp. 1968; Hossmann, Sato 1970). W świetle ostatnich badań Shigeno i wsp. (1986) obrzmienie astrogleju we wczesnej fazie obrzęku mózgu ma charakter cytotoksyczny, chociaż istnieją także dowody świadczące o istotnej roli kapilarów mózgowych w rozwoju wczesnego obrzęku poischemicznego.

Obecne wyniki badań morfologicznych są uzupełnieniem poprzednich badań nad wpływem krótkotrwałego 2,5-minutowego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę obszaru olbrzymiokomórkowego pnia mózgu szczura (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1987). Z przeprowadzonych badań wynika, że przebyte całkowite 5 minutowe niedokrwienie mózgu wywołuje zmiany w obszarze olbrzymiokomórkowym pnia mózgu, obserwowane w trzy godziny po zabiegu i występujące w większym nasileniu u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem po reanimacji.

#### EFFECT OF COMPLETE CEREBRAL ISCHEMIA ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE NUCLEUS GIGANTOCELLULARIS OF THE BRAIN STEM IN THE RAT

##### Summary

The experiment was performed on Wistar rats in which the incident of clinical death was induced according to the method of Korpaczew et al. (1982). Electron-microscopic observations performed 3 hours after reanimation revealed changes affecting mostly the giant neurons of the *nucleus gigantocellularis*. The neurons exhibited the presence of swollen mitochondria and electron-lucent vacuoles in their cytoplasm. Ultrastructural alterations were more pronounced 7 days after the ischemic incident, indicating gradual and progressive changes in the metabolic activity of these neurons. Edematous changes affecting astrocytes, especially their processes were observed in the perivascular tissue on the 7th day after the experiment. Small neurons did not show any abnormalities.

#### ВЛИЯНИЕ ПОЛНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГИГАНТОКЛЕТОЧНОГО ЯДРА СТВОЛА МОЗГА КРЫСЫ

##### Резюме

Исследования проводились на зрелых крысах линии Вистар, у которых сдавление сосудистого пучка сердца (мет. Кorpачева и соавторов 1982) приводило к остановке кровообращения и клинической смерти. Реанимация предпринималась по истечении 5 минут.

После полной ишемии мозга результаты электронно-микроскопических исследований обнаруживают появление ультраструктурных изменений в гигантских нейронах. В 1-й экспериментальной группе — 3 часа после эксперимента — некоторые гигантские нейроны содержали набухшие митохондрии и электронно-прозрачные вакуоли. Однако в большинстве гигантских нейронов и в мелких нейронах не было ультраструктурных изменений. Поблизости от сосудов в некоторых астроцитарных отростках также наблюдались элек-



тронно-прозрачные вакуоли. Во 2-й экспериментальной группе — 7 дней после эксперимента — в гигантских нейронах были сходные изменения. Результаты исследования показывают, что полная 5-минутная ишемия мозга вызывает умеренное, сохраняющееся в течение 7 дней набухание области гигантоклеточного ядра ствола мозга крысы.

## PIŚMIENICTWO

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. 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. Rec.*, 1976, 184, 354–357.
4. 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.
5. Bowsher D., Mallart A., Petit D., Albe-Fessard D.: A bulbar relay to the centre median. *J. Neurophysiol.*, 1968, 21, 288–300.
6. 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.
7. Brierley J. B., Adams J. H., Graham D. J., Simpson J. A.: Neocortical death after cardiac arrest. *Lancet*, 1971, 2, 560–565.
8. Burton H.: Somatic sensory properties of caudal bulbar reticular neurons in the cat (*Felis domestica*). *Brain Res.*, 1968, 11, 357–372.
9. 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.
10. Casey K. L.: Responses of bulboreticular units to somatic stimuli eliciting escape behavior in the cat. *Int. J. Neurosci.*, 1971, 2, 15–28.
11. Chiang J., Kowada M., Ames A., Wright R. L., Majno G.: Cerebral ischemia. III. Vascular changes. *Am. J. Pathol.*, 1968, 52, 455–476.
12. 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.
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. Hossmann K.-A., Takagi S.: Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 1976, 51, 124–131.
15. Jenkins L. W., Pawlishock J. T., Lewelt W., Miller J. D., Becker D. P.: The role of postischemic recirculation in the development of ischemic neuronal injury following complete cerebral ischemia. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981, 55, 205–211.
16. Karpati G., Carpenter S., Melmed C., Eisen A. A.: Experimental ischemic myopathy. *J. Neurol. Sci.*, 1974, 23, 129–161.
17. Korpaczew W. G., Lysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie kliniczjeskiej smierti i postreanimationnoj bolezni u krys. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.*, 1982, 3, 78–80.
18. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471–489.
19. Scheibel M. E., Scheibel A. B.: Structural substrates for integrative patterns in the brain stem reticular core. W: Reticular formation of the brain. Red. H. H. Jasper, L. D. Proctor, R. S. Knighton, W. C. Noshay, R. T. Costello. Little, Brown and Co, 1958, 31–55.



20. 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.
21. 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. Ultrastruct. Res.*, 1977, 61, 254–259.
22. 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.*
23. Siegel J. M.: Behavioral functions of the reticular formation *Brain Res., Rev.*, 1979, 1, 69–105.
24. Zaręba-Kowalska A., Borowicz J.: The effect of hyperthermia on the ultrastructural of the gigantocellular reticular region in the rabbit. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 335–352.
25. Zaręba-Kowalska A., Borowicz J.: The effect of transient cerebral ischemia on the ultrastructure of the gigantocellular region of the medullary reticular formation in the rat. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 117–130.

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



BARBARA GAJKOWSKA, ANNA ZARĘBA-KOWALSKA

## WPLYW CAŁKOWITEGO NIEDOKRWIENIA MÓZGU NA ULTRASTRUKTURĘ PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO UKŁADU NEUROSEKRECYJNEGO SZCZURA

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

Pomimo obszernego piśmiennictwa dotyczącego zmian ultrastrukturalnych w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego ssaków, spowodowanych niedokrwieniem, dane dotyczące zmian neurosekrecyjnego układu podwzgorzowo-przysadkowego w następstwie ischemii są niedostateczne. Prawidłowa czynność neuronów podwzgorzowych jąder sekrecyjnych: jądra nadwzrokowego (*nucleus supraopticus* – SO) i jądra przykomorowego (*nucleus paraventricularis* – PV) jest związana z wytwarzaniem, przechowywaniem i wydzielaniem do krwi biologicznie czynnych peptydów, w tym przede wszystkim hormonów wazopresyny i oksytocyny. Uwalnianie tych hormonów do krwi w narządzie neurohemalnym, który stanowi część nerwowa przysadki, reguluje prawidłowy przebieg podstawowych procesów fizjologicznych organizmu. Układ podwzgorzowo-przysadkowy jest w znacznej mierze odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy wodno-elektrolitowej.

Z badań nad niedokrwieniem mózgu wynika, iż powoduje ono liczne zmiany fizjologiczne, biochemiczne oraz morfologiczne (Bakay, Lee, 1968; Yu i wsp. 1972a, b; Hossmann i wsp. 1973, Hossmann, Zimmerman 1974). Wiadomo również, że nieprawidłowości metaboliczne oraz zaburzenia mikrokrążenia w mózgu utrzymują się przez szereg godzin po incydencie niedokrwinnym (Klatzo 1975, 1985). Obecna praca jest kontynuacją uprzednio prowadzonych badań ultrastrukturalnych neuronów jąder sekrecyjnych SO i PV po krótkotrwałym, całkowitym niedokrwieniu mózgu u szczura (Gajkowska 1987).

W badaniach nad ischemią wykorzystano model Korpaczewa i wsp. (1982). Zalety oraz ograniczoność tego modelu zostały szczegółowo przeanalizowane przez Mossakowskiego i wsp. (1986).

Przedmiotem obecnej pracy jest charakterystyka ultrastrukturalna neurosekrecyjnego układu podwzgorzowo-przysadkowego szczura po przebytych



całkowitym niedokrwieniu mózgu. W porównaniu z poprzednio prowadzonymi badaniami wydłużono czas niedokrwienia, a obserwacje morfologiczne przeprowadzono po dłuższym okresie przeżycia zwierząt.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dojrzałych szczurach szczepu Wistar, samicach o masie ciała około 180 g. W płytkiej narkozie eterowej zwierzętom wprowadzono do klatki piersiowej igłowy zacisk i uciskano pęczek naczyniowy serca przez okres 3 minut. Prowadziło to do ustania czynności serca i oddechu, utrzymującego się mimo usunięcia zacisku do momentu rozpoczęcia czynności reanimacyjnych, które podejmowano po upływie 5 min. Stosowano zewnętrzny masaż serca do przywrócenia jego spontanicznej czynności oraz kontrolowaną wentylację płuc za pomocą respiratora, aż do uzyskania pełnosprawnej własnej czynności oddechowej. Zastosowanie czynności reanimacyjnych przywracało czynność serca w okresie 1–3 min. Spontaniczna czynność oddechowa wracała średnio po około 6 min.

Zastosowany model doświadczalny został dokładnie opisany pod względem fizjopatologicznym (Korpaczew i wsp. 1986; Mossakowski i wsp. 1986).

Zwierzęta uśmiercano w grupach po 3 szczury, po 3 godz. (I grupa doświadczalna) i po 7 dniach (II grupa doświadczalna) po zabiegu, wykonując przezsercową perfuzję utrwalaczem Karnovskiego. Kontrolę badań stanowiły 3 szczury, nie poddane żadnym zabiegom. Pobrane fragmenty podwzgórza zawierające jądra nadwzrokowe i przykomorowe oraz płat nerwowy przysadki utrwalano następnie przez imersję w utrwalaczu Karnovskiego przez 1 godz. w temperaturze pokojowej oraz 1 godz. w 4°C. Następnie materiał utrwalono w 1% roztworze czterotlenku osmu, odwadniano w alkoholu etylowym i zatapiano w Eponie. Ultracienkie skrawki kontrastowano wodnym nasyconym roztworem octanu uranylu i cytrynianem ołowiu. Preparaty oglądano i zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 1200 EX.

#### WYNIKI

*I grupa doświadczalna.* W tej grupie prowadzono obserwacje neuronów SO i PV oraz płata nerwowego przysadki (PN) trzy godziny po przywróceniu krążenia krwi. Zaobserwowano podobną reakcję na niedokrwienie w obu badanych jądrach, dlatego podane opisy dotyczą neuronów obydwu jąder neurosekrecyjnych.

W porównaniu z kontrolą większość, obserwowanych neuronów wydzielniczych znajdujących się w różnych stadiach procesu neurosekrecyjnego, nie wykazywała zmian w budowie ultrastrukturalnej. Neurony posiadały duże jądra z lekkimi wgłobieniami otoczki jądrowej, wypełnione równomiernie rozproszoną chromatyną jądrową. Zwracała uwagę obecność dużego jąderka

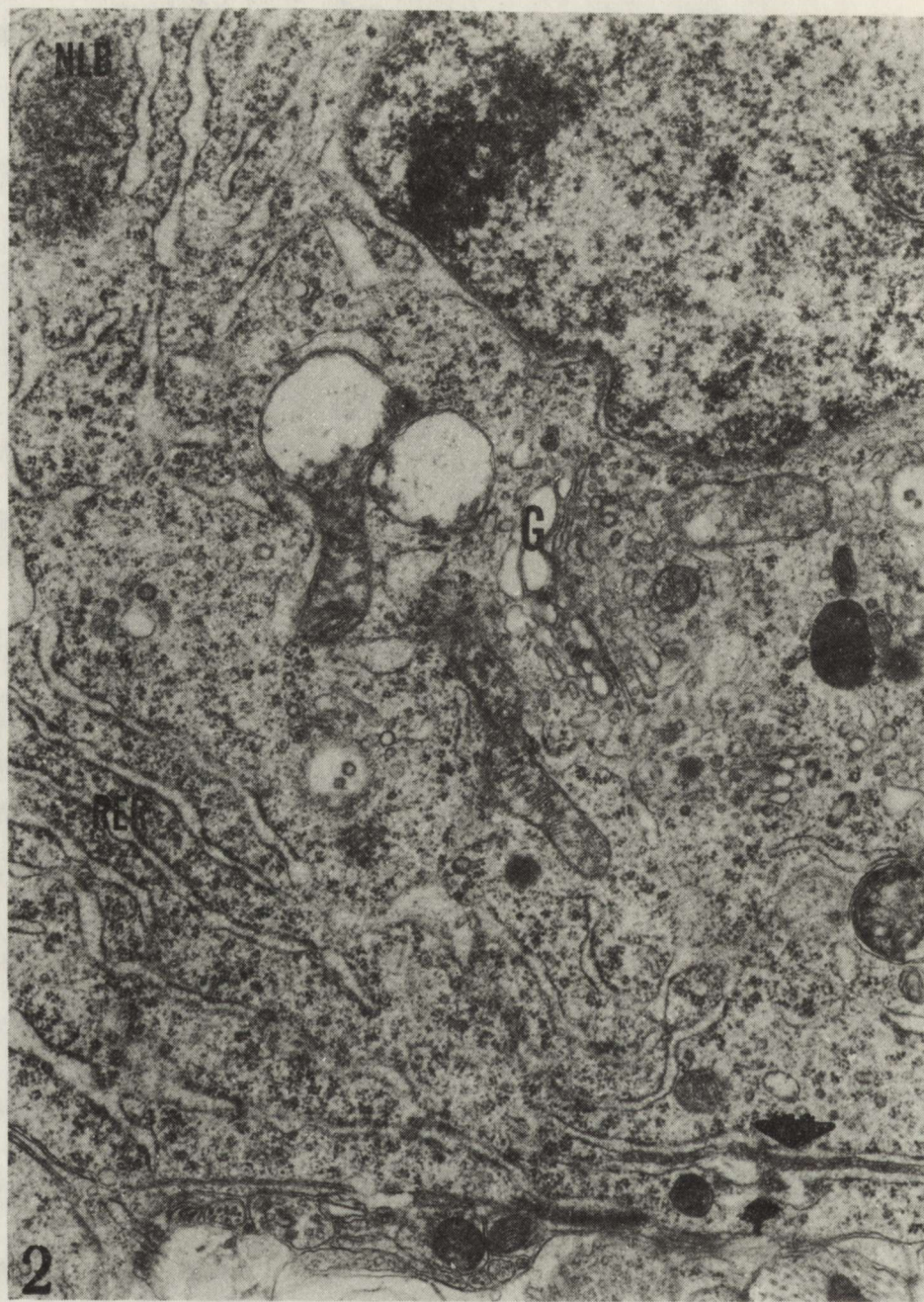




Ryc. 1. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Jądro nadwzrokowe. Fragment neuronu z bogato rozwiniętą siateczką śródplazmatyczną ziarnistą (RER) i kompleksem Golgiego (G) oraz licznymi drobnymi mitochondriami. Pow. 25000 ×

Fig. 1. Rat 3 h after ischemia. Supraoptic nucleus. Fragment of neuron with well developed granular endoplasmic reticulum (RER), Golgi complex (G), and numerous small mitochondria. × 25000

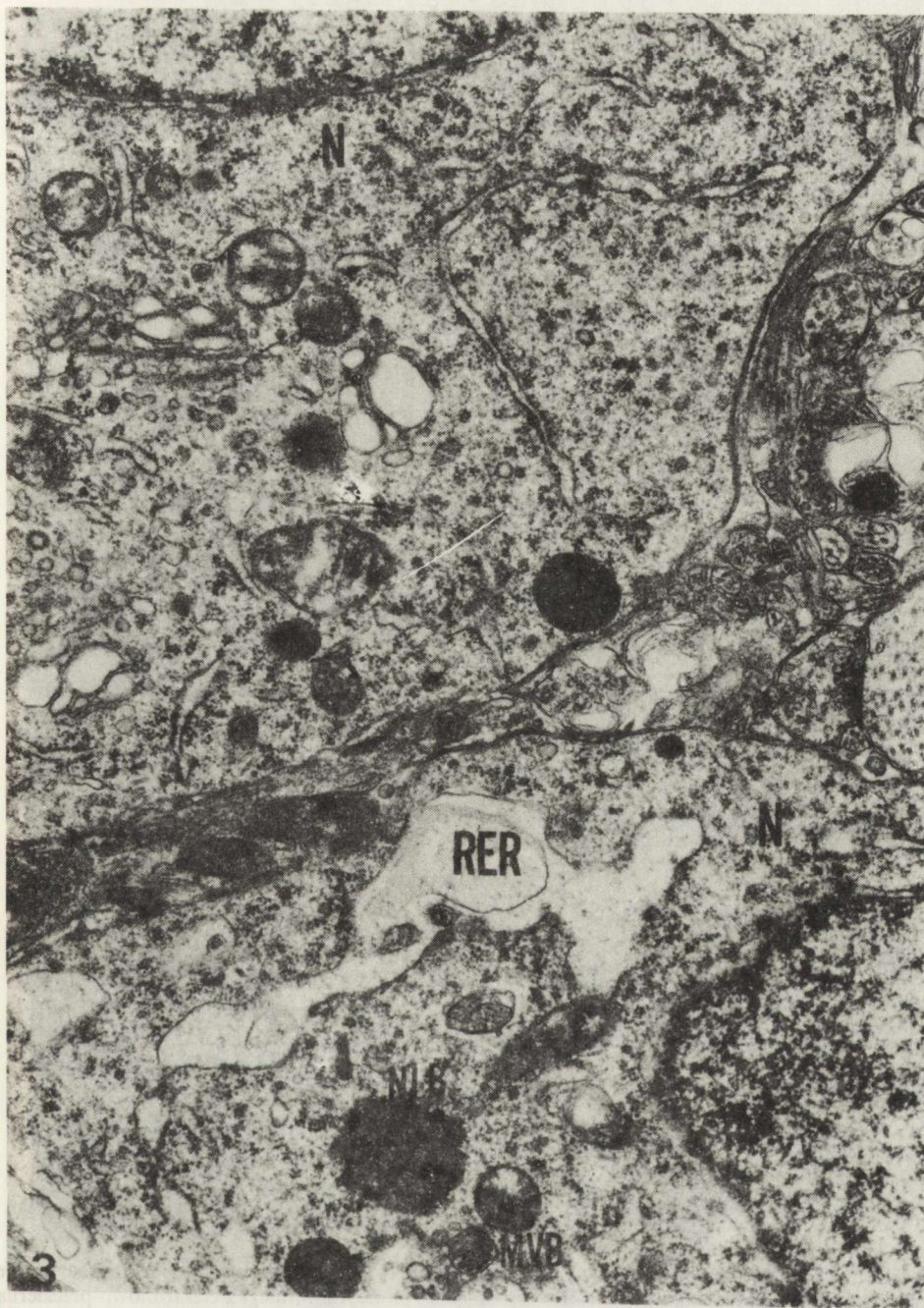




Ryc. 2. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Fragment neuronu o dobrze rozwiniętej siateczce śródplazmatycznej ziarnistej (RER) tworzącej układy wstążkowe (ribbon-formations) (strzałka). W cytoplazmie dobrze rozbudowany kompleks Golgiego (G) niektóre mitochondria są obrzmiałe, widoczne również ciało jąderko-podobne (NLB). Pow. 18750 ×

Fig. 2. Rat 3 h after ischemia. Paraventricular nucleus. Fragment of neuron with well developed granular endoplasmic reticulum (RER), forming ribbon formation (arrow). In cytoplasm well developed Golgi complex (G), some swollen mitochondria and nucleolus-like body (NLB). × 18750

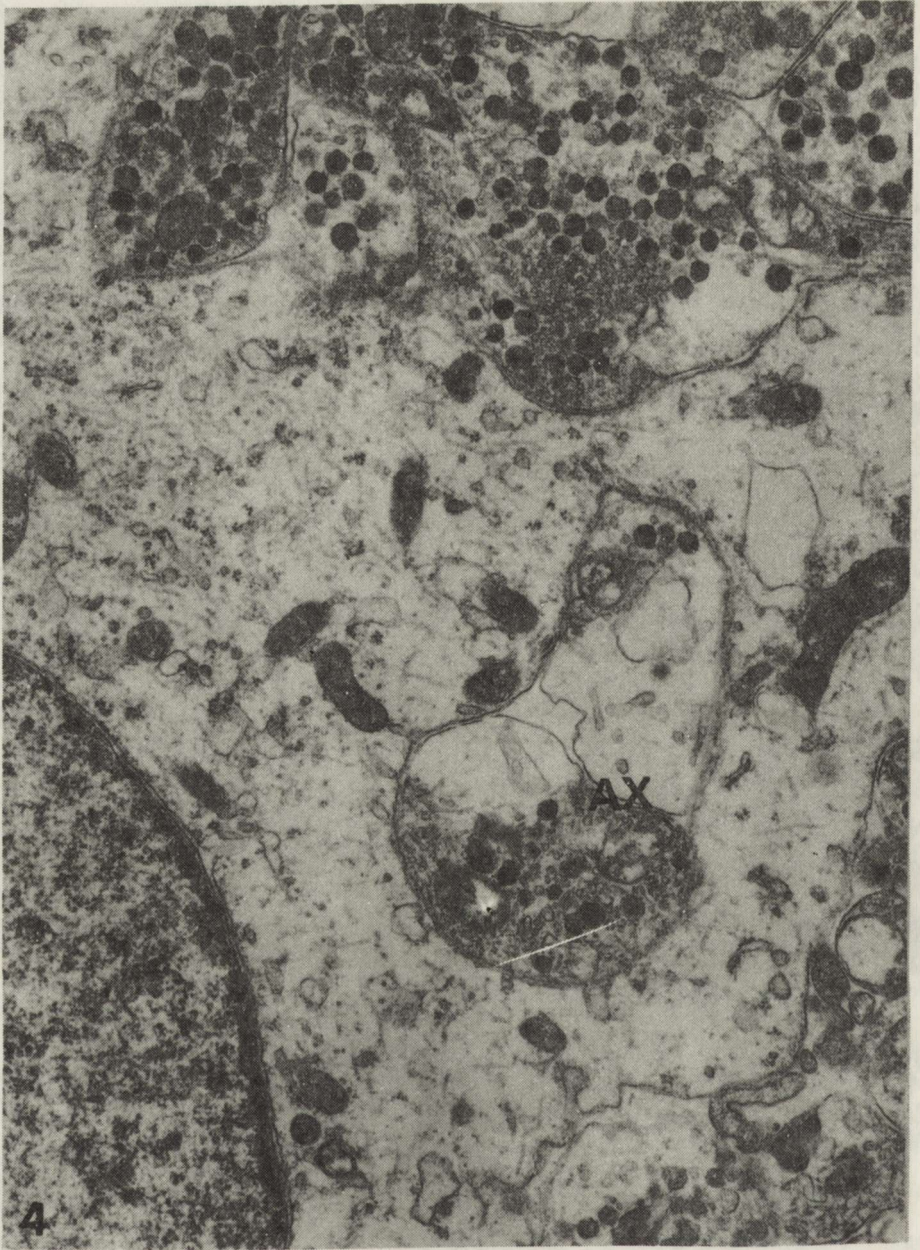




Ryc. 3. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Jądro nadwzrokowe. Fragmenty dwóch neuronów (N). W jednym z nich poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (RER), ciała wielopęcherzykowe (MVB) oraz ciało jąderko-podobne (NLB). Pow. 37500 ×

Fig. 3. Rat 3 h after ischemia. Supraoptic nucleus. Fragments of two neurons (N). In one of them dilated channels of granular endoplasmic reticulum (RER), multivesicular body (MVB) and nucleolus-like body (NLB). × 37500

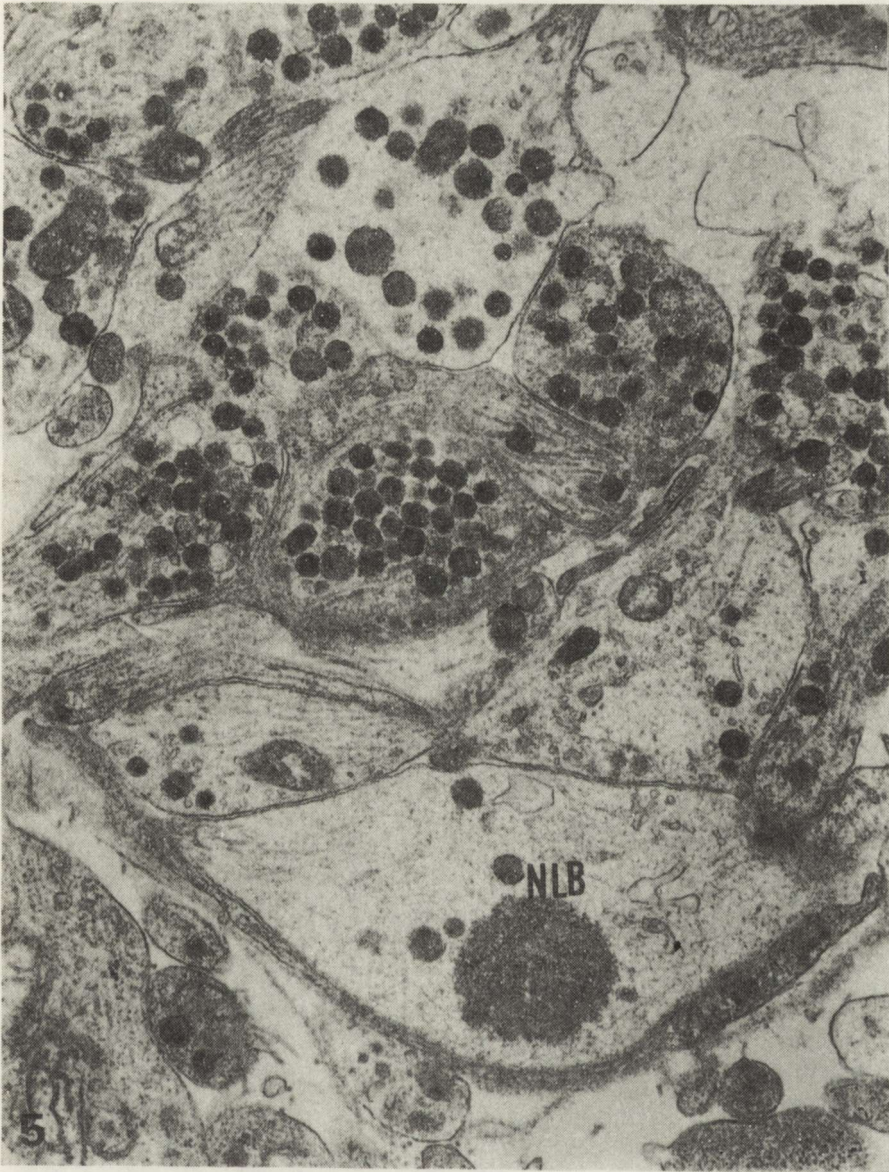




Ryc. 4. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Płat nerwowy przysadki. Widoczne profile obrzmiałych aksonów (ax), wtopionych w cytoplazmę pituicytu. Pituicyt z elektronowo-przezierną cytoplazmą, ubogą w organelle subkomórkowe. Pow. 22500 ×

Fig. 4. Rat 3 h after ischemia. Hypophyseal neural lobe. Profiles of swollen axons (ax) enclosed in pituicyte cytoplasm are visible. Pituicyte with electron-lucent cytoplasm and few organelles. × 22500





Ryc. 5. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Płat nerwowy przysadki. Poszerzone przestrzenie pomiędzy aksonami. Aksony zawierają różne ilości ziarnistości neurosekrecyjnych, neurotubule oraz neurofilamenty. W jednym z profili aksonalnych widoczne ciało jąderko-podobne (NLB).  
Pow. 18750 ×

Fig. 5. Rat 3 h after ischemia. Hypophyseal neural lobe. Dilated spaces between axons. Axons contain various amounts of neurosecretory granules, neurotubules and neurofilaments. In one of axon profiles nucleolus-like body (NLB). × 18750

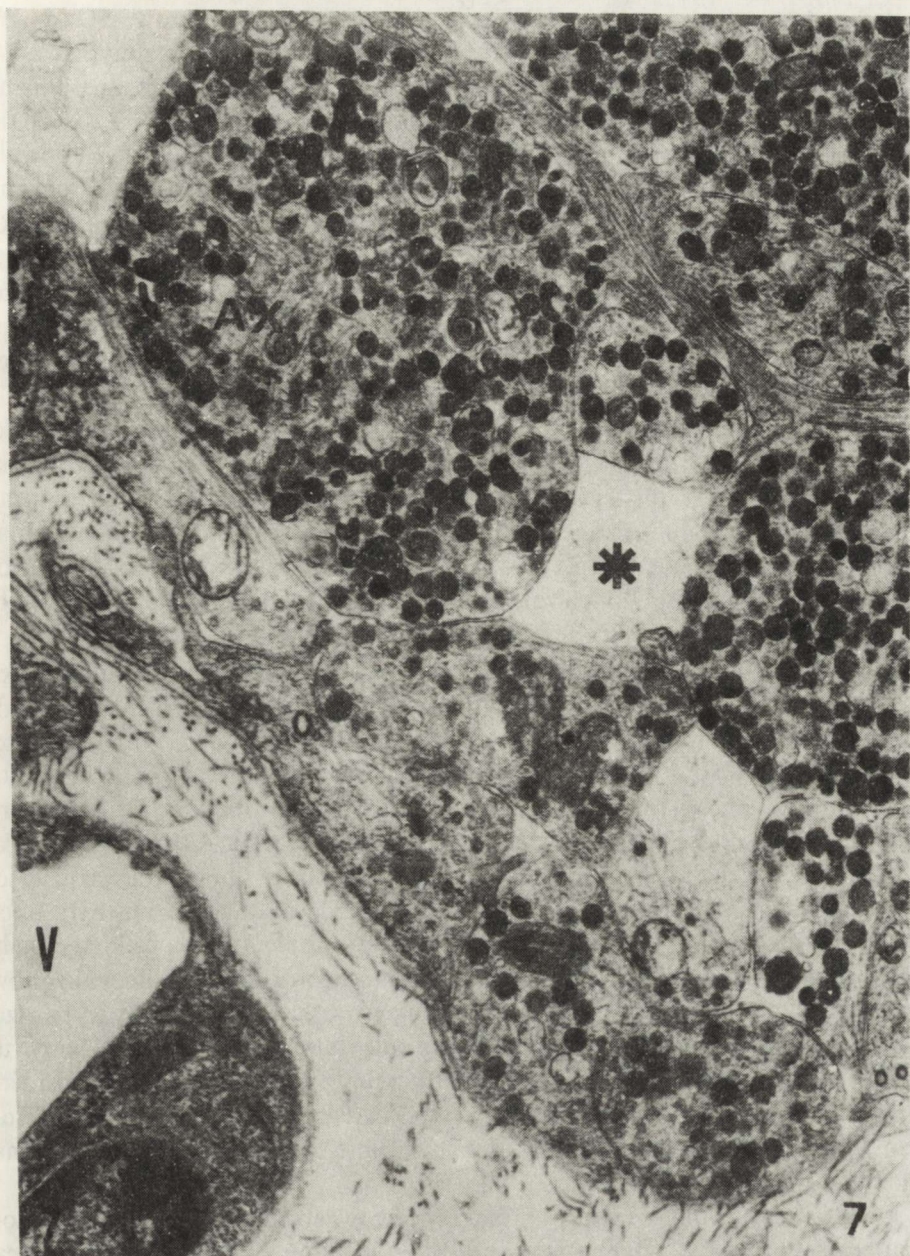




Ryc. 6. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Płat nerwowy przysadki. Fragment pituicytu (P) we wnętrzu którego widoczny jest akson (ax), zawierający dużą ilość figur mielinowych, pustych pęcherzyków oraz neurotubule. Pow. 18750 ×

Fig. 6. Rat 3 h after ischemia. Hypophyseal neural lobe. Fragment of pituicyte (P) with enclosed axon profile (ax). In the axon myelin figures, numerous microvesicles and neurotubules are present. × 18750





Ryc. 7. Szczur z 3-godz. przeżyciem po ischemii. Płat nerwowy przysadki. Wokół naczynia (V) widoczna poszerzona przestrzeń okołonaczyniowa, poszerzone są również przestrzenie międzykomórkowe (gwiazdka). W niektórych aksonach (ax) zwiększona ilość figur mielinowych i lizosomów. Pow. 18750 ×

Fig. 7. Rat 3 h after ischemia. Hypophyseal neural lobe. Dilated perivascular space around the vessel (V) is visible. Intercellular spaces are dilated (asterix) In some axons (ax) increased numbers of myelin figures and lysosomes. ×18750



o znacznej gęstości elektronowej. W cytoplazmie neuronów SO i PV obserwowano dobrze rozwinięty kompleks Golgiego, rozmieszczony zarówno w okolicach okołojądrowych, jak również w innych obszarach cytoplazmy oraz obecność w jego otoczeniu ziarnistości neurosekrecyjnych, których liczebność zależała od stanu czynnościowego komórki. Licznie występowały rybosomy i polirybosomy oraz lizosomy i ciała wielopęcherzykowe. Neurony charakteryzowały się obfitą siateczką śródplazmatyczną ziarnistą (RER), tworzącą często równoległe ułożone kanały wstęgowate (ribbon formations). W cytoplazmie obserwowano luźno leżące ciała jąderko-podobne (NLB) oraz pojedyncze mitochondria o cechach obrzmienia (ryc. 1, 2, 3). Synapsy tworzące połączenia na perykarionach tych neuronów nie wykazywały nieprawidłowości.

Niektóre mniej liczne neurony SO i PV wykazywały zmiany ultrastrukturalne polegające na poszerzeniu zbiorników Golgiego oraz siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ryc. 3). Niekiedy zbiorniki układu Golgiego oraz kanały RER silnie poszerzone zawierały niewielką ilość kłaczkowatego materiału. W cytoplazmie licznie występowały elementy cytoskeletonu: neurotubule i neurofilamenty. Nieliczne połączenia akso-somatyczne wykazywały obrzmienie aksoplazmy w odcinku presynaptycznym.

Większość obserwowanych profili aksonów płata nerwowego przysadki, podobnie jak u zwierząt kontrolnych, zawierała liczne ziarnistości neurosekrecyjne, wykazujące znaczne różnice średnicy (120–225 nm) i gęstości elektronowej. Aksony zawierały ponadto mitochondria, mikropęcherzyki, neurotubule, neurofilamenty oraz pojedyncze figury mielinowe. Niektóre aksony sekrecyjne wykazywały cechy obrzmienia (ryc. 4). Aksony te charakteryzowały się elektronowo-przezierną aksoplazmą oraz ubogością ziarnistości neurosekrecyjnych. Pituicyty z elektronowo-przezierną cytoplazmą były ubogie w organelle subkomórkowe. W aksonach występowały niekiedy ciała jąderko-podobne (ryc. 5). Często obserwowano zmienione profile aksonów sekrecyjnych, wtopione w cytoplazmę pituicytów lub pozostające w bardzo ścisłym kontakcie powierzchniowym z pituicytami (ryc. 4, 6). Aksony te znajdowały się w różnych fazach zwyrodnienia; od dezintegracji ziarnistości neurosekrecyjnych do tworzenia się gęstych ciał lamellarnych i zaniku aksolemmy. Przestrzeń międzykomórkowa była miejscami znacznie poszerzona i elektronowo przezierna (ryc. 7).

Niektóre naczynia włosowate płata nerwowego przysadki zwierząt doświadczalnych miały poszerzoną przestrzeń okołonaczyniową, zawierającą skąpą ilość włókien kolagenowych (ryc. 7).

*II grupa doświadczalna.* Obserwacje jąder SO i PV oraz płata nerwowego przysadki prowadzono po 7 dniach od wykonania doświadczenia. Neurony obydwu badanych jąder neurosekrecyjnych wykazały podobną reakcję na niedokrwienie. Większość obserwowanych neuronów SO i PV znajdujących się w różnych stadiach procesu neurosekrecyjnego miała prawidłową budowę

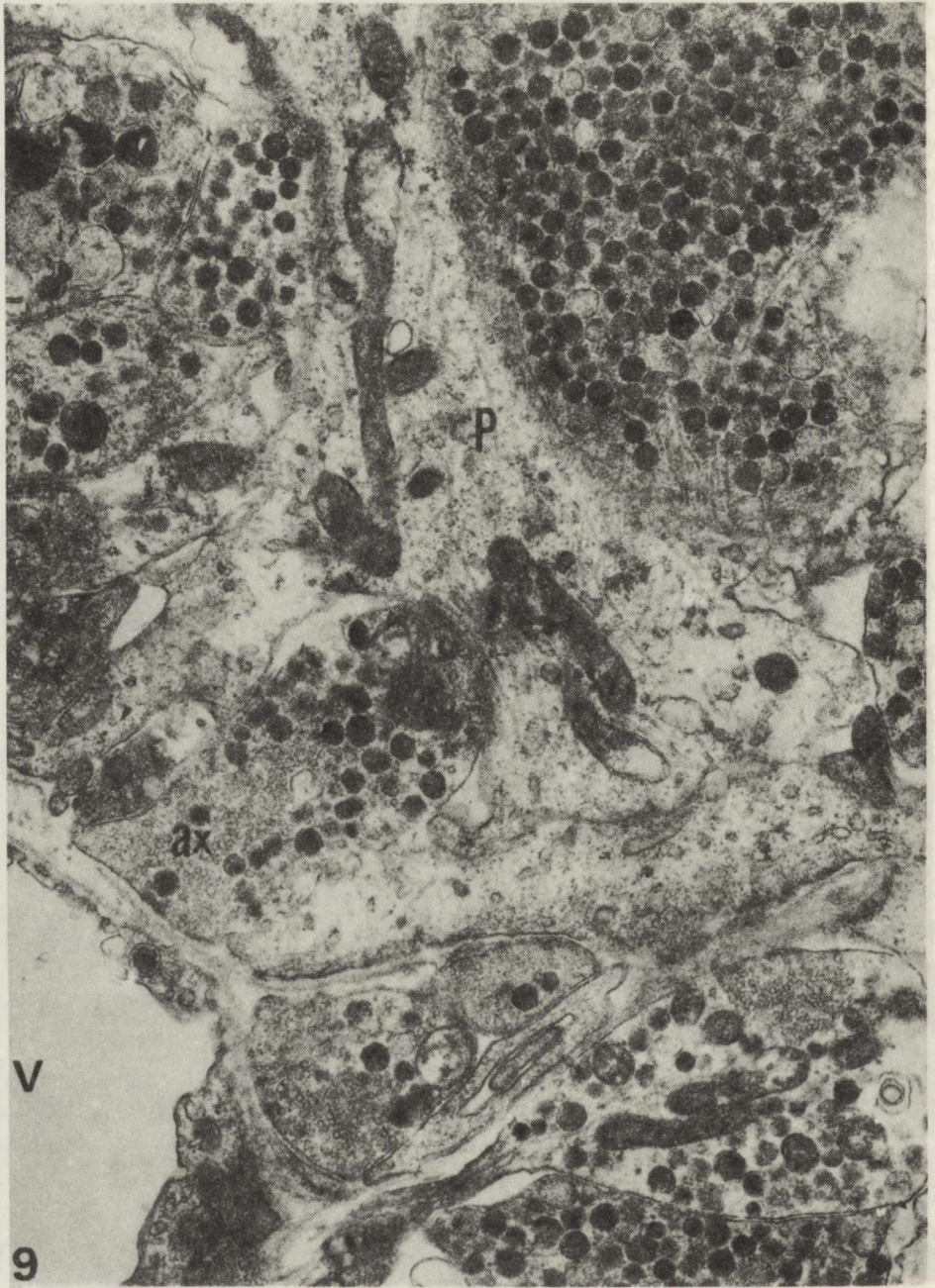




Ryc. 8. Szczur z 7-dniowym przeżyciem po ischemii. Jądro przykomorowe. Fragmenty dwóch neuronów (N I i N II). W jednym z nich obecna znacznie rozbudowana siateczka śródplazmatyczna ziarnista, w drugim zaś zwraca uwagę obfitość organelli komórkowych, niektóre mitochondria (M) są obrzmiałe, widoczne wakuole. Pow. 22500 ×

Fig. 8. Rat 7 days after ischemia. Paraventricular nucleus. Fragments of two neurons (N I and N II). In one of them extensively developed granular endoplasmic reticulum, in the other numerous cellular organelles, swollen mitochondria (M) and vacuoles. × 22500





Ryc. 9. Szczur z 7-dniowym przeżyciem po ischemii. Płat nerwowy przysadki. Widoczny fragment pituicytu (P) oraz poprzeczne przekroje aksonów wypełnionych ziarnistościami neurosekrecyjnymi. W pobliżu naczynia krwionośnego (V) widoczne aksony (ax) wypełnione przeważnie mikro-pęcherzykami. Pow. 22500 ×

Fig. 9. Rat 7 days after ischemia. Hypophyseal neural lobe. Fragment of pituicyte (P) and transverse sections of axons with numerous neurosecretory granules. Axons (ax) containing mostly microvesicles are visible in the vicinity of blood vessel (V). × 22500



ultrastrukturalną. Charakterystyczną cechą tych komórek był rozbudowany kompleks Golgiego cytoplazmy okołojądrowej, w którego sąsiedztwie obserwowano ziarnistości neurosekrecyjne. W cytoplazmie widoczne były liczne lizosomy i ciała wielopęcherzykowe oraz neurotubule i neurofilamenty. Siateczka śródplazmatyczna ziarnista była dobrze rozwinięta, licznie występowały rybosomy, polirybosomy oraz mitochondria. Niektóre mitochondria były obrzmiałe, miały elektronowo-przezierną macierz i skrócone, fragmentaryczne grzebienie. Podobnie jak w grupie poprzedniej, obserwowano również neurony, które wykazywały poszerzenia cystern kompleksu Golgiego oraz kanałów siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (ryc. 8). Nie obserwowano odchyień od normy w otaczającym neuropilu.

Budowa ultrastrukturalna pła nerwowego przysadki wykazała nieznaczne różnice w porównaniu z kontrolą (ryc. 9). Zdecydowana większość profili aksonów sekrecyjnych charakteryzowała się obfitą zawartością ziarnistości neurosekrecyjnych; profile te wykazywały również obecność mikropęcherzyków i mitochondriów. Przestrzeń okołonaczyniowa wokół większości obserwowanych włóściczek była wypełniona delikatnym materiałem włókienkowatym o małej gęstości elektronowej oraz zawierała niewielką ilość włókienek kolagenowych. Aksony znajdujące się w pobliżu kapilarów zawierały oprócz nielicznych ziarnistości neurosekrecyjnych, mikropęcherzyki i drobne mitochondria, tubularne formacje gładkiej siateczki aksoplazmatycznej oraz neurotubule.

#### OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują na występowanie zmian ultrastrukturalnych w układzie podwzgórzowo-przysadkowym szczura po przebytej śmierci klinicznej z zatrzymaniem akcji serca, krążenia krwi i czynności oddechowej. Zmiany obserwowano zarówno po 3 godz. po incydencie śmierci klinicznej, jak też po 7 dniach. Charakter tych zmian był podobny zarówno po 3 godz., jak i po 7 dniach, jednakże ich nasilenie po 7 dniach było wyraźnie mniejsze. Można więc sądzić, że zmiany te miały charakter czynnościowy, ponieważ po 7 dniach większość neuronów w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym nie różniła się od neuronów sekrecyjnych zwierząt kontrolnych. Niektóre zmiany neuronalne obserwowane u zwierząt doświadczalnych były charakterystyczne dla niedokrwienia. Wyrażały się one przede wszystkim obrzmieniem mitochondriów. Obrzmiałe były także niektóre odcinki presynaptyczne połączeń akso-somatycznych. Pewna część populacji neuronów wykazywała cechy wzmożonej aktywności metabolicznej, o czym świadczyły obserwacje dotyczące kompleksu Golgiego oraz znacznie rozbudowana siateczka śródplazmatyczna ziarnista, wykazująca znaczne poszerzenia kanałów.

Badany przez nas obszar podwzgórza, a mianowicie jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe, syntetyzuje wazopresynę, hormon antydiuretyczny związany z regulacją gospodarki wodnoelektrolitowej, oksytocynę i inne



neuropeptydy, które są magazynowane i wydzielane do krwioobiegu w płacie nerwowym przysadki. Obserwacje płata nerwowego przysadki prowadzone w 3 godz. po doświadczeniu wskazywały na hamowanie wydzielania hormonów do krwioobiegu. Obserwowano bowiem wzrost ilości profili aksonów sekrecyjnych zawierających lizosomy, figury mielinowe oraz wakuole autofagowe. Wzrost ilości tych struktur obserwowany zarówno w perykarionach, jak i zakończeniach aksonów sekrecyjnych jest wskaźnikiem aktywności metabolicznej, dzięki której jest regulowany proces sekrecji hormonów na drodze granulizy i krynofagii (Boudier i wsp. 1979; Chang, Dellmann 1984). Charakterystyczną cechą ultrastrukturalną płata nerwowego przysadki zwierząt doświadczalnych 3 godz. po incydencie śmierci klinicznej była obecność profili aksonów sekrecyjnych, wtopionych w cytoplazmę pituicytów, lub będących w bardzo ścisłym kontakcie powierzchniowym z pituicytami. Obserwacje te wskazują na wzajemne oddziaływania pomiędzy aksonami neurosekrecyjnymi a pituicytami. Tweedle i Hatton (1980) przeprowadzili badania morfometryczne płata nerwowego przysadki odwodnionych i kontrolnych szczurów oraz wykazali, że w warunkach hamowania uwalniania hormonów do krwioobiegu, aksony sekrecyjne są ściśle otoczone przez pituicyty lub wtopione w cytoplazmę pituicytów, natomiast znajdują się w luźnym kontakcie powierzchniowym w czasie wzmożonego wydzielania hormonów. Wymienieni uprzednio autorzy wykazali zatem morfologicznie udział pituicytów w kontroli uwalniania hormonów w płacie nerwowym przysadki. Niektóre aksony sekrecyjne znajdowały się w różnych fazach zwyrodnienia. Wiadomo, że w warunkach patologicznych pituicyty mogą fagocytować aksony sekrecyjne (Dellmann 1973; Zaręba-Kowalska i wsp. 1983). Mechanizm oddziaływania pituicytów na aksony sekrecyjne jest złożony i niedostatecznie wyjaśniony. Niektórzy autorzy sugerują, że pituicyty hamują uwalnianie hormonów (Tweedle 1983; Van Leeuwen, de Vries 1983). Proces ten odbywać się może na drodze: 1) degradacji hormonów w wyniku zwyrodnienia aksonu, 2) regulacji zewnątrzkomórkowego środowiska jonowego, głównie jonów wapnia i potasu, lub 3) przez wydzielanie GABA przez pituicyty. Nasze poprzednie badania biochemiczne (Zaręba-Kowalska, Wysmyk-Cybula 1985), wykazały dwukrotny wzrost syntezy GABA w płacie nerwowym przysadki odwodnionych szczurów.

Obserwacje morfologiczne przeprowadzone 3 godz. po incydencie śmierci klinicznej mogą odzwierciedlać zaburzenia czynności będące wynikiem wpływu czynników cytotoksycznych towarzyszących niedokrwieniu OUN. Dotyczy to obrzmienia mitochondriów, kolbek presynaptycznych połączeń akso-somatycznych oraz zmian obrzękowych w płacie nerwowym przysadki. Shigeno i wsp. (1986) sugerują, że przyczyną powstawania wczesnego obrzęku tkanki nerwowej, szczególnie komórek astrogleju, są zaburzenia homeostazy jonowej. Sądzą, że jest to obrzęk cytotoksyczny. Natomiast 7 dni po incydencie śmierci klinicznej nie obserwowano zmian obrzękowych w płacie nerwowym przysadki. Nie stwierdzono również oznak hamowania uwalniania hormonów do krwioobiegu. Można przeto przyjąć, że zaobserwowane zmiany ultrastruk-



turalne w neuronach SO i PV współuczestniczą w ogólnej, chociaż zróżnicowanej odpowiedzi układu nerwowego na niedokrwienie i niedotlenienie wywołane incydem śmierci klinicznej. Poprzednie badania prowadzone bezpośrednio po krótkim (2,5 min) niedokrwieniu wykazały zmiany w neuronach SO i PV. W obrazach ultrastrukturalnych dominowały neurony o cechach wzmożonej aktywności metabolicznej (Gajkowska 1987). W płacie nerwowym przysadki przeważały aksony obfitujące w ziarnistości neurosekrecyjne, aksony zaś o cechach wzmożonego wydzielania ziarnistości neurosekrecyjnych stanowiły zdecydowaną mniejszość (Loesch 1987).

Morfologiczne obserwacje wykazały reakcje układu podwzgórzowo-przysadkowego na niedokrwienie. Jak wiadomo, układ ten jest w znacznej mierze odpowiedzialny za utrzymanie homeostazy wodno-elektrolitowej, a badania tego układu mają istotne znaczenie, ponieważ wykazano, że w trakcie niedokrwienia i w okresie poniedokrwinnym dochodzi do zaburzenia homeostazy wodnoelektrolitowej, powodującego wzrost osmolalności tkanki (Hossmann, Takagi 1976; Bandaranayake i wsp. 1978).

#### EFFECT OF COMPLETE CEREBRAL ISCHEMIA ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSEAL SYSTEM OF THE RAT

##### Summary

Ischemic and postischemic changes appearing in the hypothalamic secretory nuclei — SO and PV and hypophyseal neural lobe of rats which underwent the incident of clinical death were studied. The incident of clinical death was experimentally induced by constriction of the heart vascular bundle according to the method of Korpaczew et al. (1982). Electron-microscopic observations performed 3 hours after ischemia revealed changes in some neurons of both hypothalamic nuclei. The neurons showed ultrastructural features indicating enhanced cellular activity. The pathological changes observed in some neurons consisted of dilatation of singular cisternae of the Golgi complex and channels of granular endoplasmic reticulum and swelling of some mitochondria. Some presynaptic endings of axo-somatic synapses were also swollen. In the hypophyseal neural lobe a characteristic feature consistently observed in rats 3 hours after reanimation was axon enclosure by pituicytes, which indicates a peculiar interaction between pituicytes and neurosecretory axons. Signs of phagocytosis by pituicytes of neurosecretory axons were also observed. These observations may indicate the inhibition of release of neurohormones to the blood circulation. The ultrastructural changes persisted in some neurons 7 days after ischemia, while the majority of neurons had a normal structure. Inspection of the hypophyseal neural lobe did not reveal any signs indicating inhibition of the release of neurohormones to the blood circulation.

#### ВЛИЯНИЕ ПОЛНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНОЙ НЕЙРОСЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ

##### Резюме

Исследовались ишемические и постисшемические изменения в гипоталамо-гипофизарной системе крыс после клинической смерти. Эксперименты проводились методом Корпачева и соавторов (1982). Морфологические наблюдения через 3 часа после реанимации



обнаружили изменения в супраоптическом и перивентрикулярном ядрах. В некоторых нейронах обоих ядер обнаруживались ультраструктурные признаки усиленной метаболической активности в виде расширения некоторых цистерн комплекса Гольджи и шероховатой эндоплазматической сети. Наблюдалось, кроме того, набухание митохондрий и пресинаптических участков в синаптических окончаниях. В нейрогипофизе встречались секреторные аксоны в тесной связи с питуицитами, проявляющими фагоцитарные свойства. Эти изменения могут свидетельствовать о задержке секреции гормонов из гипофиза в кровяное русло.

В наблюдениях, проведенных после 7 дней, отклонений от нормы в ультраструктуре нейронов супраоптического и перивентрикулярного ядер не найдено, а в нейрогипофизе не обнаружено признаков задержки секреции гормонов.

## 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. 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. Boudier J., Boudier J. L., Massacrier A., Cau P., Picard D.: Structural and functional aspects of lysosomes in the neurosecretory neurons. *Biol. Cell.*, 1979, 36, 185–192.
4. Chang A. C., Dellmann H. D.: A fine structural study of the formation of temporary swellings (Herring Bodies) and reversible degeneration of neurosecretory axons following microionotophoretic ejection of vinblastine into hypothalamo-neurohypophysial tract of the Frog (*Rana Pipiens*). *Exp. Brain Res.*, 1984, 53, 357–369.
5. Dellmann H. G.: Degeneration and regeneration of neurosecretory system. *Int. Rev. Cytol.*, 1973, 36, 215–315.
6. Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego i przemijającego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe podwzgórza szczura. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 2, 131–146.
7. 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, 53–53.
8. 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.
9. Hossmann K. A., Takagi S.: Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp. Neurol.*, 1976, 51, 124–131.
10. 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.
11. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17–19 October 1985, Abstr. p. 16.
12. Korpaczew W. G., Łysenkov S. P., Tiel Ł. Z.: Modielirowanie klinicznej smierci i postreanimacjonni bolezni u krys. *Patol. Fizjol. Eksp. Ter.*, 1982, 3, 78–80.
13. Loesch A.: Aksony sekrecyjne przysadki nerwowej szczura po reanimacji w związku z incydemem śmierci klinicznej. *Neuropat. Pol.*, 1987, 2, 147–162.
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. Shigeno T., Hanamura T., Mima T., Kaneko M., Asano T., Takakura K.: Mechanisms of ischemic brain edema: aspects from brain capillary and glial function for ion transport. Abstracts for an Erwin-Riesch Symposium, Institute of Neuropathology, Berlin, September 2–5, 1986, p. 15.



16. Tweedle C. D.: Ultrastructural manifestation of increased hormone release in the neurohypophysis. *Prog. Brain Res.*, 1983, 60, 259–272.
17. Tweedle C. D., Hatton G. I.: Evidence for dynamics interactions between pituicytes and neurosecretory axons in the rat. *Neuroscience*, 1980 a, 5, 661–667.
18. Van Leeuwen F. W., De Vries G. J.: Enkephalin-glia interaction and its consequence for vasopressin and oxytocin release from the rat neural lobe. *Prog. Brain Res.*, 1983, 60, 343–351.
19. Yu M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of the central nervous system after prolonged hypoxia. I. Neuronal alterations. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1972 a, 22, 222–235.
20. 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.)*, 1972 b, 22, 235–244.
21. Zaręba-Kowalska A., Renkawek K., Gajkowska B.: Ultrastructural study of the hypophysial neural lobe of newborn rats in tissue culture. *Cell Tissue Res.*, 1983, 230, 463–468.
22. Zaręba-Kowalska A., Wysmyk-Cybula U.: Activation of GABA-ergic system unaccompanied by marked ultrastructural changes in the hypophysial neural lobe after short-term dehydration. *Neuroendocrinol. Lett.*, 1985, 7, 327–331.

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



GRAŻYNA SZUMAŃSKA, MIROSŁAW J. MOSSAKOWSKI,  
SŁAWOMIR JANUSZEWSKI

## ZMIANY AKTYWNOŚCI FOSFATAZY ZASADOWEJ I CYKLAZY ADENYLOWEJ W SIECI NACZYNIOWEJ MÓZGU W DOŚWIADCZALNYM ZESPOLE POREANIMACYJNYM

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Swoiste właściwości złącza naczyniowo-tkankowego w ośrodkowym układzie nerwowym, określone nazwą bariery krew—mózg, zapewniającej wybiórczość dwukierunkowej wymiany substancji między łożyskiem naczyniowym a tkanką nerwową, związane są z cechami strukturalnymi, czynnościowymi i metabolicznymi naczyń terminalnych. Pod pojęciem tym należy rozumieć zarówno naczynia włosowate, jak i powiązane z nimi odcinki tętniczek i żyłek. Na poziomie tych właśnie naczyń zachodzą intensywne procesy wymiany metabolicznej. W obecnym stanie wiedzy zasadniczą rolę w utrzymaniu mechanizmów bariery krew—mózg przypisuje się śródbłonom terminalnej sieci naczyniowej (Reese, Karnowsky 1967; Bodenheimer, Brightman 1968; Joó 1971). Szczególne znaczenie w tym mechanizmie przypada układom enzymatycznym komórek śródbłonna (Joó 1969; 1971; Oldendorf 1977; Betz, Goldstein 1978; Betz i wsp. 1980; Joó i wsp. 1983; Vorbrod t i wsp. 1983). Spośród nich najczęściej zwraca się uwagę na rolę nieswoistej fosfatazy zasadowej (Samorajski, McCloud 1961), swoistych fosfataz nukleotydowych (Torack, Barnett 1964), a ostatnio również cyklazy adenyłowej (Vorbrod t i wsp. 1981a, 1983, 1984; Szumańska i wsp. 1984). Uważa się, iż fosfataza zasadowa uczestniczy w procesach czynnego transportu przez ścianę naczyniową poprzez defosforylację licznych metabolitów zarówno przechodzących do tkanek ośrodkowego układu nerwowego (Vorbrod t i wsp. 1981a, 1983), jak i je opuszczających (Vorbrod t i wsp. 1985). Cyklaza adenyłowa wiązana do niedawna w układzie nerwowym wyłącznie z procesami neurotransmisji i opisywana w lokalizacji synaptycznej (Rechar dt, Härkönen 1977; Panuła, Rechar dt 1979; Rechar dt, Harvonen 1985, 1986), okazała się stałym składnikiem komórek śródbłonna naczyniowego, odgrywającym istotną funkcję w mechanizmach bariery krew—mózg (Wagner i wsp. 1972; Joó, Toth



1975; Karnushkina i wsp. 1980; Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984). Joó (1979) oraz Joó i wsp. (1983) przypisują jej zasadniczą rolę w regulacji transportu makromolekularnego.

Należy przy tym podkreślić, iż nieprawidłowości w aktywności wszystkich wymienionych wyżej enzymów opisywano w różnorodnych typach doświadczalnej patologii ośrodkowego układu nerwowego nie wyłączając niedokrwienia i niedotlenienia, których wspólną cechą, potwierdzoną różnymi metodami, było zaburzenie czynności bariery krew – mózg (Szumańska i wsp. 1976, 1987; Ostenda i wsp. 1978; Szumańska, Ostenda 1980; Szumańska 1981; Vorbrodt i wsp. 1981b, 1983, 1985; Wiśniewski i wsp. 1983; Szumańska, Mossakowski 1985). Powtarzalność tych nieprawidłowości jest tak duża, iż można je w sposób niewątpliwy traktować jako wykładniki zaburzeń przepuszczalności naczyń ośrodkowego układu nerwowego.

Niedokrwienie mózgu, zarówno globalne, jak i częściowe, bardzo często prowadzi do upośledzenia przepuszczalności naczyń i rozwoju wtórnego w stosunku do niego naczyniopochodnego obrzęku (Klatzo 1975, 1985). Cechą znamioną przy tym jest fakt, iż uszkodzenia mechanizmów barierowych występować mogą w zależności od ciężkości incydentu niedokrwiennego w różnym czasie po jego przebyciu, zgodnie z prawidłowościami zjawiska dojrzewania procesu patologicznego (Klatzo 1975; Fujimoto i wsp. 1976). Warto również podkreślić, że Ostenda i Gadamski (1980) zwrócili uwagę na dwufazowe upośledzenie naczyniowych mechanizmów barierowych u chomików mongolskich w następstwie jednostronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych, występujące w kilka godzin i po kilku dniach od incydentu niedokrwiennego. Identyczne zjawisko obserwowali Kuroisawa i wsp. (1985) w ogniskowym niedokrwieniu mózgu u kotów.

W tym kontekście wydawało się celowe przeprowadzenie oceny aktywności fosfatazy zasadowej (FZ) i cyklazy adenyłowej (AC), traktowanych jako znaczniki stanu przepuszczalności naczyń mózgu w warunkach globalnego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, stanowiącego następstwo doświadczalnie wywołanej śmierci klinicznej.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na dorosłych szczurach, rasy Wistar, samicach, o masie ciała 160–170 g, u których wywoływano śmierć kliniczną według metody opisanej przez Korpaczewa i wsp. (1982). Zwierzętom w płytkiej narkozie eterowej wprowadzono do klatki piersiowej zacisk igłowy, za pomocą którego uciskano pęczek naczyniowy serca na okres 3–3,5 min. W tym czasie następowało pełne zatrzymanie akcji serca i czynności oddechowej. Zabiegi reanimacyjne, polegające na zewnętrznym masażu serca i zastosowaniu kontrolowanego oddechu przy użyciu respiratora dla małych zwierząt laboratoryjnych, podejmowano po 10 min od zatrzymania akcji serca. Prowadziły one do kolejno po sobie następujących: powrotu czynności serca,



akcji oddechowej, reakcji na ból oraz odruchu rogówkowego. Szczegółowe omówienie modelu doświadczalnego oraz jego charakterystykę patofizjologiczną przedstawiono w pracy Mossakowskiego i wsp. (1986). Doświadczenie cechowała wysoka śmiertelność zwierząt. W okresie śmierci klinicznej lub/i w czasie czynności reanimacyjnych ginęło około 50% szczurów. Grupę kontrolną stanowiły zwierzęta poddane krótkotrwałej narkozie eterowej, którym wprowadzano do klatki piersiowej zacisk igłowy bez wywoływania ucisku na pnie naczyniowe serca. Zwierzęta zabijano po upływie 6, 24 godz. i 3 dni po zabiegu doświadczalnym.

Badanie histochemiczne obejmowało ocenę aktywności fosfatazy zasadowej (FZ) i cyklazy adenylowej (AC) w naczyniach ośrodkowego układu nerwowego, przeprowadzoną w mikroskopie świetlnym i elektronowym.

Zwierzęta przeznaczone do oznaczeń aktywności (FZ) uśmiercano przez przezsercową perfuzję roztworem utrwalającym, zawierającym 2% paraformaldehyd i 0,5% aldehyd glutarowy w 0,1 M buforze kakodylanowym, pH 7,4 (22°C). Czas perfuzji wynosił około 20 min, po czym wyjmowano mózgowie z jamy czaszki, przeznaczając jedną półkulę mózgu do badań w mikroskopie świetlnym, drugą – w mikroskopie elektronowym. Do badań w mikroskopie świetlnym pobierano blok tkankowy o grubości około 4 mm, przechodzący przez całą szerokość półkuli na wysokości skrzyżowania wzrokowego. Do badań w mikroskopie elektronowym pobierano bloczki tkankowe o wymiarach około 1 mm<sup>3</sup> z kory mózgu i spoidła wielkiego. Pobrany materiał utrwalono dodatkowo w zimnym (4°C) płynie utrwalającym o podanym powyżej składzie, przez 1 godz. Bloki przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym skrawano na mikrotomie zamrożeniowym na wolnopływające skrawki o grubości 30 μm.

Aktywność FZ wykrywano według metody Mayahara i wsp. (1967) w modyfikacji Vorbrodta i wsp. (1981a). Płyn inkubacyjny zawierał: 0,01 M β-glicerofosforan sodu, 0,1 M Tris-maleinian, 0,004 M siarczan magnezu oraz 0,005 M zasadowy cytrynian ołowiu. Końcowe pH roztworu inkubacyjnego wynosiło 9,2–9,4. Inkubację wolnopływających skrawków i bloczków tkankowych przeprowadzano w temperaturze 37°C przez 45 min. Płyn inkubacyjny dla przeprowadzenia kontroli odczynu histochemicznego zawierał dodatkowo 0,5 mM hydrochlorek lewamisolu, stanowiący swoisty inhibitor FZ (Borgers 1973).

Zwierzęta przeznaczone do oceny aktywności AC dekapitowano. Mózgi wyjmowano natychmiast z jamy czaszki i dzielono je na lodzie na dwie półkule. Z półkuli przeznaczonej do badań w mikroskopie świetlnym pobierano blok tkankowy o grubości około 4 mm, przechodzący przez całą jej szerokość na poziomie skrzyżowania nerwów wzrokowych, zatapiano go w „tissue tek”, zamrażano w suchym lodzie i skrawano w kriostacie na skrawki grubości 20 μm. Z półkuli przeznaczonej do badań w mikroskopie elektronowym, pobierano bloczki tkankowe o wymiarach około 1 mm<sup>3</sup> z kory mózgu i spoidła wielkiego. Skrawki kriostatowe i bloczki tkankowe poddawano następnie



trzem po sobie następującym etapom preparatyki histochemicznej — utrwalaniu, aktywacji enzymatycznej i właściwej inkubacji według metod opisanych przez Szumańską i wsp. (1984) oraz Vorbrodta i wsp. (1984). Zastosowana metoda histochemiczna ujawnia aktywność cyklazy adenylowej w śródbłonkach naczyń, wykazuje ona jedynie w nieznacznym stopniu aktywność enzymu w obszarze połączeń synaptycznych.

Utrwalanie przeprowadzono w świeżo przygotowanym roztworze utrwalającym, który zawierał: 1% paraformaldehyd, 0,1% aldehyd glutarowy w 0,1 M buforze kakodylanowym (pH 7,4), 0,2 M cukrozę, 5% dwumetylosulfotlenek (DMSO), 0,1 mM L-izoproterenol, 0,1 mM kwas askorbinowy oraz 0,1 mM sól sodową guanyloimidodwufosforanu (GMP-PNP). Po utrwaleniu trwającym 3–5 min w temperaturze 22°C skrawki kriostatowe i bloczki tkankowe przenoszono do płynu aktywującego, zawierającego wszystkie z wymienionych wyżej składników, poza aldehydami, rozpuszczone w 0,1 M buforze kakodylanowym (pH 7,4). Proces aktywacji przeprowadzono w temperaturze 22°C, przez 30 min.

Po aktywacji przeprowadzano właściwą inkubację, w temperaturze pokojowej, w czasie 1–3 godz. Płyn inkubacyjny zawierał substrat w postaci 0,5 mM soli sodowej lub litowej 5'-adenyloimidodwufosforanu (AMP-PNP), 5 mM chlorek magnezu, 0,1 mM L-izoproterenol, 0,1 mM kwas askorbinowy, 0,1 mM sól sodową guanyloimidodwufosforanu (GMP-PNP), 5 mM teofilinę, 5% DMSO oraz 10 mM uwodniony chlorek strontu ( $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), rozpuszczone w 0,05 M buforze Tris-HCl o pH 9,0. Końcowe pH płynu inkubacyjnego wynosiło 8,5–8,7.

Do wykazania aktywności AC w obrazach mikroskopowo-elektronowych niezbędna była uzupełniająca preparatyka histochemiczna. Bloczki tkankowe po inkubacji płukano przez 10 min w buforze Tris-HCl (pH 9,0), zawierającym 0,2 M cukrozę, a następnie przenoszono je do 80 mM roztworu cytrynianu ołowiu o pH 9,0 na okres 5 min (powtarzając ten zabieg dwukrotnie), w celu przekształcenia imido-dwufosforanu strontu w imidodwufosforan ołowiu widoczny w obrazach mikroskopowo-elektronowych. Kontrole histochemiczne odczynu ujawniającego aktywność cyklazy adenylowej przeprowadzono w roztworach inkubacyjnych pozbawionych substratu i aktywatorów enzymu.

Końcowe fazy preparatyki histochemicznej były podobne dla obu enzymów. Materiał do badań w mikroskopie świetlnym (skrawki wolnopływające i kriostatowe) przemywano w 0,2 M cukrozie i przenoszono do roztworu żółtego siarczku amonu, płukano w wodzie i zamykano na szkiełkach podstawowych w glicerożelu.

Bloczki tkankowe przeznaczone do badań w mikroskopie elektronowym po inkubacji, przepłukiwano w 0,2 M roztworze cukrozy, a następnie utrwalono je dodatkowo w 1% czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylanowym, pH 7,2. Z kolei kontrastowano je en bloc w 0,5% octanie uranylu przez 1 godz. a następnie odwadniano w roztworach etanolu



o wzrastającym stężeniu i zatapiano w Eponie. Bloczki eponowe skrawano na ultramikrotomie LKB i montowano na siatkach. Materiał oglądano i zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 100Cx.

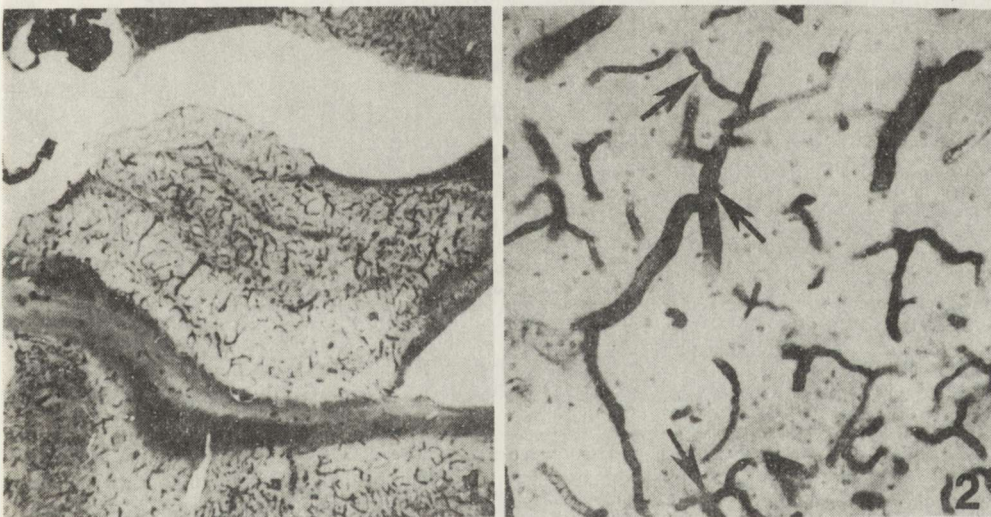
## WYNIKI

### Aktywność fosfatazy zasadowej (FZ)

#### Badania w mikroskopie świetlnym

U zwierząt kontrolnych odczyn histochemiczny wyznaczał wyraźnie sieć naczyniową półkul mózgu, zarówno w strukturach szarych, jak i białych (ryc. 1). Cechą znaną było największe nasilenie odczynu we włosniczkach, malejące wraz z powiększaniem się kalibru naczynia krwionośnego (ryc. 2).

U zwierząt doświadczalnych w 6 godz. po przebytym niedokrwieniu charakter i nasilenie odczynu w większych naczyniach nie zmieniały się w stosunku do stwierdzonych u zwierząt kontrolnych (ryc. 3). Był on natomiast wyraźnie słabszy w sieci naczyń włosowatych (ryc. 3 i 4). W 24 godz. po incydencie niedokrwieniowym odczyn histoenzymatyczny był śladowy zarówno



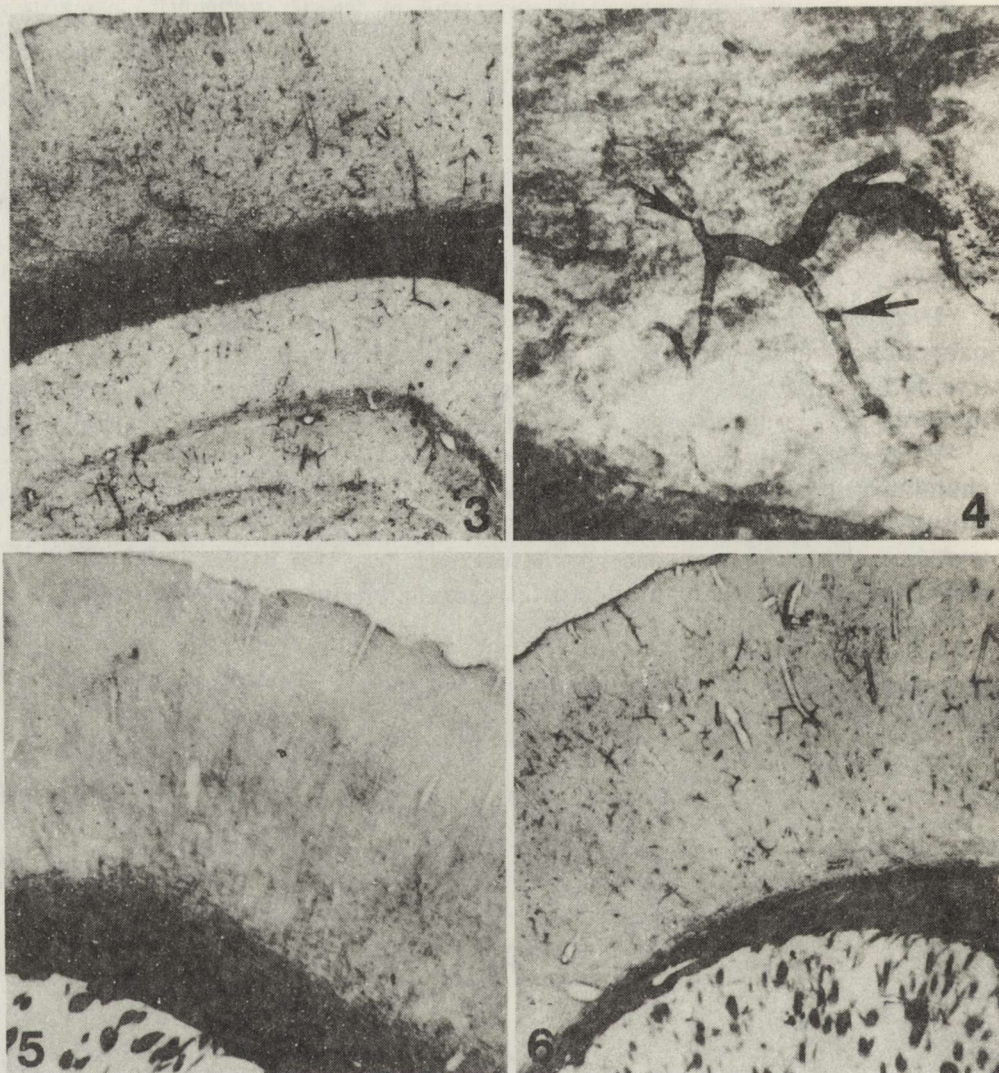
Ryc. 1. Zwierze kontrolne. Fosfataza zasadowa (FZ). Głębokie warstwy kory, spoidło wielkie i zakręt hipokampa. Odczyn enzymatyczny wyznaczający sieć naczyniową mózgu. Pow. 25 ×

Fig. 1. Control animal. Alkaline phosphatase (Alk P) activity in deep cortical layers, white matter and hippocampal gyrus. Strong enzymatic activity marking vascular network of the brain. × 25

Ryc. 2. Zwierze kontrolne. FZ. Kora mózgu. Silny odczyn histochemiczny w naczyniach włosowatych (strzałki), słabnący w miarę wzrostu kalibru naczyń. Pow. 200 ×

Fig. 2. Control animal. AlkP activity in the cerebral cortex. Strong histochemical reaction in capillaries (arrows) decreasing parallelly with an increase of vascular caliber. × 200





Ryc. 3. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrweniu. FZ. Głębokie warstwy kory, spoidło wielkie i zakręt hipokampa. Znaczne osłabienie odczynu histochemicznego dotyczące przede wszystkim naczyń włosowatych. Odczyn enzymatyczny w większych naczyniach przypomina spotykany u zwierząt kontrolnych. Pow. 25 ×

Fig. 3. Experimental animal, 6 hrs after ischemic incident. AlkP activity in deep cortical layers, white matter and hippocampal gyrus. Remarkable reduction of the intensity of histochemical reaction concerning mostly capillary vessels. Reaction in larger blood vessels similar to that in control animals. × 25

Ryc. 4. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrweniu. FZ. Kora mózgu. Spadek aktywności enzymatycznej w sieci naczyń włosowatych (strzałki). Pow. 200 ×

Fig. 4. Experimental animal, 6 hrs after ischemic incident. AlkP activity in the cerebral cortex. Reduction of enzymatic activity in capillary network (arrows). × 200

Ryc. 5. Zwierze doświadczalne, 24 godz. po niedokrweniu. FZ. Kora mózgu. Niemal całkowity brak aktywności enzymatycznej w sieci naczyniowej mózgu. Pow. 25 ×



w większych naczyniach, jak i we włosniczkach (rys. 5). Po upływie 3 dni odczyn histochemiczny wzrastał w porównaniu z wcześniejszymi grupami doświadczalnymi. Cechą charakterystyczną wyróżniającą go w porównaniu do odczynu u zwierząt kontrolnych było jego znaczne zróżnicowanie. Obok naczyń włosowatych, w których nasilenie reakcji histochemicznej nie różniło się od typowego dla zwierząt kontrolnych, występowały włosniczki, a nawet ich odcinki, z odczynem bardzo słabym, a nawet śladowym (ryc. 6).

#### *Badanie w mikroskopie elektronowym*

U zwierząt kontrolnych odczyn histoenzymatyczny występował w ścianach naczyń różnego kalibru, wykazując w sposób typowy największe nasilenie w naczyniach włosowatych. Końcowy produkt odczynu występujący w postaci drobnych, elektronowo-gęstych, nieregularnych ziarnistości gromadził się na zwróconej do światła naczynia włosowatego powierzchni błony cytoplazmatycznej komórek śródbłonka (ryc. 7).

U zwierząt doświadczalnych, które przeżyły 6 godz. po przebytej śmierci klinicznej, produkt reakcji enzymatycznej gromadził się zarówno na luminalnej, jak i abluminalnej powierzchni błony cytoplazmatycznej komórek śródbłonka naczyń włosowatych (ryc. 8), a niekiedy był widoczny również w ich błonach podstawnych. Zwracało uwagę znaczne zróżnicowanie rozmieszczenia produktu końcowego odczynu w poszczególnych naczyniach. W niektórych włosniczkach ziarniste złogi były nieregularnie rozproszone na luminalnej powierzchni błony cytoplazmatycznej śródbłonka w miejscach jej wpukleń (inwaginacji) o różnej głębokości (ryc. 9). Obrazy takie sugerowały możliwość przemieszczania się cząsteczek enzymu z błony luminalnej w kierunku abluminalnej powierzchni komórki. W przypadkach tych spotykano również nieznaczne nagromadzenia produktu reakcji enzymatycznej w strukturach kanaliko-podobnych położonych w cytoplazmie śródbłonek (ryc. 9). W innych naczyniach włosowatych reakcja enzymatyczna ograniczona była do niewielkich odcinków błony podstawnej, podczas gdy komórki śródbłonka były jej całkowicie pozbawione (ryc. 10). W licznych naczyniach, w tym również włosowatych, nie stwierdzono w ogóle odczynu histoenzymatycznego. Należy dodać, iż w ocenianym okresie naczynia włosowate charak-

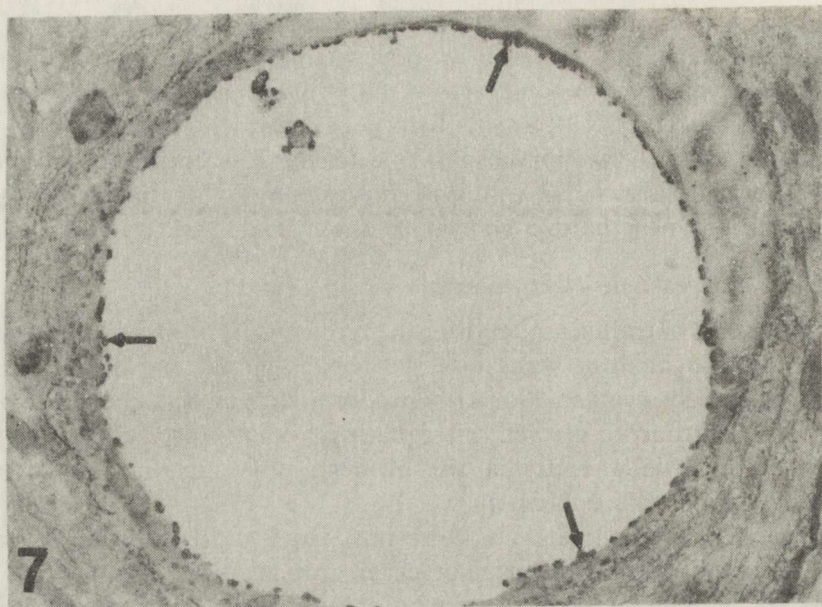
---

*Fig. 5.* Experimental animal, 24 h following cardiac arrest. AlkP activity in the cerebral cortex. Almost total absence of histochemical reaction in the cerebral vascular network.  $\times 25$

*Ryc. 6.* Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. FZ. Odczyn histoenzymatyczny znacznie wyraźniejszy niż w poprzedniej grupie czasowej (patrz ryc. 5) wyznacza nieregularnie sieć naczyńową kory mózgu. Zwraca uwagę nierównomierny rozkład produktu reakcji na przebiegu naczyń. Pow.  $25 \times$

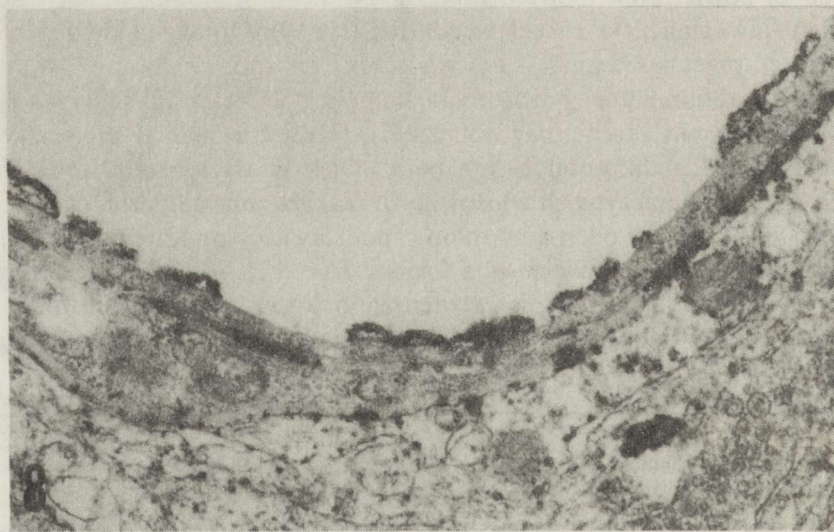
*Fig. 6.* Experimental animal, 3 days after ischemic incident. AlkP activity in the cerebral cortex and white matter. Histochemical reaction much stronger than in previous experimental group (compare Fig. 5) marking irregularly cortical vessels. Note unequal distribution of the reaction end product along the course of vessels.  $\times 25$





Ryc. 7. Zwierze kontrolne. FZ. Kora mózgu. Złogi produktu odczynu histochemicznego umiejscowione są na luminalnej błonie komórek śródbłónka (strzałki). Pow. 3440 ×

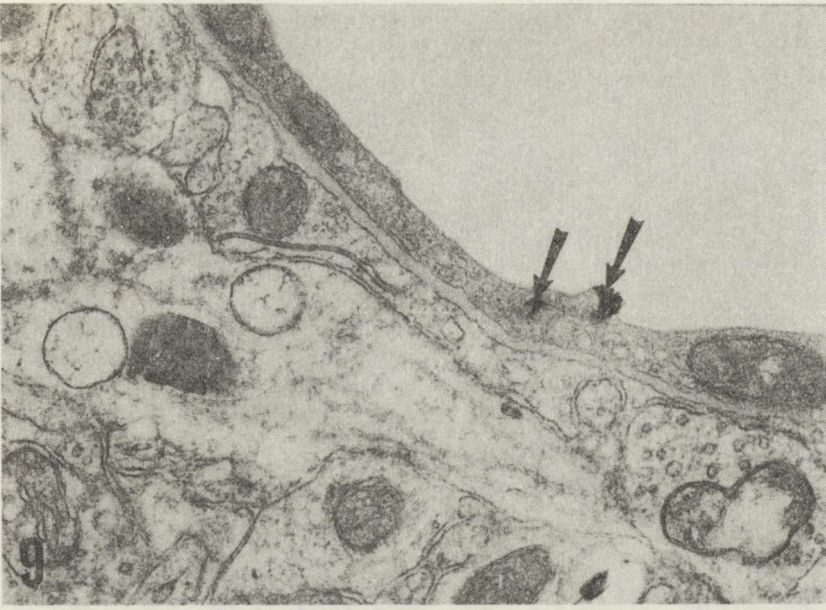
Fig. 7. Control animal. AlkP activity in the cerebral cortex. Products of histochemical reaction accumulated in the luminal surface of endothelial cells (arrows). × 3440



Ryc. 8. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. FZ. Złogi produktu reakcji enzymatycznej zlokalizowanej zarówno na luminalnej, jak i abluminalnej błonie komórek śródbłónka oraz w niektórych odcinkach błony podstawnej. Pow. 22140 ×

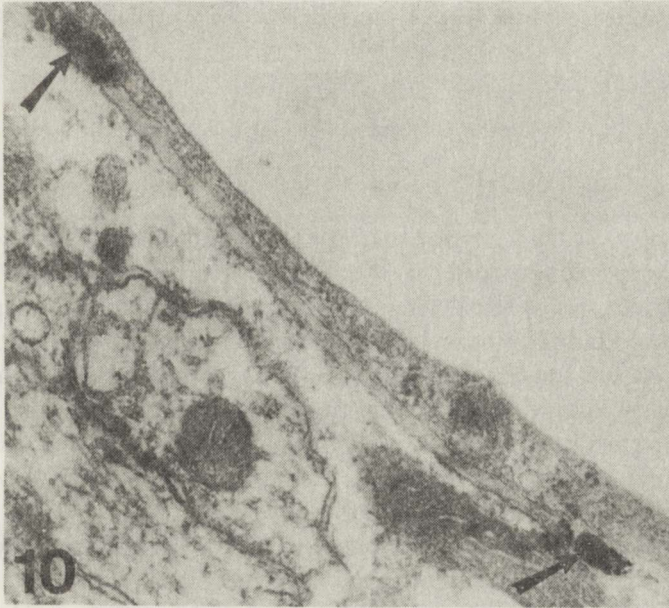
Fig. 8. Experimental animal, 6 h following ischemic incident. AlkP activity. Products of histochemical reaction accumulated on both luminal and abluminal membranes of endothelial cells as well as in some parts of basal membranes. × 22140





Ryc. 9. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. FZ. Kora mózgu. Elektronowo gęste skąpe ziarnistości produktu reakcji enzymatycznej zlokalizowane na wpukleniu błony luminalnej śródbłonna oraz w strukturze kanaliko-podobnej (strzałki). Pow. 22140 ×

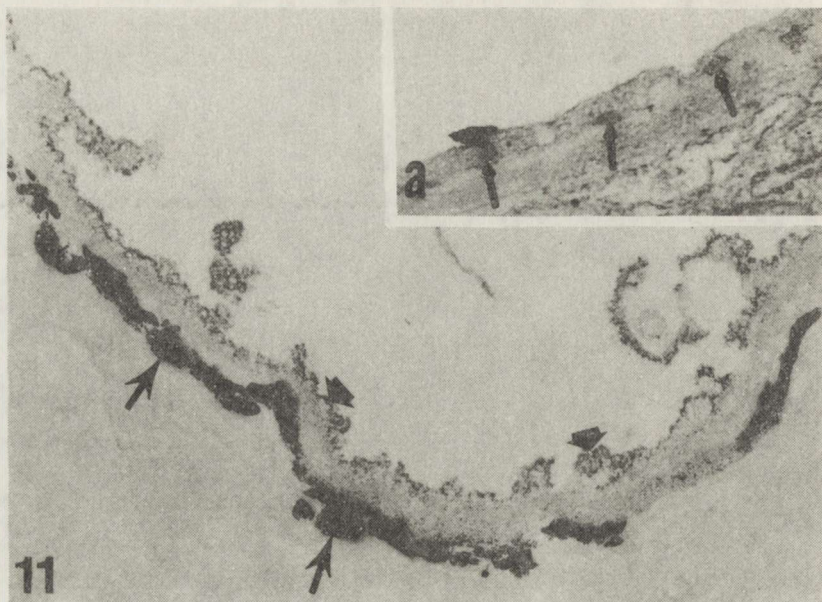
Fig. 9. Experimental animal, 6 h following ischemic incident. AlkP activity. Electron dense, scanty deposits of histochemical reaction aggregated within invagination of luminal endothelial membrane and in canalicular structures within endothelial cytoplasm (arrows). ×22140



Ryc. 10. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. Odczyn histochemiczny ujawniający aktywność FZ widoczny wyłącznie w „aktywnych odcinkach” strzałki błony podstawnej naczynia włosowatego. Pow. 32000 ×

Fig. 10. Experimental animal, 6 h following ischemic incident. Histochemical reaction of AlkP seen exclusively in “active” fragments (arrows) of capillary basal membrane. ×32000





Ryc. 11. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. Silna aktywność FZ zlokalizowana w błonie podstawnej i na abluminalnej powierzchni komórek śródbłonka (strzałka). Znacznie słabszy odczyn enzymatyczny w jego błonie luminalnej (groty strzałek). Pow. 32000  $\times$ .

Fig. 11. Experimental animal, 3 days after ischemic incident. Strong histochemical reaction of alkP localized mostly in the basal membrane and abluminal surface of endothelial cells (arrows). Histochemical reaction on the luminal site of capillary endothelium much less intense (arrow heads).  $\times 32000$

Ryc. 11a. Aktywność FZ w pęcherzykach pinocytarnych komórek śródbłonka (strzałki). Pow. 32000  $\times$

Fig. 11a. AlkP, activity in the pinocytotic vesicles of endothelial cells (arrows).  $\times 32000$

teryzowały się dość znacznym obrzmieniem śródbłonek oraz poszerzeniem złączy międzyśródbłonkowych.

W 24 godz. po niedokrwieniu w większości naczyń mózgowych nie stwierdzono wykładników aktywności enzymatycznej FZ. W niektórych włosniczkach występowało jedynie odcinkowe nagromadzenie produktu końcowego reakcji wyłącznie w ich błonie podstawnej, naczynia włosowate w tym okresie charakteryzowały się obfitym nagromadzeniem pęcherzyków pinocytarnych w cytoplazmie obrzmiałych komórek śródbłonka oraz znacznym poszerzeniem przestrzeni międzyśródbłonkowych.

Grupę zwierząt z 3-dniowym przeżyciem po przebytych incydencie niedokrwienym charakteryzowało bardzo znaczne zróżnicowanie wzorca aktywności fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu, przy ogólnie bardziej nasilonym odczynie histoenzymatycznym w porównaniu z wcześniejszymi okresami po niedokrwieniu. W bardzo licznych naczyniach, stwierdzano obfite nagromadzenie złożeń produktu końcowego odczynu, w błonie podstawnej

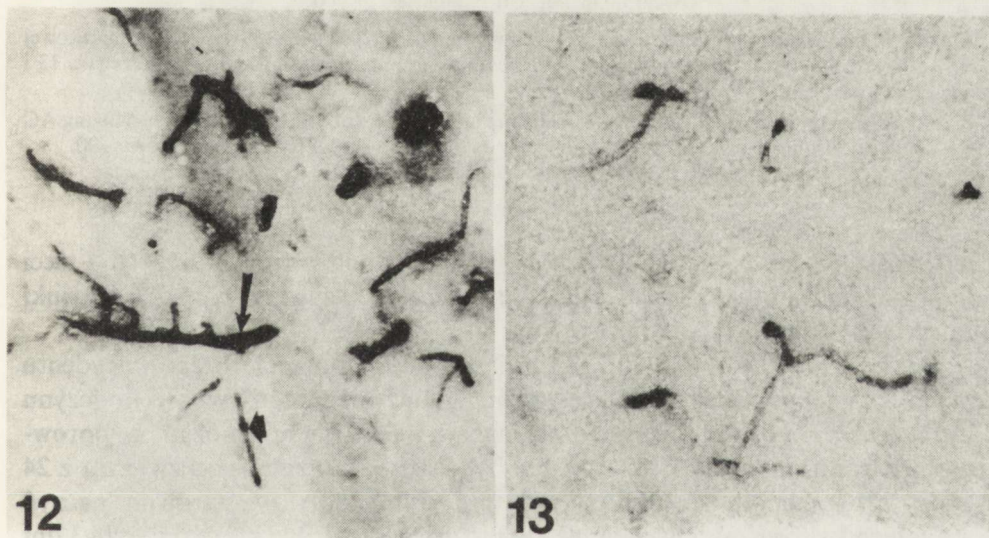


i przylegającej do niej abluminalnej błonie cytoplazmatycznej śródbłonek. Stwierdzono znacznie mniejsze nasilenie reakcji na ich powierzchni luminalnej (ryc. 11). Niekiedy natomiast aktywność enzymatyczna błony cytoplazmatycznej śródbłonek, zwróconej do światła naczynia, dorównywała nasileniem reakcji występującej w strukturach abluminalnych. Dość często spotykano przekroje naczyń, w których aktywność FZ występowała w pęcherzykach pinocytarnych i kanaliko-podobnych strukturach cytoplazmy śródbłonek (ryc. 11a) oraz na obu powierzchniach – luminalnej i abluminalnej błony cytoplazmatycznej. Równocześnie nierzadko spotykano naczynia nie wykazujące zupełnie odczynu enzymatycznego.

### Aktywność cykazy adenyłowej (AC)

#### Badanie w mikroskopie świetlnym

U zwierząt kontrolnych wysoka aktywność AC występowała zarówno w splotach naczyniówkowych, jak i w sieci naczyniowej mózgu. W przeciwieństwie do FZ, odczyn histoenzymatyczny wydawał się bardziej nasilony w naczyniach większego kalibru, niż we włosniczkach (ryc. 12). Nie stwierdzano



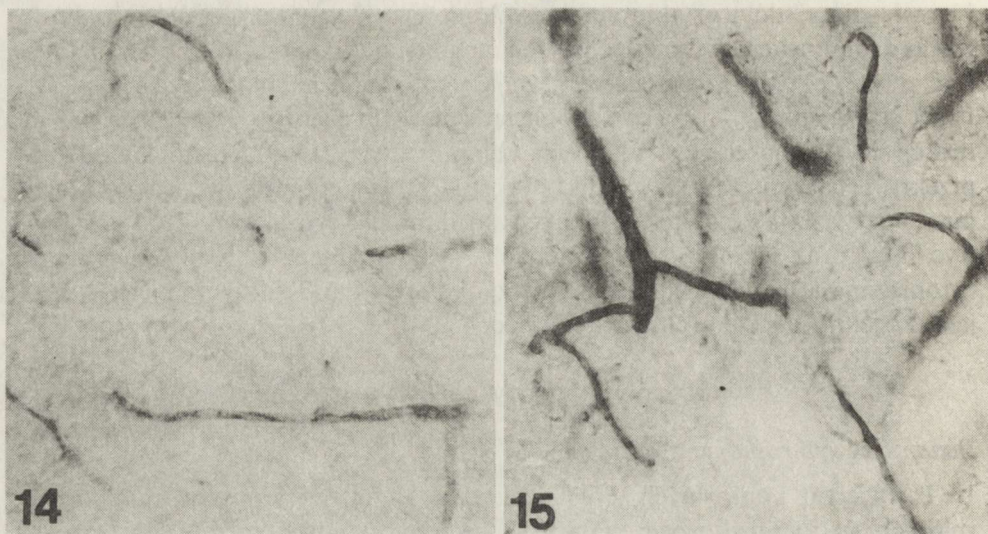
Ryc. 12. Zwierze kontrolne. Silny odczyn histoenzymatyczny ujawniający aktywność cykazy adenyłowej (AC) w sieci naczyniowej kory mózgu. Aktywność enzymu jest wyższa w naczyniach większych (strzałka) niż we włosniczkach (grot strzałki). Pow. 200 ×

Fig. 12. Control animal. Adenylate cyclase (AC) activity in the vascular network of the cerebral cortex. Enzymatic activity stronger in larger vessels (arrow) than in capillaries (arrow head). × 200

Ryc. 13. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. Słabszy odczyn aktywności AC w sieci włosniczkowej kory mózgu. Pow. 200 ×

Fig. 13. Experimental animal, 6 h after ischemic incident. AC activity. Weak histochemical reaction in cortical capillaries. × 200





Ryc. 14. Zwierze doświadczalne, 24 godz. po niedokrwieniu. Bardzo słaby odczyn ujawniający aktywność AC w naczyniach mózgu. Pow. 200 ×

Fig. 14. Experimental animal, 24 h after ischemic incident. AC activity. Residual histoenzymatic reaction in cortical capillaries. × 200

Ryc. 15. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. Aktywność AC w sieci włosniczkowej mózgu wyraźnie wyższa w porównaniu z poprzednimi grupami doświadczalnymi (patrz ryc. 13 i 14). Pow. 200 ×

Fig. 15. Experimental animal, 3 days after ischemic incident. Histochemical reaction visualizing AC activity stronger than in previous experimental group (see Figs. 13 and 14). × 200

natomiast różnic w nasileniu reakcji w naczyniach formacji szarych i sieci naczyniowej istoty białej. Dodatni odczyn wykazywały również krwinki zawarte w świetle naczyń.

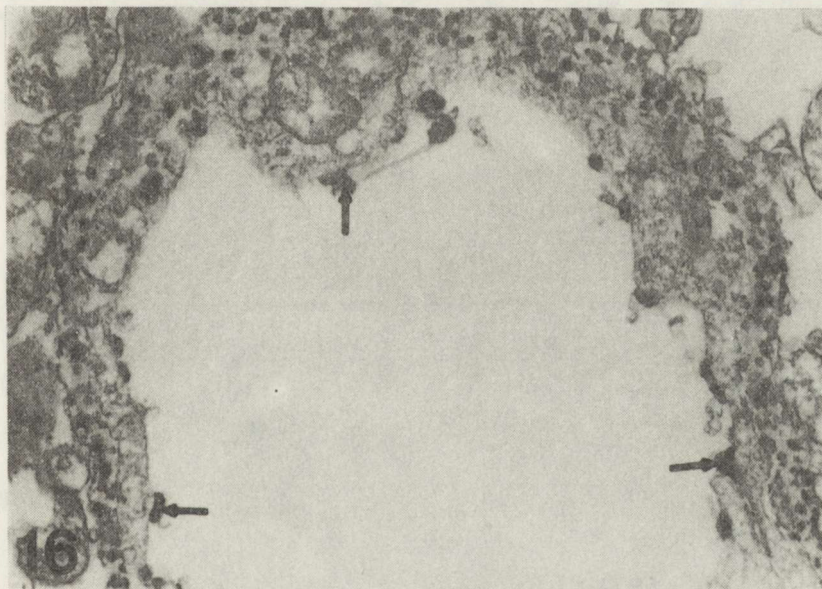
U zwierząt badanych po upływie 6 godz. od przebytego incydentu niedokrwienego stwierdzono wyraźne obniżenie intensywności odczynu histochemicznego, zwłaszcza w sieci naczyń włosowatych mózgu, w porównaniu z kontrolą (ryc. 13). Spadek ten był jeszcze wyraźniejszy u zwierząt z 24 godz. przeżyciem po niedokrwieniu (ryc. 14) i dotyczył zarówno naczyń większego kalibru, jak i włosniczek. W mózgach szczurów, które przeżyły 3 dni po przebytej śmierci klinicznej stwierdzano natomiast wyraźny wzrost aktywności enzymatycznej w porównaniu do obu wcześniejszych grup doświadczalnych (ryc. 15). Sieć naczyń włosowatych mózgu charakteryzowała się przy tym bardzo znacznym zróżnicowaniem intensywności odczynu histochemicznego. W niektórych naczyniach aktywność AC nie różniła się od stwierdzanej u zwierząt kontrolnych, podczas gdy w innych położonych w tej samej warstwie kory mózgu, była ona jedynie śladowa lub całkowicie nieobecna.



*Badanie w mikroskopie elektronowym*

Naczynia mózgu u zwierząt kontrolnych, zgodnie z poprzednimi obserwacjami (Vorbrot i wsp. 1984), wykazywały dwa wzorce rozmieszczenia produktu reakcji enzymatycznej. Pierwszy, typowy dla mniejszych naczyń, przede wszystkim włośniczek, charakteryzował się obecnością złogów produktu końcowego reakcji umiejscowionych głównie na luminalnej powierzchni błon cytoplazmatycznych komórek śródbłonna. Typ drugi, występujący przeważnie w naczyniach większych, głównie arterioliach, znamionowało gromadzenie się optycznie gęstych ziarnistości produktu końcowego na obu błonach śródbłonków – luminalnej i abluminalnej (ryc. 16). Należy przy tym podkreślić, iż w mózgu zwierząt kontrolnych wiele naczyń lub ich pewne odcinki nie wykazywały w ogóle aktywności AC, niekiedy spostrzegano natomiast słabo zaznaczone obszary aktywności enzymatycznej w złączach synaptycznych.

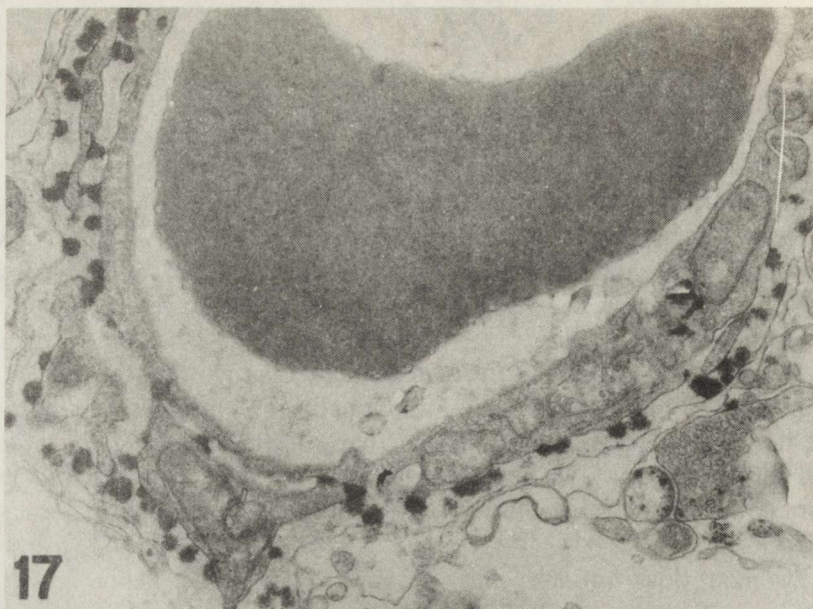
U zwierząt doświadczalnych w 6 godz. po niedokrwieniu występował wyraźny spadek aktywności AC w ścianach większości naczyń. Wyrażało się to zarówno zmniejszeniem ilości ziarnistego produktu końcowego reakcji enzymatycznej, jak i ograniczeniem jego obecności wyłącznie do abluminalnej



Ryc. 16. Zwierze kontrolne. Kora mózgu. AC. Produkt końcowy reakcji histochemicznej zlokalizowany zarówno na luminalnej (strzałki), jak i abluminalnej (groty strzałek) powierzchni śródbłonna. Pow. 40000 ×

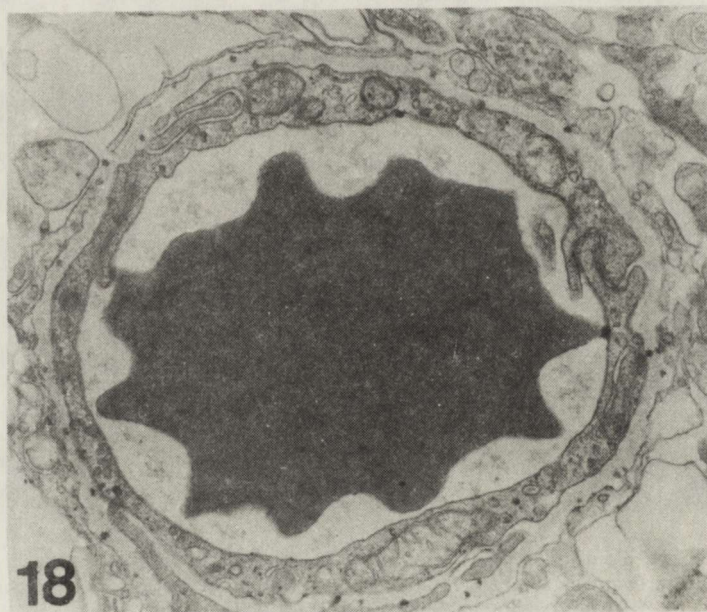
Fig. 16. Control animal. AC activity in the cerebral cortex. End product of histochemical reaction localized both on luminal (arrows) and abluminal (arrow heads) membranes of endothelial cells. × 40000





Ryc. 17. Zwierze doświadczalne, 6 godz. po niedokrwieniu. Kora mózgu. AC. Produkt końcowy reakcji enzymatycznej umiejscowiony jest wyłącznie w błonie abluminalnej komórek śródbłonna.  
Pow. 3440 ×

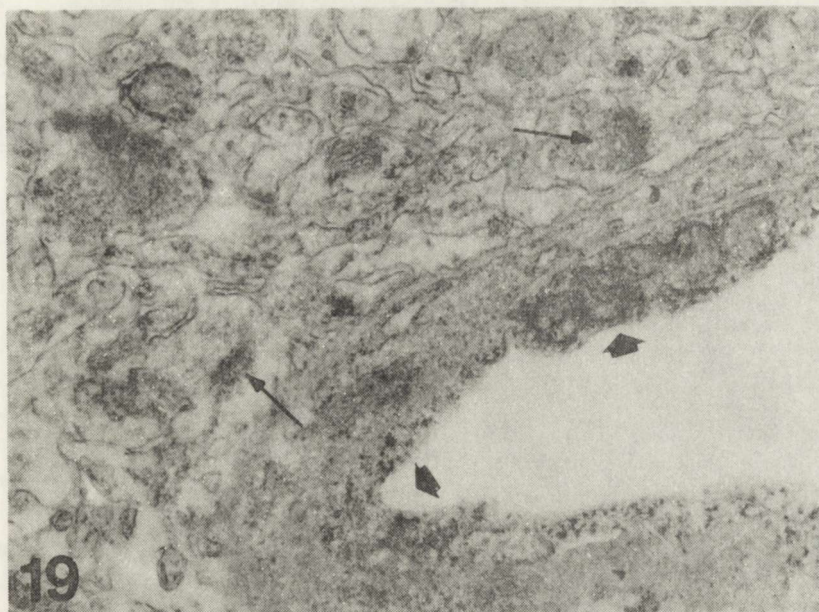
Fig. 17. Experimental animal, 6 h after ischemic incident. AC activity. End product of histochemical reaction localized exclusively on abluminal endothelial membrane. × 3440



Ryc. 18. Zwierze doświadczalne, 24 godz. po niedokrwieniu. Śladowa aktywność AC w ścianie naczyń mózgu. Pow. 3440 ×

Fig. 18. Experimental animal, 24 h after ischemic incident. Residual histochemical reaction visualizing AC activity in the walls of cortical vessels. × 3440





Ryc. 19. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. Elektronowo gęste złoży produktu końcowego reakcji enzymatycznej wskazujące na aktywność AC umiejscowione są w cytoplazmie obrzmiałych komórek śródbłonna, głównie w ich części luminalnej (groty strzałek). Słaba aktywność AC widoczna również w rejonie synaps (strzałki). Pow. 3440 ×

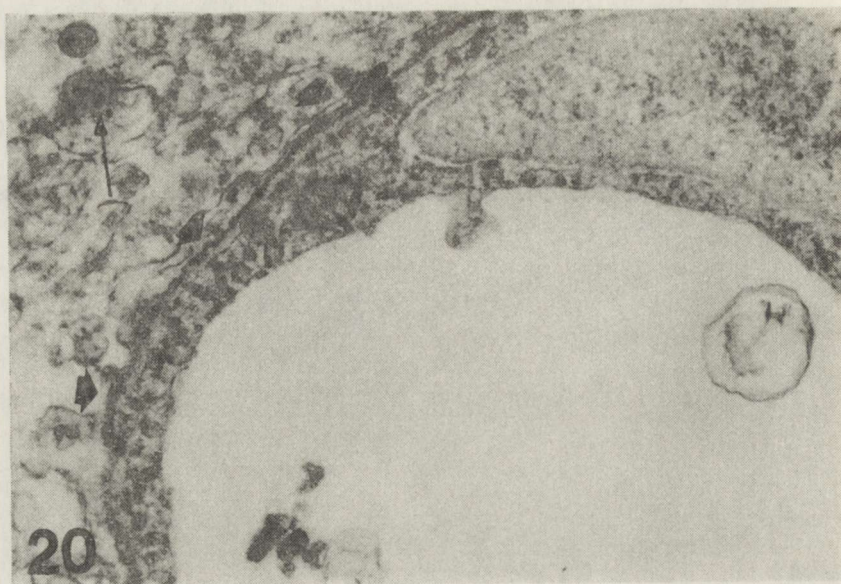
Fig. 19. Experimental animal, 3 days after ischemic incident. AC activity. Electron dense fine aggregates of end product of enzymatic reaction are localized in the luminal portion of swollen endothelial cells (arrow heads), some enzymatic activity seen in the synaptic contacts (arrows). × 3440

powierzchni komórek śródbłonna (ryc. 17). Na licznych przekrojach naczyń stwierdzano również skupienie optycznie gęstych ziarnistości w błonie podstawnej naczyń. Opisanym obrazom histochemicznym towarzyszyło obrzmienie śródbłonnków oraz nagromadzenie w ich cytoplazmie licznych pęcherzyków pinocytarnych. Nierzadko występowały pęcherzyki opłaszczone. W obu typach pęcherzyków nie stwierdzono gromadzenia się produktów odczynu histochemicznego.

Grupę zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem po niedokrwieniu znamionowało dalsze obniżenie aktywności enzymatycznej w naczyniach krwionośnych mózgu, w tym przede wszystkim w naczyniach włosowatych. Niekiedy tylko obserwowano śladowy odczyn histochemiczny (ryc. 18), częściej nie stwierdzano go w ogóle.

Po upływie 3 dni od niedokrwienia aktywność AC wzrastała bardzo znacznie w porównaniu z wcześniejszymi okresami obserwacji. Elektronowo-gęste, ziarniste złoży produktu końcowego reakcji gromadziły się głównie w cytoplazmie obrzmiałych komórek śródbłonna, przede wszystkim w jej części skierowanej do światła naczynia (ryc. 19). Błona luminalna śródbłonnków





Ryc. 20. Zwierze doświadczalne, 3 dni po niedokrwieniu. AC. Aktywność enzymatyczna umiejscowiona w wypustkach mięśniówki gładkiej, przylegających do błony podstawnej (groty strzałek), oraz w rejonie synaps (strzałki). Pow. 32000 ×

Fig. 20. Experimental animal, 3 days after ischemic episode, AC activity. Histochemical reaction localized in processes of smooth muscle fibres (arrow heads) and in synaptic contacts (arrows). × 32000

pozbawiona była na ogół produktu reakcji enzymatycznej. Niekiedy natomiast występował on w wypustkach komórek mięśni gładkich, przylegających do błony podstawnej naczyń (ryc. 20). Należy podkreślić, iż w obrzniętych komórkach śródbłonna, w licznych naczyniach włosowatych nie stwierdzano śladowej nawet aktywności enzymatycznej. Przestrzenie międzysródbłonkowe tych naczyń były znacznie poszerzone.

Na uwagę zasługuje również fakt, iż w mózгах zwierząt, które przeżyły 3 dni po przebytej śmierci klinicznej obserwowano śladową aktywność cykazy adenylowej w zakończeniach synaptycznych (ryc. 19, 20). Jej obecność była zjawiskiem stałym u zwierząt kontrolnych. Utrzymywała się ona nadal w 6 godz. po śmierci klinicznej. Nie stwierdzano jej natomiast u zwierząt z 24-godzinnym przeżyciem po niedokrwieniu.

#### OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują, że głębokie niedokrwienie mózgu związane z 10-minutową śmiercią kliniczną prowadzi do zaburzeń aktywności obu badanych enzymów, wyrażających się w obrazie histochemicznym zmniejszeniem intensywności odczynu, aż do jego całkowitego zaniku oraz nieprawidłową



dystrybucją jego produktu końcowego. Zmiany dotyczące aktywności zarówno FZ, jak i AC, charakteryzowały się podobnym wzorcem histochemicznym i dynamiką w poszczególnych fazach po przebytych incydencie niedokrwieniowym. Towarzyszyły one uchwytnym w obrazie mikroskopowo-elektronowym nieprawidłowościom strukturalnym ściany naczyń włosowatych, wyrażającym się obrzmieniem komórek śródbłonka, zwiększeniem liczby pęcherzyków pinocytarnych oraz wyraźnym poszerzeniem złączy międzyśródbłonkowych. Brak badań mikroskopowo-elektronowych z użyciem peroksydazy chrzanowej nie pozwala na jednoznaczną ocenę stanu zespołów ścisłych. Dominujące w obrazie mikroskopowo-elektronowym przemieszczenie produktu końcowego odczynu z powierzchni luminalnej komórek śródbłonka na ich powierzchnię abluminalną może być uznane za wykładnik zaburzenia czynnościowej polarności, charakterystycznej dla komórek, w których zachodzą procesy czynnego transportu (Betz, Goldstein 1978; Betz i wsp. 1980; Vorbrodt i wsp. 1983).

Fosfataza zasadowa uznana za enzym uczestniczący w aktywnym transporcie poprzez aktywację lub inaktywację różnych enzymów komórkowych na drodze ich defosforylacji, lub wprost defosforylacji transportowanych substratów (Goldstein, Harris 1981), wykazuje w warunkach prawidłowych silną aktywność zlokalizowaną w luminalnej plazmolemie śródbłonnków wszystkich naczyń ośrodkowego układu nerwowego, wyposażonych w mechanizmy barierowe. W następstwie 10-minutowego niedokrwienia dochodziło do postępującego spadku jej aktywności w większości naczyń włosowatych, wyrażającego się w 24 godz. po przebytej śmierci klinicznej niemal całkowitym brakiem odczynu histochemicznego. Wprawdzie pojawiał się on ponownie w stosunkowo wysokim nasileniu po upływie 3 dni, nie osiągając jednakże intensywności typowej dla warunków prawidłowych, a co ważniejsze nie normalizowała się jego dystrybucja komórkowa. Na podkreślenie zasługuje przy tym dynamika jej zaburzeń. W 6 godz. po niedokrwieniu produkty aktywności enzymatycznej obserwowano zarówno w luminalnej, jak i abluminalnej plazmolemie śródbłonnków, a także w błonie podstawnej niektórych włosniczek. Cechą znamioną tej fazy poischemicznej była bardzo znaczna nieregularność rozmieszczenia produktów odczynu. W tym też okresie występowały one w inwaginacjach luminalnej plazmolemy oraz w ujawniających się wówczas cytoplazmatycznych strukturach kanaliko-podobnych. Obrazy te w kontekście pojawiania się aktywności w abluminalnej plazmolemie i w błonie podstawnej mogą sugerować transcytoplazmatyczne przemieszczanie się enzymu. Za taką interpretacją zjawiska opowiadają się między innymi Vorbrodt i wsp. (1981a). W 24 godz. po niedokrwieniu, na tle na ogół negatywnego odczynu ujawniającego aktywność FZ, nieliczne naczynia wykazujące jego obecność gromadziły produkty końcowe reakcji na abluminalnej powierzchni śródbłonka. Restytucja aktywności enzymatycznej, obserwowana w 3 dniu w niewielkim tylko stopniu dotyczyła powierzchni komórek zwróconych do światła naczyniowego. Przeważał odczyn w błonie podstawnej



i skierowanej do niej powierzchni komórek śródbłonka. W tym też biegunie ich cytoplazmy gromadziły się przede wszystkim stosunkowo nieliczne pęcherzyki wypełnione ziarnistym produktem odczynu histochemicznego. Większość bowiem licznych pęcherzyków śródplazmatycznych nie wykazywała aktywności enzymatycznej. Spostrzegano ją natomiast w strukturach kanalikopodobnych. Obraz histochemiczny występujący w 3 dniu po niedokrwieniu stanowił niejako odwrotność tego, co spostrzegano w 6 godz. i przypominał zmiany opisane przez Vorbrodta i wsp. (1985) w okresie rezolucji obrzęku mózgu. Analogiczne do opisanych przez nas zmiany aktywności FZ występowały również w innych typach doświadczalnej patologii mózgu, których wspólną cechą były uszkodzenia bariery krew – mózg (Vorbrodt i wsp. 1981a, b; 1983; Wiśniewski i wsp. 1983). Towarzyszące nieprawidłowościom histochemicznym pojawianie się struktur kanalikopodobnych w cytoplazmie śródbłonek obserwowane było również przez innych autorów i traktowane jako jeden z morfologicznych wykładników zaburzenia naczyniowych mechanizmów barierowych (Simionescu i wsp. 1978; Lossinsky i wsp. 1981; Lossinsky, Wiśniewski 1986). Uważa się, iż stanowią one drogę transportu płynu z krwi do tkanki, a być może i w odwrotnym kierunku – z obrzękłej tkanki do światła naczyń.

Na marginesie tych spostrzeżeń warto odnotować, iż we wcześniejszym cyklu prac, poświęconych aktywności swoistych fosfotaz nukleotydowych w sieci naczyniowej mózgu w różnych typach niedostatku tlenowego z zespołami niedokrwieniami włącznie, stwierdzono również szereg nieprawidłowości wskazujących na upośledzenie funkcji transportowych w złączy naczyniowo-tkankowym (Szumańska i wsp. 1976; Ostenda i wsp. 1978; Szumańska, Ostenda 1980; Szumańska 1981). Ich cechą charakterystyczną było zróżnicowanie wzorca nieprawidłowości histoenzymatycznych, ich topografii i dystrybucji w poszczególnych elementach strukturalnych naczyń i otaczających je wypustkach astrocytarnych, a także w dynamice narastania i cofania się zmian w zależności od stosowanego modelu doświadczalnego i występujących w nim uszkodzeń tkankowych. Podstawowym czynnikiem różnicującym był charakter rozwijającego się obrzęku – cytotoksycznego lub naczyniopochodnego. Wydaje się to oczywiste w świetle zasadniczej różnicy ich mechanizmu patogenetycznego – braku zmian czynności transportowej naczyń w pierwszym oraz ich obecności w drugim (Klatzo 1967). Wspomniana uprzednio różnorodność zmian obrazu histochemicznego mogła stanowić odbicie faktu, iż w większości sytuacji doświadczalnych oba mechanizmy patogenetyczne obrzęku mózgu wzajemnie się na siebie nakładają. Dotyczy to zwłaszcza stanów niedostatku tlenowego (Klatzo 1985).

Drugi z badanych enzymów – cyklaza adenylowa – w warunkach prawidłowych charakteryzuje się zróżnicowaną lokalizacją aktywności w zależności od kalibru naczynia (Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984). W naczyniach włosowatych końcowy produkt reakcji enzymatycznej związany jest z luminalną plazmolemmą śródbłonek, z obecnymi na jej po-



wierzchni inwaginacjami oraz z pęcherzykami zawartymi w ich cytoplazmie. W drobnych tętniczkach natomiast gromadzi się on na powierzchni abluminalnej komórek śródbłonka, w błonie podstawnej oraz na błonach zwróconych do niej wypustek mięśniówki gładkiej. Przebyte niedokrwienie prowadziło do pogłębiającego się w czasie obniżenia aktywności enzymatycznej, aż do śladowej w 24 godz. po śmierci klinicznej oraz do znacznych, nie normalizujących się do 3 dnia nieprawidłowości w rozmieszczeniu produktów reakcji histochemicznej w ścianie naczyń, mimo wyraźnego w tym okresie zwiększenia jej nasilenia. Wzorzec zaburzeń odczynu był w zasadniczych zarysach zbliżony do stwierdzonego w przypadku FZ. Przy bardzo znacznym nagromadzeniu pęcherzyków pinocytarnych w cytoplazmie komórek śródbłonkowych, w żadnym okresie po niedokrwieniu nie stwierdzono gromadzenia się w nich produktu reakcji histoenzymatycznej.

AC jest integralnym składnikiem błon komórek śródbłonka (Wagner i wsp. 1972), spełniającym zasadniczą rolę w czynnym transporcie metabolitów z krwi do tkanek ośrodkowego układu nerwowego (Dux i wsp. 1984; Joó 1985). Przypisuje się jej między innymi szczególne znaczenie w regulacji pęcherzykowego transportu substancji makromolekularnych (Joó 1971), który stanowi alternatywną w stosunku do przestrzeni międzyśródbłonkowych drogę przechodzenia białek surowicy krwi do tkanek ośrodkowego układu nerwowego, występującego w warunkach zaburzenia przepuszczalności naczyń, a w niewielkim stopniu również w naczyniach prawidłowych (Joó 1971; Beggs, Waggener 1976).

Dux i wsp. (1984) wykazali, iż w stanach niedotlenienia, prowadzącego do wzrostu aktywności pinocytarnej w komórkach śródbłonka i zaburzeń przepuszczalności naczyń, występuje podwyższenie aktywności AC. Nasze spostrzeżenia różnią się w sposób zasadniczy. Pomimo niewątpliwego zwiększenia liczby pęcherzyków pinocytarnych w śródbłonkach naczyniowych oraz stwierdzonej metodami immunochemicznymi ekstrakcji białek surowicy krwi do tkanek (Mossakowski, Krajewski 1987) w żadnym okresie poischemicznym nie stwierdzaliśmy wzrostu aktywności enzymu. Wręcz przeciwnie, występował jej wyraźny spadek, który nawet w okresie jej restytucji nie osiągał nasilenia występującego w materiale kontrolnym. Podobne obniżenie aktywności AC obserwowano w przypadku przewlekłego zatrucia związkami manganu (Szumańska, Mossakowski 1985) oraz ostrego zatrucia tlenkiem węgla (Szumańska i wsp. 1988). Zmiany enzymatyczne w obu modelach zatrucia różniły się jednak od następstw przebytej śmierci klinicznej odmienną dynamiką ich narastania i cofania się oraz pełnym powrotem obrazu histochemicznego do stanu typowego dla zwierząt kontrolnych. W porównywaniu uzyskanych wyników zachować należy znaczną ostrożność, ze względu na odmiennosć warunków doświadczalnych i ciężkości związanych z nimi uszkodzeń tkankowych.

W kontekście zmian stwierdzanych w zastosowanym przez nas modelu śmierci klinicznej, wyrażających się wykładnikami obrzęku naczyniopochodnego we wczesnym okresie poreanimacyjnym (Mossakowski i wsp. 1986),



przechodzeniem białek surowicy do utkania mózgu (Mossakowski, Krajewski 1987) oraz wybitnie wzmożoną aktywnością pinocytarną śródbłonek naczyńowych wydaje się uzasadniona hipoteza „wyczerpywania” się aktywności enzymatycznej AC w energochłonnych procesach funkcji komórek śródbłonka. Czas restytucji jej aktywności zależałby od nasilenia działania czynników uszkadzających, różnych w przytoczonych powyżej modelach doświadczalnych. Wyniki uzyskane przez Duxa i wsp. (1984) były w tym kontekście wykładnikiem aktywizacji enzymu pod wpływem czynników o stosunkowo niewielkim oddziaływaniu na stan przepuszczalności naczyń (Kuroisawa i wsp. 1985).

W pracy ze względu na zastosowaną technikę badań histochemicznych nie rozwinięto zagadnienia aktywności cykazy adenylowej w złączach synaptycznych, mimo uchwytanych zmian ich obrazu. Ocena aktywności AC w obszarze synaps, opisana przez Rechartd i wsp. (1986) stanowi przedmiot odrębnego opracowania.

#### CHANGES IN THE ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE AND ADENYLATE CYCLASE IN THE BRAIN VASCULAR NETWORK IN EXPERIMENTAL POSTRESUSCITATION SYNDROME

##### Summary

Activity of alkaline phosphatase and adenylate cyclase was evaluated in the brain vascular network of rats subjected to 10 min clinical death due to cardiac arrest.

Progressive decrease of both enzymes activities was noted in the early survival stages, reaching the lowest intensity in 24th h after ischemic incident. Restitution of enzymatic activity was observed 2 days later, although even then it did not reach intensity typical for normal controls. Electron microscopic study revealed disturbances of normal polarity of enzyme distribution in the cytoplasmic membranes of vascular endothelia. Activity of enzymes disappeared from luminal endothelial surfaces, appearing on abluminal ones and in the capillary basal membranes. Ultrastructural picture of the cerebral capillaris was additionally characterized by remarkable increase of micropinocytic vesicles, and appearance of coated vesicles as well as canalicular structures. Swelling of endothelial cytoplasm and widening of interendothelial clefts were also present.

The results obtained indicate that deep 10 min ischemia in experimentally induced clinical death is leading to the impairment of transport functions in damaged cerebral capillary vessels.

#### ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ И АДЕНИЛОВОЙ ЦИКЛАЗЫ СОСУДИСТОЙ СЕТИ МОЗГА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ СИНДРОМЕ

##### Резюме

С помощью цитохимических методов, применяемых в световой и электронной микроскопии, оценивалась активность щелочной фосфатазы и адениловой циклазы в сосудах мозга крыс, находившихся в течение 10 минут в состоянии экспериментально вызванной



клинической смерти. Обнаружено прогрессирующее понижение активности обоих энзимов, наиболее резко выраженное 24 часа после ишемии. Восстановление энзиматической активности, наблюдавшееся в течение 3-х дней после ишемии, не достигало уровня, типичного для контрольных животных. Электронно-микроскопическое исследование показало нарушение полярного расположения энзимов на цитоплазматических мембранах эндотелия капилляров. Энзиматическая активность на прилегающей к просвету сосуда плазмолемме эндотелиальных клеток снижалась и появлялась на внешней стороне и в базальной мембране. Кроме того, ультраструктура сосудов характеризовалась значительным увеличением содержания пиноцитарных пузырьков, появлением окруженных оболочкой (мембраной) пиноцитарных пузырьков и канальцеподобных структур, а также набуханием цитоплазмы и расширением межэндотелиальных пространств. Полученные результаты показывают, что 10-минутная ишемия при экспериментальных условиях клинической смерти приводит к нарушению транспортных функций в стенках поврежденных мозговых сосудов.

### PIŚMIENICTWO

1. Beggs J. L., Waggener J. D.: Transendothelial vesicular transport of protein following compression injury to the spinal cord. *Lab. Invest.*, 1976, 34, 428–439.
2. Betz L., Goldstein G. W.: Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science*, 1978, 202, 225–226.
3. Betz A. L., Firth J. A., Goldstein G. W.: Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.*, 1980, 192, 17–28.
4. Bodenheimer T. S., Brightman M. W.: A blood-brain barrier to peroxidases in blood vessels surrounded by perivascular space. *Am. J. Pathol.*, 1968, 122, 249–268.
5. Borgers M.: The cytochemical application of new potent inhibitors of alkaline phosphatases. *J. Histochem. Cytochem.*, 1973, 21, 812–824.
6. Dux E., Temesvari P., Joó F., Adam G., Clementi F., Dux L., Hideg J., Hossmann K. A.: The blood-brain barrier in hypoxia: ultrastructural aspects and adenylate cyclase activity of brain capillaries. *Neuroscience*, 1984, 12, 951–958.
7. Fujimoto T., Walker J. T. Jr., Spatz M., Klatzo I.: Pathophysiological aspects of ischemic edema. W: *Dynamics of Brain Edema*. Red.: H. M. Pappius, W. Feindel. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976, pp. 171–192.
8. Goldstein D. J., Harris H.: Mammalian brain alkaline phosphatase: expression of liver (bone) kidney locus. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 53–57.
9. Joó F.: Electron histochemical structure of capillaries in the rat brain. *Acta Biol. Szeged.*, 1969, 15, 79–88.
10. Joó F.: Significance of adenylate cyclase in the regulation of permeability of brain capillaries. W: *Pathophysiology of cerebral energy metabolism*. Red.: B. B. Mrsulja, L. M. Rakič, I. Klatzo, M. Spatz. Plenum Press, New York, 1979, pp. 211–237.
11. Joó F.: Increased production of coated vesicles in the brain capillaries during enhanced permeability of the blood-brain barrier. *Br. J. Exp. Pathol.* 1971, 52, 646–649.
12. Joó F.: The blood-brain barrier *in vitro*: ten years of research on microvessels isolated from the brain. *Neurochem.*, 1985, 7, 1–25.
13. Joó F., Toth I.: Brain adenylate cyclase: its common occurrence in the capillaries and astrocytes. *Naturwissenschaften*, 1975, 8, 397.
14. Joó F., Temesvari P., Dux E.: Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels: the role of cyclic GMP. *Brain Res.*, 1983, 278, 165–174.
15. Karnushkina I., Palacios J. M., Barbin G., Dux E., Joó F., Schwartz J. C.: Studies on a capillary-rich fraction isolated from brain: histaminic components and characterization of the histamine receptors linked to adenylate cyclase. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 1201–1208.



16. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol., Exp. Neurol.*, 1967, 26, 1–13.
17. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *The Nervous System*. Red.: D. B. Tower. Vol. 1. *The Basic Neuroscience*. Raven Press, New York, 1975, pp. 313–322.
18. Klatzo I.: Brain edema following brain ischaemia and the influence of therapy. *Br. J. Anaesth.*, 1985, 57, 18–22.
19. Korpaczew W., Łysenkow S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie klinicznej smierci i postreanimatornej choroby u krysa. *Patol. Fizjol. Exp. Ter.*, 1982, 3, 78–80.
20. Kuroisawa T., Ting P., Martinez H., Klatzo I.: The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1985, 68, 122–129.
21. Lossinsky A. S., Vorbrodt A. W., Wiśniewski H. M., Iwanowski L.: Ultracytochemical evidence for endothelial channel-lysosome connections in mouse brain following blood-brain barrier changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981, 53, 197–202.
22. Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M.: A comparative ultrastructural study of endothelial cell tubular structures from injured mouse blood-brain barrier and normal hepatic sinusoid demonstrated after perfusion fixation with osmium tetroxide. W: *Microvascular Research*. Academic Press, 1986, 31, 333–344.
23. Mayahara H., Hirano H., Saito T., Ogawa K.: The new lead citrate method for the ultracytochemical demonstration of nonspecific alkaline phosphatase. *Histochemie*, 1967, 1, 88–96.
24. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 471–489.
25. Mossakowski M. J., Krajewski S.: Antineural antibodies in blood sera of rats subjected to global cerebral ischemia. *Neuropat. Pol.*, 1988, 26, 37–48.
26. Oldendorf W. H.: The blood-brain barrier. W: *The ocular and cerebrospinal fluids*. Red.: L. Z. Bito, H. Davson, J. D. Fenstermacher. Academic Press, London, 1977, pp. 177–190.
27. Ostenda M., Szumańska G., Gadamski R.: Specific hydrolases activity in blood vessels of rabbit brain after circulatory hypoxia. W: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. PZWŁ, Warszawa, 1978.
28. Ostenda M., Gadamski R.: Permeability of cerebral vessels for horseradish peroxidase in mongolian gerbils after unilateral ligation of the common carotid artery. II. Comparison of early and late changes. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 631–639.
29. Panula P., Rechart L.: Ultrastructural demonstration of adenylate cyclase activity in the rat neostriatum. *Neuroscience*, 1979, 4, 779–799.
30. Rechart L., Härkönen M.: Electron microscopical demonstration of adenylate cyclase activity in nervous tissue. *Histochemistry*, 1977, 51, 113–119.
31. Rechart L., Harvonen H.: Cytochemical demonstration of adenylate cyclase activity with cerium. *Histochemistry*, 1985, 82, 501–505.
32. Rechart L., Hervonen H.: Histochemical localization of adenylate cyclase in nervous tissue. W: *Neurohistochemistry: Modern methods and applications*. Alan R. Liss Inc., 1986, 443–452.
33. Resse T. S., Karnovsky M. J.: Fine structural localization of blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 1967, 16, 270–274.
34. Samorajski T., McCloud J.: Alkaline phosphomonoesterase and blood-brain permeability. *Lab. Invest.*, 1961, 10, 492–501.
35. Simionescu N., Simionescu M., Palade G. E.: Structural basis of permeability in sequential segments of the microvasculature of diaphragm. II. Pathways by microperoxidase across the endothelium. *Microvasc. Res.*, 1978, 15, 17–36.
36. Szumańska G., Ostenda M., Mossakowski M. J.: Aktywność nukleozydo-dwu- i trój-fosforu w mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 197–207.



37. Szumańska G., Ostenda M.: Histochemical changes of tissue vascular junction in the rat brain as a result of hypoxic hypoxia. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 601–618.
38. Szumańska G.: Badania ultrastrukturalne fosfataz nukleozydowych w mózgu chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 551–573.
39. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J. I., Uusitalo H.: Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1984, 62, 219–224.
40. Szumańska G., Mossakowski M. J.: Aktywność cykazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganawym. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 3, 297–314.
41. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J., Uusitalo H.: Aktywność cykazy adenylowej w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1988 (w druku).
42. Torack R. M., Barnett R. J.: The fine structural localization of nucleotide phosphatase activity in the blood-brain barrier. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1964, 23, 46–59.
43. Vorbrodt A. W., Lassmann H., Wiśniewski H. M., Lossinsky A. S.: Ultracytochemical studies of the blood-meningeal barrier (BMB) in rat spinal cord. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981a, 55, 113–123.
44. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Moretz R. C., Iwanowski L.: Ultrastructural cytochemical studies of cerebral microvasculature in scrapie infected mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1981b, 53, 203–211.
45. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M.: Enzyme cytochemistry of blood-brain barrier (BBB) disturbances. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1983, suppl. 8, 43–57.
46. Vorbrodt A. W., Szumańska G., Dobrogowska D. H.: Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, 1984, 32, 275–284.
47. Vorbrodt A. W., Lossinsky A. S., Wiśniewski H. M., Suzuki R., Yamaguchi T., Masoaka H., Klatzo I.: Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1985, 66, 265–273.
48. Wagner R. C., Kreiner P., Barnett R. J., Bitensky M. W.: Biochemical characterization and cytochemical localization of a catecholamine-sensitive adenylate cyclase in isolated capillary endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1972, 69, 3176–3179.
49. Wiśniewski H. M., Lossinsky A. S., Moretz R. C., Vorbrodt A. W., Lassmann H., Carp R. I.: Increased blood-brain barrier permeability in scrapie-infected mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1983, 42, 615–626.

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



STANISŁAW KRAJEWSKI, EWA DOLIŃSKA, JANINA RAFAŁOWSKA

## OCENA BARIERY KREW – MÓZG W WYBRANYCH PRZYPADKACH ZAWAŁÓW MÓZGU CZŁOWIEKA. BADANIA IMMUNOCYTOCHEMICZNE\*

Klinika Neurologiczna Akademii Medycznej, Warszawa Zakład Neuropatologii Centrum  
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Wprowadzenie metody peroksydaza-antyperoksydaza (PAP) dało możliwość oceny immunocytochemicznej, uprzednio utrwalonego w formalinie i zatopionego w parafinie materiału sekcyjnego, dotyczącego różnych chorób układu nerwowego człowieka. Duże zainteresowanie budzi między innymi choroba Alzheimera i zespoły przebiegające z otępieniem, w których badania immunocytochemiczne pozwoliły już na uzyskanie istotnych danych o budowie biochemicznej skręconych neurotubul (Gambetti i wsp. 1986; Nukina i wsp. 1986; Selkoe 1986). Badania immunocytochemiczne umożliwiły również ocenę lokalizacji niektórych neuropeptydów w chorobach Alzheimera, Huntingtona i Parkinsona (Grafe i wsp. 1985). Poszukiwania na poziomie cząsteczkowym stanowią więc jeden z kierunków badań przy użyciu technik immunomorfologicznych. Innym ich kierunkiem jest ocena przepuszczalności naczyń ośrodkowego układu nerwowego. Oprócz licznych prac, wskazujących na nieprawidłowości przepuszczalności bariery krew – mózg w nowotworach OUN, zwłaszcza w gliomach, obserwowano wyciek białek z łożyska naczyniowego w chorobie Alzheimera, w otępieniu starczym typu alzheimerowskiego oraz w wieloogniskowych zawałach mózgu z otępieniem (Alafuzoff i wsp. 1985; 1987). Zawały mózgu, mimo iż częstsze, nie wzbudzają tak dużego zainteresowania. Z tego też zapewne powodu w dostępnym piśmiennictwie, poza wyżej wspomnianymi badaniami, nie znaleziono danych, dotyczących oceny przepuszczalności naczyń krwionośnych w chorobach naczyniowych mózgu człowieka. Skłoniło to nas do przeprowadzenia oceny naczyniowych układów barierowych w naczyniopochodnych uszkodzeniach mózgu człowieka. Do

---

\* Praca wykonana w ramach Centralnego Programu Badań Podstawowych – 06.02.II.1.4.



badania wybrano 5 spośród 17 przypadków udarów niedokrwiennych, w których zawałowi mózgu towarzyszyła znaczna reakcja limfocytna (Barcikowska-Litwin i wsp. 1987).

Tabela 1. Materiał

Table 1. Material

Przypadek Nr Case No	Wiek (lata) Age (years)	Okres przeżycia Survival time	Nadciś- nienie Hyperten- sion	Przyczyna zgonu (sekcja og.) Cause of death (autopsy)	Miażdży- ca naczyń mózgu Brain vessels arterio- scler	Badanie makroskopowe mózgu Brain gross examination
1. 59/82	50	12 dni 12 days	+	Zakrzepica tt. płucnych Pulmonary arteries thrombosis	++	Zawał krwotoczny w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej prawej. Obrzęk Hemorrhagic infarct in area of vascularization of right middle cerebral artery. Edema
2. 72/76	60	3 lata 3 years	-	Zawał m. serca Cardiac infarct	+++	Liczne jamy poudarowe w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej lewej. Obrzęk. Multiple postapopleptic cavities in area of vascularization of left middle cerebral artery Edema
3. 112/73	87	11 dni 11 days	+	Zawał m. serca Cardiac infarct	+++	Zawał błady w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej prawej Ischemic necrosis in area of vascularization of right middle cerebral artery
4. 15/76	87	15 dni 15 days	+	Zator t. płucnej Pulmonary embolism	+	Zawał błady w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej prawej Ischemic necrosis in area of vascularization of right middle cerebral artery
5. 63/78	83	35 dni 35 days	-	Zapalenie płuc Pneumonia	+	Zakrzep t. szyjnej wew. lewej. Zawał krwotoczny w obszarze unaczynienia t. mózgu środkowej lewej. Obrzęk Left internal carotid thrombosis. Hemorrhagic infarct in area of vascularization of left middle cerebral artery. Edema



## MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były mózgi 5 chorych, zmarłych w przebiegu udaru niedokrwinnego mózgu w wieku 50, 60, 83–87 lat. Sekcję ogólną wykonywano do 24 godz. po zgonie. Dane kliniczne i wyniki badania sekcyjnego podano w tabeli 1.

Bloki tkankowe pobrane z ognisk zawałowych oraz z przeciwległej półkuli mózgu, traktowanej jako kontrola, utrwalono w 10% zbuforowanej formalinie i zatopiono w parafinie. Skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną, według metody PAS, Klüvera-Barrery oraz PTAH.

Do oceny zaburzeń bariery krew–mózg zastosowano metodę immunoperoksydazy pośredniej, według Sternbergera i wsp. (1970), celem uwidocznienia białek surowicy krwi gospodarza, takich, jak IgG, alfa-2-makroglobulina i fibrynogen. Ponadto oceniano naczynia krwionośne za pomocą przeciwciał przeciwko czynnikowi VIII – swoistemu znacznikowi komórek śródbłonna. Nacieki komórek krwiopochodnych próbowano określić bliżej przy zastosowaniu znacznika komórek histiocytarnych i makrofagów w barwieniu na obecność alfa-1-antytrypsyny.

Metoda immunoperoksydazy pośredniej polegała na kolejnych inkubacjach odparafinowanych preparatów początkowo z surowicą normalną świni (1:100), przez 1 godz. w celu wygaszenia nieswoistego tła, a następnie przez noc z wyżej wymienionymi przeciwciałami pierwotnymi rozcieńczonymi odpowiednio: IgG (Biomed, Polska) – 1:5000, alfa-2-makroglobulina (Biomed, Polska) – 1:3000, fibrynogen (Biomed, Polska) – 1:1500, czynnik VIII (Dakopatts, Dania) – 1:1000 oraz alfa-1-antytrypsyna (Dakopatts, Dania) – 1:1000. Następnie po płukaniu w PBS skrawki inkubowano przez 45 min z przeciwciałami świni przeciwko globulinom królika (Dakopatts, Dania) – 1:50, oraz kompleksem peroksydazy-antyperoksydazy (Dakopatts, Dania) – 1:200. Reakcje uwidacziano umieszczając preparaty w 0,05% roztworze dwuaminobenzyny (Sigma, USA) z dodatkiem 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Po skontrastowaniu hematoksyliną i odwodnieniu w alkoholach preparaty zamykano za pomocą De-Pe-X (Serva, RFN).

## WYNIKI

## Badanie histologiczne

*Przypadek 1 (59/82).* Martwica kory i istoty białej prawie bezodczynowa z wyraźną sekwestracją tkanek martwiczych. Miejscami II i III warstwa kory były nieco lepiej zachowane i zawierały niewielką ilość komórek nerwowych i glejowych oraz pojedyncze makrofagi. W okolicy demarkacji tkanek martwiczych widoczne były nieregularne, girlandowate zgąbczenia z nielicznymi makrofagami i glejozą astrocytarną z gemistocytami.

*Przypadek 2 (72/76).* Jama poroziębieniowa obejmująca korę i istotę białą z niewielką ilością makrofagów, otoczona siatkowato rozrzedzoną

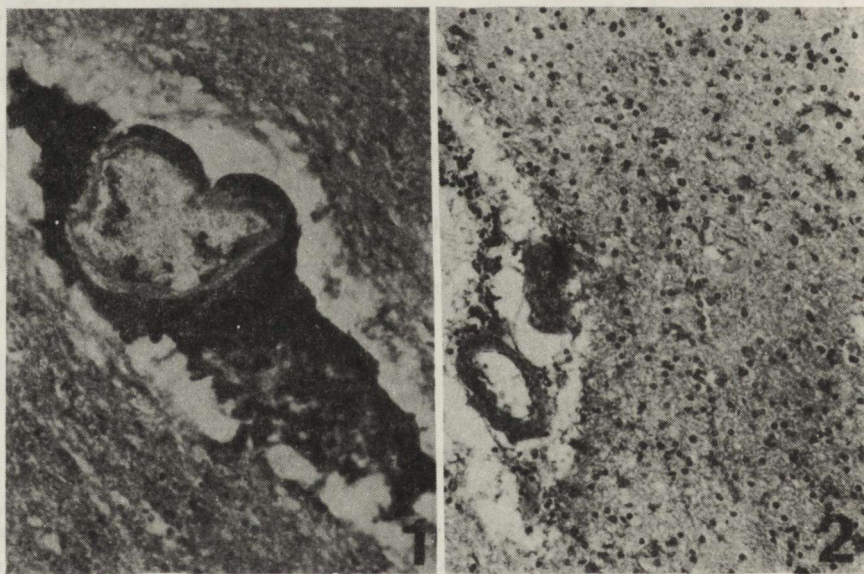


tkanką, wśród której widoczne były różnej wielkości obszary wypełnione komórkami żernymi. Na obrzeżu ognisk rozbiórki makrofagowej w obszarze martwicy niezupełnej występowała znacznie nasilona glejoza astrocytarna z licznymi przerosłymi komórkami gwiaździstymi i gemistocytami. Rozrost glejowy wykazywał szczególne nasilenie w zachowanych częściach warstwy drobinowej kory.

*Przypadek 3 (112/73).* Martwica w stadium rozbiórki mezodermalnej z tworzeniem się jamy wypełnionej makrofagami. Tkanki otaczające wykazywały cechy martwicy niezupełnej z pomnożeniem gleju astrocytarnego z udziałem gemistocytów. W korze oddalonej od ogniska widoczne były nieliczne komórki nerwowe z cechami zwyrodnienia ischemicznego.

*Przypadek 4 (15/76).* Martwica krwotoczna z rozbiórką makrofagową umiejscowiona w istocie białej. W tkankach otaczających martwica niezupełna z pomnożeniem astrogleju i obecnością gemistocytów występujących również w pewnej odległości od martwicy. W korze oddalonej od ogniska można było napotkać niezbyt liczne neurocyty z nasilonymi zmianami ischemicznymi.

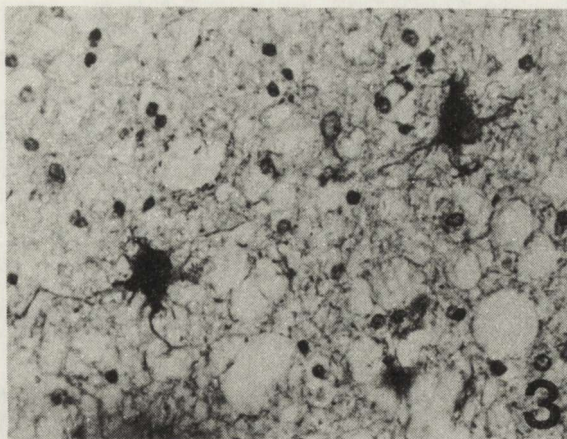
*Przypadek 5 (63/78).* Ognisko martwicy o zróżnicowanym obrazie morfologicznym, stanowiącym wykładnik różnego stopnia zaawansowania procesu



Ryc. 1. Przypadek 4. IgG. Wybitnie dodatnia reakcja w przestrzeni okołonaczyniowej. Pow. 250 ×  
Fig. 1. Case 4. Intensive positive IgG reaction within perivascular space. × 250

Ryc. 2. Przypadek 3. IgG. Reakcja dyfuzyjna w pobliżu martwicy. Reakcja śródkomórkowa w neuronach i gemistocytach. Okołonaczyniowy naciek limfocytarny. Pow. 250 ×  
Fig. 2. Case 3. IgG. Diffuse reaction in the vicinity of necrosis. Intracellular reaction of nerve cells and gemistocytes. Perivascular lymphocytic infiltrate. × 250





Ryc. 3. Przypadek 3. IgG. Śródkomórkowa reakcja gemistocytów w obszarze martwicy niepełnej otaczającej jamę poudarową. Pow. 500 ×

Fig. 3. Case 3. IgG. Intracellular gemistocytic reaction in a partially necrotic area surrounding postapoplectic cavity. × 500

patologicznego. W jego obrębie stwierdzono obszary martwicy skrzepowej, martwicy rozplywnej z dużą ilością makrofagów i tworzeniem się jam, duże pole przesięku rozlanego w podłożu oraz liczne przesięki okołonaczyniowe.

We wszystkich przedstawionych wyżej przypadkach stwierdzono zmiennie nasiloną okołonaczyniową reakcję limfocytarną.

#### Badania immunocytochemiczne

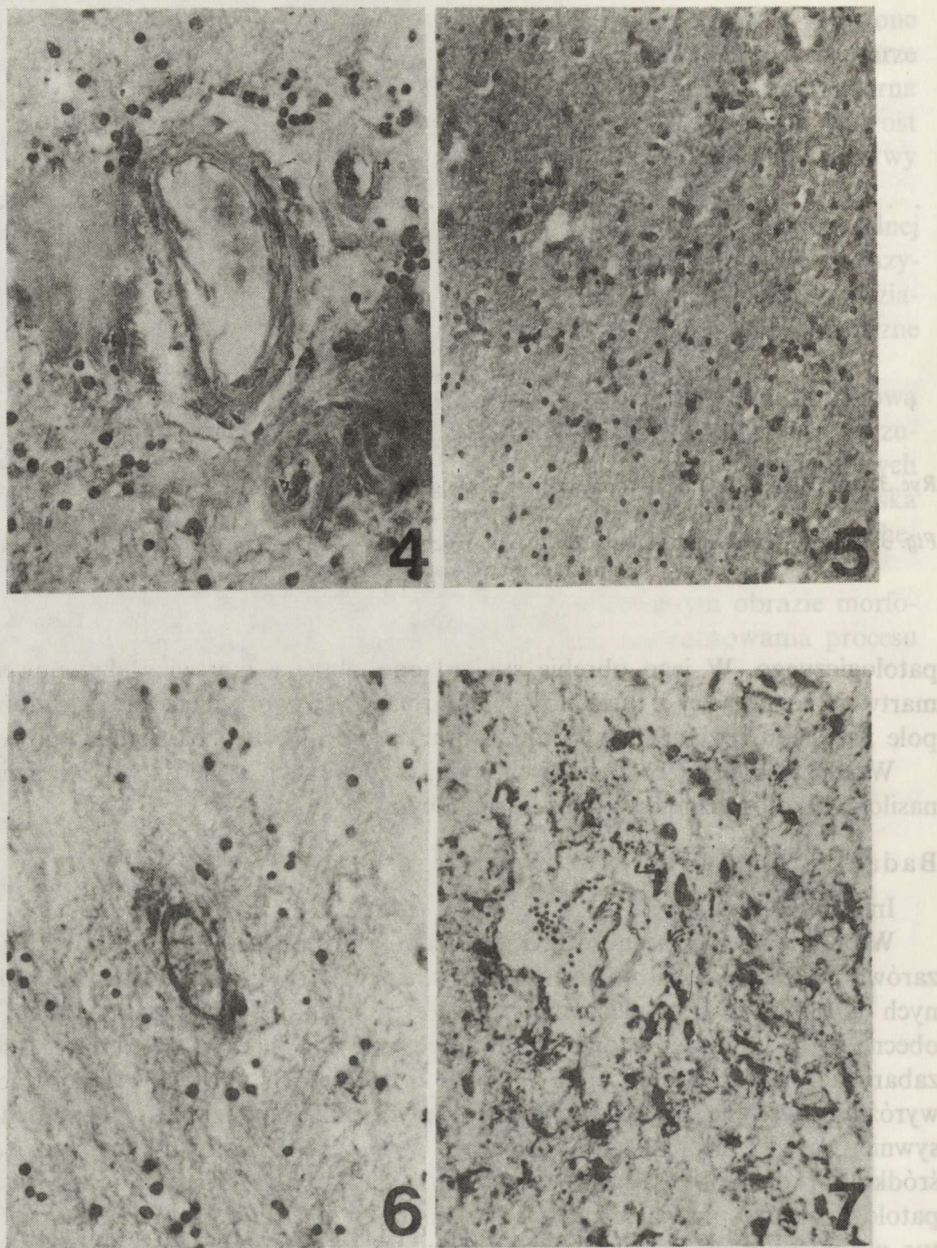
##### Immunoglobulina G.

W barwieniu na obecność IgG wykazano jej rozległą i intensywną reakcję zarówno w ognisku patologicznym, jak również w obszarach mózgu oddalonych od ogniska i sprawiających wrażenie strukturalnie nie zmienionych. IgG obecna była niekiedy w przestrzeni okołonaczyniowej (ryc. 1), intensywnie zabarwiała struktury neuropilu (ryc. 2). W obszarach martwicy niepełnej wyróżniających się znacznie zaawansowanym odczynem glejowym najintensywniej barwiły się reaktywne astrocyty (ryc. 3). Nierzadko lokalną reakcję śródkomórkową obserwowano w komórkach kory oddalonych od ogniska patologicznego, sprawiających w barwieniach przeglądowych wrażenie struktur niezmiennych. Najslabsze natężenie reakcji IgG notowano w starych jamach porozmięknieniowych i w ogniskach z zaawansowaną rozbiórką makrofagową.

##### Alfa-2-makroglobulina

Rozkład białka w badanych przypadkach różnił się od IgG swoim zasięgiem. W ogniskach świeżych występowało ono w pobliżu naczyń krwionośnych (ryc. 4). Wyjątkowo tylko dyfuzyjny odczyn zajmował cały obszar





Ryc. 4. Przypadek 5. Alfa-2-makroglobulina. Reakcja okołonaczyniowa. Dyskretny naciek limfocytny. Pow. 500 ×

Fig. 4. Case 5.  $\alpha$ -2-macroglobulin. Perivascular reaction. Discreet lymphocytic infiltrate.  $\times 500$

Ryc. 5. Przypadek 1. Alfa-2-makroglobulina. Dodatnia dyfuzyjna reakcja komórek nerwowych kory w ognisku martwicy niezupełnej. Pow. 250 ×

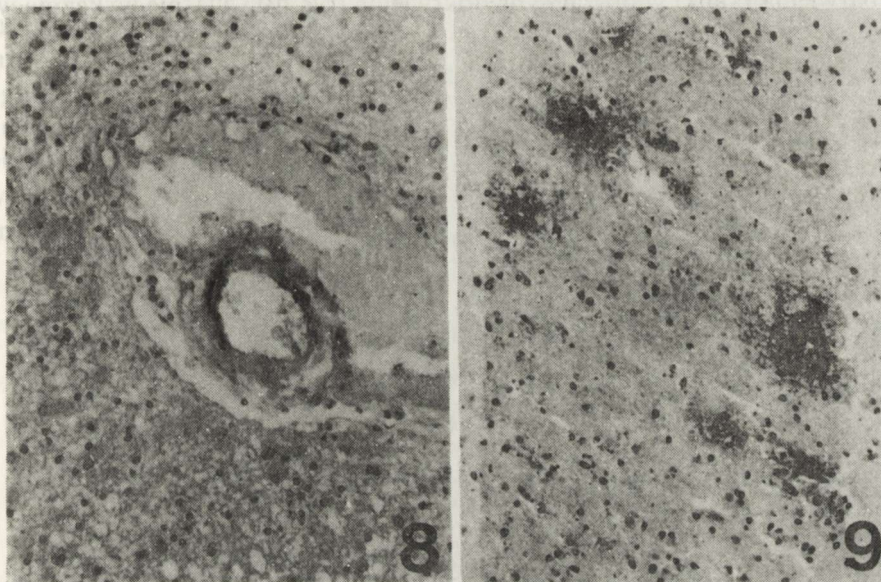
Fig. 5. Case 1.  $\alpha$ -2-macroglobulin. Positive diffuse reaction in the cortical neurons situated in a partially necrotic area.  $\times 250$



zawału (ryc. 5). Rzadko obserwowano reakcję okołonaczyniową w odległych, nie zmienionych obszarach mózgu (ryc. 6). Niekiedy stwierdzano komórki nerwowe i gemistocyty (ryc. 7) wykazujące dodatni odczyn immunohistochemiczny.

### Fibrynogen

W obszarach zawału występowało nagromadzenie włóknika ujawniającego się w postaci dyfuzyjnego odczynu tkankowego oraz skupień okołonaczyniowej siateczki (ryc. 8). Intensywne wynacznienia włóknika stwierdzano wokół



Ryc. 8. Przypadek 4. Fibrynogen. Nasiąkanie ścian naczyń i tkanek okołonaczyniowych w pobliżu martwicy. Pow. 250 ×

Fig. 8. Case 4. Fibrinogen. Imbibition of vascular walls and perivascular tissues in the vicinity of necrosis. × 250

Ryc. 9. Przypadek 5. Fibrynogen. Brzeg ogniska martwicy. Dodatnia reakcja okołonaczyniowa. Śródkomórkowa reakcja gemistocytów. Pow. 250 ×

Fig. 9. Case 5. Fibrinogen. Border of the necrotic focus. Positive perivascular reaction. Intracellular reaction of gemistocytes. × 250

Ryc. 6. Przypadek 4. Alfa-2-makroglobulina. Reakcja okołozylna w istocie białej, oddalonej od ogniska martwicy. Pow. 500 ×

Fig. 6. Case 4.  $\alpha$ -2-macroglobulin. Perivenous reaction within white matter distant necrotic focus. × 500

Ryc. 7. Przypadek 2. Alfa-2-makroglobulina. Reakcja śródkomórkowa odczynowych astrocytów i gemistocytów w obszarze martwicy niezupełnej. Okołonaczyniowy naciek limfocytarno-plazmocytny. Pow. 500 ×

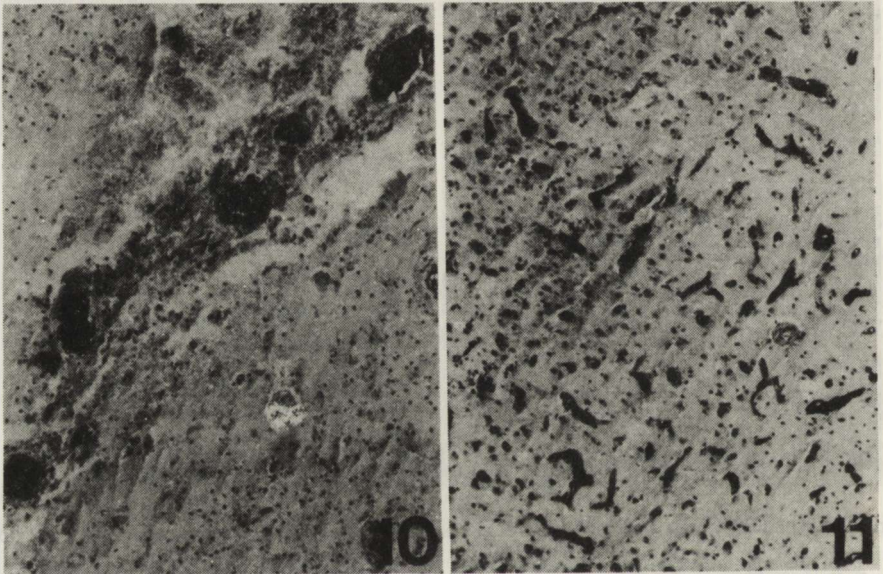
Fig. 7. Case 2.  $\alpha$ -2-macroglobulin. Intracellular reaction of reactive astrocytes and gemistocytes in the area of selective necrosis. Perivascularly few plasmatic and lymphocytic cells. × 500



naczyń krwionośnych, którym towarzyszyły krwinkotoki (ryc. 8) oraz naczyń położonych w strefie formującego się obszaru demarkacyjnego (ryc. 9). W polach martwicy niezupełnej podbarwione były niekiedy gemistocyty. Stare ogniska zawierały włóknik jedynie w świetle naczyń krwionośnych, ich ścianach lub pojedynczych astrocytach. Nie występowało natomiast dyfuzyjne podbarwienie zrębu (przyp. 72/76).

### Czynnik VIII

Odczyn immunohistochemiczny ujawniający czynnik VIII, stanowiący znacznik śródbłonna naczyń krwionośnych, występował w postaci dyfuzyjnego podbarwienia tkanki w obszarze niedokrwienia (ryc. 10 i 11), nie wykazującym



Ryc. 10. Przypadek 4. Czynniki VIII. Dodatnia reakcja osocza oraz ścian naczyń krwionośnych w oponach przyległych do martwicy. Reakcja dyfuzyjna kory mózgu. Pow. 125 ×

Fig. 10. Case 4. Factor VIII. Positive reaction of plasma and blood vessels within meninges adjacent to the necrotic area. Diffuse reaction of cerebral cortex. × 125

Ryc. 11. Przypadek 4. Czynniki VIII. Dodatnia reakcja ścian naczyń różnego kalibru w obszarze niedokrwienia kory mózgu. Pow. 125 ×

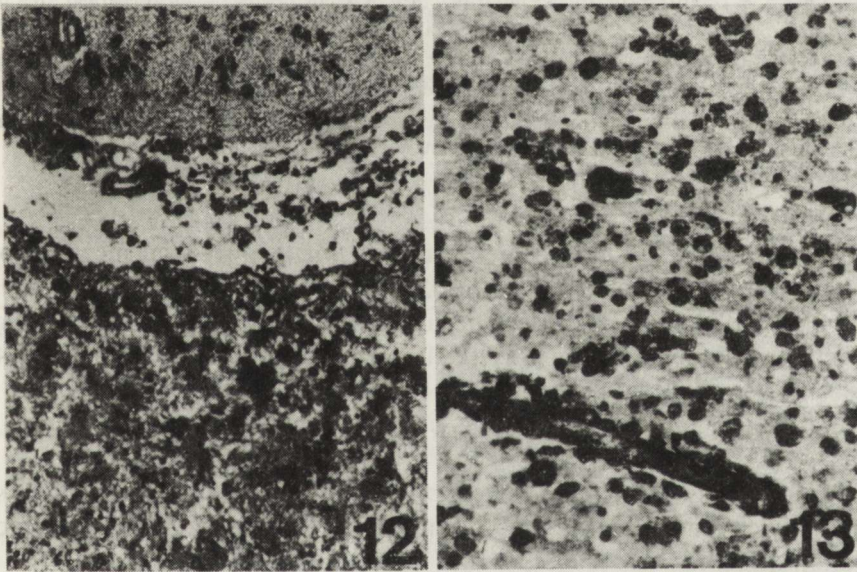
Fig. 11. Case 4. Factor VIII. Positive reaction of various size vessel walls within ischemic cortex. × 125

cech wyraźnej rozbiórki makrofagowej. Szczególnie intensywnie barwiły się naczynia (ryc. 11) oraz ich otoczenie w polach martwicy rozplývnej, w obszarze demarkacyjnym między tkanką zdrową i martwicą niezupełną oraz w oponach przylegających do martwicy (ryc. 10).



## Alfa-1-antytrypsyna

Największe różnice w zasięgu i intensywności reakcji tkankowych w ogniskach niedokrwienia zaobserwowano w odczynie ujawniającym obecność alfa-1-antytrypsyny, enzymu hamującego aktywność enzymów proteolitycznych i pośrednio wskazującego na udział enzymów proteolitycznych w procesie rozbiórki martwiczej tkanki. Intensywny dyfuzyjny odczyn alfa-1-antytrypsyny występował w świeżych ogniskach martwicy oraz w polach wybiórczej martwicy kory, nie wykazujących reakcji makrofagowej. Najintensywniej barwiły się pola martwic niepełnych (ryc. 12), martwica typu skrzepowego oraz ukrwotocznione martwicze obszary. W polach usianych makrofagami reakcja była zróżnicowana, od wybitnej (ryc. 13) do słabej. Stare jamy poudarowe charakteryzowały się słabym odczynem alfa-1-antytrypsyny ograniczonym wyłącznie do fagocytów. Spośród elementów komórkowych dużą intensywnością reakcji wyróżniały się astrocyty, wybitnie proliferujące w obszarach martwicy niepełnej. Ich intensywna reakcja śródcytoplazmatyczna widoczna była na tle negatywnego zrębu tkankowego (ryc. 14). Niekiedy śródkomórkowy odczyn występował również w komórkach nerwowych kory



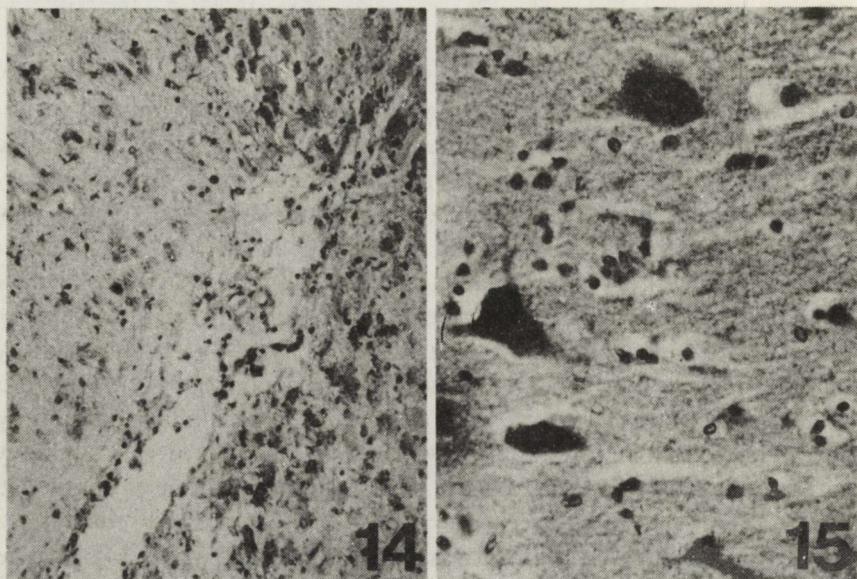
Ryc. 12. Przypadek 5. Alfa-1-antytrypsyna. Reakcja dyfuzyjna w obszarze niepełnej martwicy kory mózgu. Reakcja śródkomórkowa gemistocytów. Pow. 250 ×

Fig. 12. Case 5.  $\alpha$ -1-antitrypsin. Diffuse reaction within area of selective cortical necrosis. Intracellular reaction of gemistocytes.  $\times 250$

Ryc. 13. Przypadek 4. Alfa-1-antytrypsyna. Intensywna reakcja ściany naczynia i makrofagów. Pow. 250 ×

Fig. 13. Case 4.  $\alpha$ -1-antitrypsin. Highly intensive reaction of vessel wall and macrophages.  $\times 250$





Ryc. 14. Przypadek 5. Alfa-1-antytrypsyna. Śródkomórkowa reakcja gemistocytów w okolicy rowka międzywojowego w pobliżu martwicy. Pow. 250 ×

Fig. 14. Case 5.  $\alpha$ -1-antitrypsin. Intracellular reaction of gemistocytes in sulcal cortical area in the vicinity of necrosis.  $\times 250$

Ryc. 15. Przypadek 4. Alfa-1-antytrypsyna. Śródkomórkowa reakcja komórek piramidowych III warstwy kory, oddalonej od martwicy. Pow. 500 ×

Fig. 15. Case 4.  $\alpha$ -1-antitrypsin. Intracellular reaction of pyramidal cells within the third cortical layer distant from necrosis.  $\times 500$

w obszarze martwicy niezupełnej oraz w korze pozornie niezmienionej, oddalonej od ogniska martwicy (ryc. 15).

Wyniki badań immunocytochemicznych zestawiono w tabeli 2. Intensywność odczynów oceniano we wszystkich barwieniach w skali od 1+ do 4+.

#### OMÓWIENIE

Podsumowując wyniki badań (tab. 2) stwierdzamy, że we wszystkich zastosowanych odczynach występowała reakcja dyfuzyjna okołonaczyniowa i śródkomórkowa.

Reakcja dyfuzyjna, stwierdzona we wszystkich przypadkach, była wyraźniejsza i intensywniejsza w obszarze zawału niż w jego otoczeniu. We wszystkich przypadkach obserwowano najrozleglejszy przeciek IgG. Pozostałe badane składniki osocza obecne były we wszystkich przypadkach, jednakże odczyny ujawniające ich pozanaczyniowe nagromadzenie wykazywały zróżnicowane nasilenie, a ich rozległość była z reguły mniejsza niż w przypadku IgG. Najmniej rozległe przesieknięcie białek osocza krwi stwierdzono w przypadku 2,



Przypadek Case	Wiek Age	Okres przeżycia Survival time	Rodzaj martwicy Kind of necrosis	Reakcja Reaction	IgG		$\alpha$ -2-makroglobulina $\alpha$ -2-macroglobullin		Fibrynogen Fibrinogen		Czynnik VIII Factor VIII		$\alpha$ -2-antytrypsyna $\alpha$ -2-antitrypsin	
					Ognisko Necrot.	Otoczenie Surrounding	Ognisko Necrot.	Otoczenie Surrounding	Ognisko Necrot.	Otoczenie Surrounding	Ognisko Necrot.	Otoczenie Surrounding	Ognisko Necrot.	Otoczenie Surrounding
					lesion	ding	lesion	ding	lesion	ding	lesion	ding	lesion	ding
1. 59/82	50	12 dni	Bezodczynowa	Dyfuzyjna	+++	+	±	±	++	±	++	+	-	-
				Okolonaczyn. Perivascular	-	-	+	-	±	-	-	-	-	-
2. 72/76	60	12 days	Areactive, acellular	Śródkomórk. Intracellular	+++	++	+	++	+	-	-	-	++	+
				Dyfuzyjna	+++	+	+	-	±	±	-	-	-	-
3. 112/73	87	3 lata	Rozplywna, jamy	Okolonacz. Perivascular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				Liquefaction, cavities	++	+	++	-	+	-	+	+	++	-
4. 15/76	87	11 dni	Rozplywna, jamy	Śródkomórk. Intracellular	+++	++	-	-	+	-	-	-	++	-
				Dyfuzyjna	+++	++	+	-	±	-	±	-	+++	+++
5. 63/78	83	15 dni	Rozplywna, jamy	Okolonaczyn. Perivascular	+	±	-	-	+	-	-	-	-	-
				Liquefaction, cavities	++++	+	++	-	++	-	+++	-	++++	++
5. 63/78	83	35 dni	Skrzepowa, rozplywna, przesięk	Dyfuzyjna	+++	+	++	-	+++	±	+	±	+	±
				Okolonacz. Perivascular	+++	+	+++	-	+	-	-	-	-	-
		35 days	Coagulative, liquefaction, transudate	Śródkomórk. Intracellular	+++	-	++	-	+++	-	+	-	+++	+



w którym udar miał miejsce trzy lata przed zgonem, a najwyraźniejsze – w przypadkach 4 i 5 u chorych zmarłych w wieku 83 i 87 lat. Dodatkowo zwraca uwagę dyfuzyjny charakter reakcji białek krążących we krwi: fibrynogenu, czynnika VIII, znakującego również komórki śródbłonka oraz alfa-1-antytrypsyny, hamującej proteazy (McCombe i wsp. 1985) i stanowiącej w związku z tym znacznik krwiopochodnych makrofagów, spełniających rolę komórek fagocytarnych również w mózgu (Oehmichen 1982; Schelper, Adrian 1986).

Nasuwa się pytanie, czy rozległa reakcja dyfuzyjna nie była artefaktem związanym z czasem, jaki upłynął między zgonem chorego a utwaleniem mózgu? Jednakże badania niektórych autorów (Alafuzoff i wsp. 1987) dotyczące sześciu białek osocza, w tym IgG i fibrynogenu, przeprowadzone na materiale utwalonym w czasie od 6 do 52 godz. po zgonie nie wykazywały zależności rozległości i intensywności dyfuzji od długości okresu pomiędzy zgonem a sekcją, a fibrynogen wybarwiał jedynie ściany naczyń.

Nasilenie reakcji dyfuzyjnej, nie jednakowe w różnych barwieniach można prawdopodobnie wiązać z trzema czynnikami. Pierwszym z nich jest stopień uszkodzenia bariery krew–mózg. Umiarkowane uszkodzenie bariery powoduje przenikanie z naczyń do otaczających tkanek wody i elektrolitów. Ich przesiękanie wraz z białkami osocza świadczy o głębokim uszkodzeniu przepuszczalności naczyń (Lee 1982). Przeciek w niedokrwieniu odbywa się głównie poprzez zwiększenie liczby pęcherzyków pinocytarnych (Bakay, Lee 1968; Katzman i wsp. 1977; Westergaard i wsp. 1978a, 1978b). Uważa się równocześnie, że komórki śródbłonka i ich ściste połączenia są bardzo odporne na działanie czynników uszkadzających (Katzman i wsp. 1977). Wiadomo skądinąd, że hiperosmotyczny roztwór mocznika (Derovini-Zis i wsp. 1987) oraz czynniki hemodynamiczne związane z nadciśnieniem (Rapoport 1976) powodują przenikanie składników osocza również przez szczeliny między komórkami śródbłonka. Zmiany w stanie mechanizmów barierowych, przebiegające z wyciekaniem składników osocza zarówno przez aktywowany proces pinocytozy, jak przez otwarcie ścisłych połączeń między-śródbłonkowych stanowić mogą przyczynę znacznej rozległości i nasilenia reakcji dyfuzyjnej. O jej zróżnicowaniu decydować może przy tym stopień zaburzenia mechanizmów barierowych.

Dodatkowym czynnikiem, wpływającym na przepuszczalność naczyń mózgowych w opisanych przypadkach, mogły być ponadto zmiany w ich strukturze, związane z procesem nadciśnieniowym (przyp. 1, 3 i 4), miażdżycowym (przyp. 1 i 2) lub starczym (przyp. 3, 4 i 5). W obszarze martwicy oraz w tkankach otaczających do wyżej wymienionych zmian należy dodać głębokie uszkodzenia troficzne całej ściany naczyń większego kalibru i martwicę ścian drobnych naczyń.

Pod uwagę należy wziąć fakt, że różnice w nasileniu reakcji dyfuzyjnej mogą mieć związek z zawartością odpowiednich białek we krwi (Seitz, Wechsler 1987) oraz z wielkością i ciężarem cząsteczkowym przenikających składników białkowych osocza. Alfa-1-antytrypsyna i IgG o niskich ciężarach



cząsteczkowych odpowiednio (54000 i 150000) mogą przechodzić łatwiej przez ścianę naczyń z umiarkowanymi zaburzeniami przepuszczalności niż cząsteczka alfa-2-makroglobuliny o ciężarze cząsteczkowym około 820000. Należy sądzić, że w przypadkach 4 i 5, charakteryzujących się bardzo znacznie nasiloną i rozległą reakcją dyfuzyjną, dotyczącą prawie wszystkich badanych związków, uszkodzenie bariery krew – mózg było największe. Jej rozpad mógł być czynnikiem prowadzącym do zaskakującej reakcji dyfuzyjnej alfa-1-antytrypsyny oraz czynnika VIII, którego ciężar cząsteczkowy waha się, w zależności od składu, od 380000 do 1–2000000.

okołonacyniowa reakcja immunohistochemiczna była znaczna w przypadku 5, charakteryzującym się obecnością rozległych obszarów przesieku, widocznych już w barwieniu przeglądowym. Trudna do wyjaśnienia jest rozbieżność pomiędzy znaczną reakcją dyfuzyjną i brakiem lub nikłymi wykładnikami przesiekania w okolicy naczyń w pozostałych przypadkach. Być może w rachubę wchodzi czynniki ułatwiające rozległą penetrację wynaczynionych składników osocza w tkankach OUN. Nie można również wykluczyć, że zmiany przepuszczalności, prowadzące do rozległego „wylewania się” białkowych składników osocza dotyczyły tylko naczyń. Nie bez znaczenia jest również czynnik czasu po przebytych udarze. Należy przy tym podkreślić rozleglejszy i intensywniejszy rozkład znaczników barierowych w przypadkach starczych.

Śródkomórkowa reakcja na IgG może mieć związek z jej nieswoistym wiązaniem przez elementy tkanki nerwowej i naczynia (Goust i wsp. 1984). Może też być przejawem autoimmunologicznego procesu, nasilającego się z wiekiem (Ingram i wsp. 1974). Istnieje ponadto możliwość krzyżowych reakcji immunoglobulin w obecności komórek żernych jako dawców tlenu (Jasin 1987). Niewykluczone, że nasilenie reakcji krzyżowych wiąże się z bogatym komórkowym odczynem immunologicznym, stwierdzonym w opisywanych przypadkach (Barcikowska-Litwin i wsp. 1987). W obszarach martwicy niezupełnej, otaczającej ogniska martwicy rozplywnej, dodatnie odczyny immunocytologiczne wykazywały komórki nerwowe, przerosłe astrocyty oraz typowe gemistocyty. W przypadku komórek nerwowych dodatnia reakcja dotyczyła IgG oraz alfa-1-antytrypsyny. Znaczna część gemistocytów i ścian naczyń krwionośnych wybarwiała się we wszystkich stosowanych metodach. Podobne zjawisko zaobserwowano w reaktywnych astrocytach w otoczeniu guzów glejowych u ludzi (Seitz, Wechsler 1987).

Niedokrwienie, aktywujące fosfolipazę  $A_2$  prowadzi do głębokiego uszkodzenia błon komórkowych (Jesse, Franson 1979), które mogą stać się przepuszczalne dla różnych cząsteczek. Nie można wykluczyć, że ten właśnie mechanizm odgrywał rolę w wybiórczym wybarwianiu się oddalonych od ogniska martwicy komórek nerwowych kory, które w barwieniu H–E odpowiadały komórkom ischemicznym. Obecność takich komórek w mózgu ludzi w zaawansowanym wieku należy wiązać z przebytymi zaburzeniami w ukrwieniu.

Ocena immunocytochemiczna 5 przypadków zawału mózgu wykazała



wykładniki głębokiego uszkodzenia bariery krew—mózg. Zbyt mała liczba przypadków nie pozwala na ścisłe skorelowanie danych klinicznych i morfologicznych. Zwraca jednak uwagę fakt, że nieprawidłowa przepuszczalność naczyń występowała w przypadkach o różnym czasie przeżycia od przebytego udaru. W materiale Horniga i wsp. (1983) ocena stosunku albumin i alfa-2-makroglobulin w płynie mózgowo-rdzeniowym i w surowicy krwi u 39 pacjentów z udarem niedokrwiennym wykazała, że zaburzenia bariery występowały częściej w pierwszych 2 tygodniach choroby. Jednakże wśród tych 39 chorych u 2 chorych z rozległym zawałem w zakresie unaczynienia tętnicy środkowej mózgu, zweryfikowanym w tomografii komputerowej, okres zaburzeń barierowych wynosił 1 i 4 tygodnie. W przebiegu całkowitego i niepełnego niedokrwienia mózgu występuje zjawisko tzw. dojrzewania zmian morfologicznych (Klatzo 1975) przejawiających się narastaniem w czasie niedokrwiennych zmian tkankowych (Ito i wsp. 1987; Kapuściński, Mossakowski 1985; Mossakowski i wsp. 1986). Proces ten dotyczy również zaburzeń mechanizmów bariery krew—mózg (Mrsulja i wsp. 1978) wyrażających się obrzękiem mózgu. Nadciśnienie tętnicze nasila nieprawidłowości barierowe i pogłębia obrzęk mózgu (Westergaard i wsp. 1978b). Różne gatunki zwierząt wykazują zróżnicowaną przepuszczalność bariery krew—mózg w różnych strukturach mózgu (Lee 1982). Występuje to również prawdopodobnie u człowieka. Przebycie w życiu osobniczym oraz nakładanie się, zwłaszcza u ludzi w zaawansowanym wieku, różnorodnych, często długotrwałych procesów chorobowych stwarza możliwość głębszego, niż w warunkach doświadczalnych, uszkodzenia mechanizmów barierowych oraz bardzo znacznych różnic indywidualnych w narastaniu obrzęku mózgu i dojrzewaniu zmian w obszarze niedokrwienia. Uszkodzenie bariery może przeto wystąpić w różnych przedziałach czasowych procesu chorobowego.

Ocena zmian w przepuszczalności bariery krew—mózg w badaniach immunocytochemicznych mózgu człowieka jest bardzo trudna, jednakże badania te dostarczają więcej informacji niż stosowane powszechnie przeglądowe metody histologiczne barwienia tkanki.

#### AN APPRAISAL OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN SOME CASES OF HUMAN BRAIN INFARCT. IMMUNOCYTOCHEMICAL INVESTIGATIONS

##### Summary

Immunocytochemical characterization of the blood-brain barrier (BBB) disturbances in 5 subjects deceased at the age 50, 60, 83 and 87 years with diagnosis of brain infarct was performed. Peroxidase-antiperoxidase Steinberger's (1970) method for visualization of the host IgG, fibrinogen and  $\alpha$ -2-macroglobulin as markers of BBB permeability was used. The factor VIII as a marker for endothelial cells identified blood vessels. The staining for  $\alpha$ -1-antitrypsin demonstrated hematogenous phagocytes.

Diffuse, perivascular and intracellular immunoreactivity in all cases was noted, however, its



intensity varied in different cases. Among serum proteins, leakage of IgG was most intensive and was seen within brain infarct area and at a distance from the infarct. Marked brain tissue infarct immunoreactivity against  $\alpha$ -1-antitrypsin, irrespectively of phagocyte infiltration, was noted. It is not known, whether it is connected with proteolytic activity in tissue breakdown initiation or a manifestation of an increase of the BBB permeability. Immunocytochemical investigations of the brain infarct facilitate appreciation of the BBB disturbances in the brain vascular diseases and provide more information, than routine histological methods.

## ОЦЕНКА ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ НЕКОТОРЫХ СЛУЧАЯХ ИНФАРКТА МОЗГА ЧЕЛОВЕКА. ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

### Резюме

Представлена иммуноцитохимическая характеристика нарушений гематоэнцефалического барьера (БВВ) у 5 больных, умерших в возрасте 50, 60, 83 и 87 лет с диагнозом мозгового инфаркта. Для оценки иммуноглобулина (IgG), фибриногена и альфа-2-макроглобулина, указывающих на проницаемость БВВ, использовался метод пероксидазы-антипероксидазы (Sternberger 1970). Фактор УШ, отмечающий эндотелий, выявил кровеносные сосуды. Реакция на альфа-1-антитрипсин обнаружила гематогенные фагоциты. Распространенная околососудистая и внутриклеточная иммунореактивность была обнаружена во всех случаях, однако в разных случаях ее интенсивность была различной. Среди протеинов плазмы проникновение IgG было наиболее интенсивным и определялось как в очаге некроза, так и в отдаленных тканях. Обнаружена значительная иммунореактивность некротических тканей против альфа-1-антитрипсина, независимо от наличия фагоцитов. Неизвестно, связано ли это с протеолитической энзиматической активностью в начальной стадии распада ткани или же это — проявление увеличенной проницаемости БВВ. Иммуноцитохимическое исследование мозгового инфаркта облегчает оценку нарушений гемато-энцефалического барьера при сосудистых заболеваниях мозга и дает больше информации, чем обыкновенные гистологические методы.

### PIŚMIENNICTWO

1. Alafuzoff J., Adolfsson R., Grundke-Iqbal J., Winblad B.: Perivascular deposition of serum protein in cerebral cortex in multi-infarct dementia. *Acta Neuropathol.* (Berll.), 1985, 66, 292–298.
2. Alafuzoff J., Adolfsson R., Grundke-Iqbal J., Winblad B.: Blood-brain barrier in Alzheimer dementia and non-demented elderly. An immunological study. *Acta Neuropathol.* (Berl.), 1987, 73, 160–166.
3. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697–706.
4. Barcikowska-Litwin M., Krajewski S., Dolińska E., Rafałowska J.: Lymphocytes within the infarct area in human brain. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 551–560.
5. Dorovini-Zis K., Bowman P. D., Betz A. L., Goldstein G. W.: Hyperosmotic urea reversibly open the tight junctions between brain capillary endothelial cells in cell culture. *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, 1987, 46, 130–140.
6. Gambetti P., Perry G., Autilio-Gambetti L.: Paired helical filaments: do they contain neurofilament epitopes? *Neurobiol. Aging*, 1986, 7, 451–452.
7. Goust J.-M., Mangum M., Powers J. M.: An immunologic assessment of brain-associated IgG in senile cerebral amyloidosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1984, 43, 481–488.



8. Grafe M. R., Forno L. S., Eng L. F.: Immunocytochemical studies of substance P and met-enkephalin in the basal ganglia and substantia nigra in Huntington's, Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1985, 44, 47–59.
9. Hornig C. R., Busse O., Dorndorf W., Kaps M.: Changes in CSF blood-brain barrier parameters in ischaemic cerebral infarction. *J. Neurol.*, 1983, 229, 11–16.
10. Ingram C. R., Phegan K. J., Blumenthal H. T.: Significance of an aging-linked neuron binding gamma-globulin fraction of human sera. *J. Gerontol.*, 1974, 29, 20–27.
11. Ito U., Mrsulja B. B., Fujimoto T., Klatzo I., Spatz M.: Effects of hypertension on the postischemic brain following temporary ischemia in gerbils. W: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. PZWL, Warszawa 1978, 73–78.
12. Jasin H. E.: Cross-linking of immune complexes by human mononuclear phagocytes. *Inflammation*, 1987, 11, 117–129.
13. Jesse R. L., Franson R. C.: Modulation of purified phospholipase A<sub>2</sub> activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 375, 467–470.
14. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Próby farmakologicznego przeciwdziałania rozwojowi zmian niedokrwiennych w mózgu królików po jego całkowitym niedokrwieniu. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 97–118.
15. Katzman R., Clasen R., Klatzo I., Myer J. S., Pappius H. M.; Waltz A. G.: Brain edema in stroke. *Stroke*, 1977, 8, 510–540.
16. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *The nervous system – the basic neuroscience*. Red. D. B. Tower, Raven Press, New York, 1975, 313–332.
17. Lee J. C.: Anatomy of the blood-brain barrier under normal and pathological conditions. W: *Histology and histopathology of the nervous system*. Red. W. Haymaker, R. D. Adams Ch. C. Thomas Springfield, Illinois, 1982, I, 798–870.
18. McCombe P. A., Clarck P., Frith J. A., Hammond S. R., Stewart G. I., Pollard J. D., McLeod J. G.: Alpha<sub>1</sub>-antitrypsin phenotypes in demyelinating disease: An association between demyelinating disease and the allele P and M3. *Ann. Neurol.*, 1985, 18, 514–515.
19. 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.
20. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Ito U., Fujimoto T., Walker T., Spatz M., Klatzo I.: Cerebral ischemia: some new aspects of postischemic period. W: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Red. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh, PZWL, Warszawa, 1978, 48–52.
21. Nukina N., Kosik K., Selkoe D., Ihara Y.: The protein in integrated into paired helical filaments (PHF) in Alzheimer's disease (AD). *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1986, 45, 338 Abstr.
22. Oehmichen M.: Functional properties of microglia. W: *Recent Advances in Neuropathology*. Red. W. T. Smith, J. B. Cavanagh. Churchill Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne, New York, 1982, 84–107.
23. Rapoport S. J.: Opening of the blood-brain barrier by acute hypertension. *Exp. Neurol.*, 1976, 52, 467–479.
24. Schelper R. L., Adrian E. K.: Monocytes become macrophages: they do not become microglia: a light and electron microscopic autoradiographic study using 125-iododeoxyuridine. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1986, 45, 1–19.
25. Seitz R. J., Wechsler W.: Immunohistochemical demonstration of serum proteins in human cerebral gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 1987, 73, 145–152.
26. Selkoe D. J.: Altered structural proteins in plaques and tangles what do they tell us about the biology of Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging.*, 1986, 7, 425–431.
27. Sternberger L. A., Hardy P. H. Jr, Cuculis F. F., Meyer H. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.*, 1970, 18, 315–333.



28. Westergaard E., Go G. K., Klatzo I., Spatz M.: Enhanced vesicular transport of horseradish peroxidase across cerebral vessels induced by ischemia in Mongolian gerbils. W: Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension. Red. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh, PZWL, Warszawa, 1978, a, 53–59.
29. Westergaard E., van Deurs B., Brondsted H. E.: Increased permeability of cerebral endothelium caused by acute hypertension. W: Pathophysiological biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and hypertension. Red. M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. PZWL, Warszawa, 1978, b, 179–185.

Adres autorów: Klinika Neurologiczna A.M. ul. Banacha 1A, 02-097 Warszawa



PIOTR OLEJNICZAK

## MIOKLONIE PODNIEBIENIA A PRZEROST OLIVEK. OPIS PRZYPADKU

Katedra Neurologii, Akademia Medyczna, Wrocław

Mioklonie podniebienia (*nystagmus veli palatini*, drżenie podniebienia) cechuje regularny wahadłowy rytm i utrzymywanie się w czasie snu, co je wyróżnia spośród innych mioklonii (Kinsborne, Rosenfield 1975; Rudkowska i wsp. 1975), być może z wyjątkiem tych, które występują w przebiegu zapaleń mózgu (Kinsborne, Rosenfield 1975). Częstość drgań waha się od 20 do ponad 180 na minutę (Herrmann i wsp. 1957; Herrmann, Brown 1967; Kaps, Kisselbach 1983). Mioklonie podniebienia są przeważnie symetryczne, rzadko początkowo jednostronne. W niektórych postaciach ruchy mimowolne szerzą się na mięśnie gardła i krtani (mioklenie gardłowe i krtaniowe), a nawet mogą rozprzestrzeniać się na mięśnie dźwigacza kąta ust, napinacze błony bębenkowej, mięśnie dna jamy ustnej, dolnej części twarzy, przepony, mięśnie międzyżebrowe. Takie mioklonie obejmują więc mięśnie oralno-skrzelowo-oddechowe (Herrmann, Brown 1967; Bonduelle 1968; Kinsborne, Rosenfield 1975). Wyjątkowo opisywano przypadki mioklonii podniebienia i gałek ocznych (Dobson, Riley 1941; Chocroverty 1969).

Szczególnym objawem może być rytmiczny dźwięk słyszalny przez chorego, a czasami jego otoczenie, wskutek mioklonicznych drgań mięśnia zamykającego trąbkę Eustachiusza (Bjørk 1954; Morris, Heller 1962; Gryczyńska 1972). Dźwięk ten wysłuchiwałem u dwu innych chorych z miokloniami podniebienia i objawami uszkodzenia pnia mózgu.

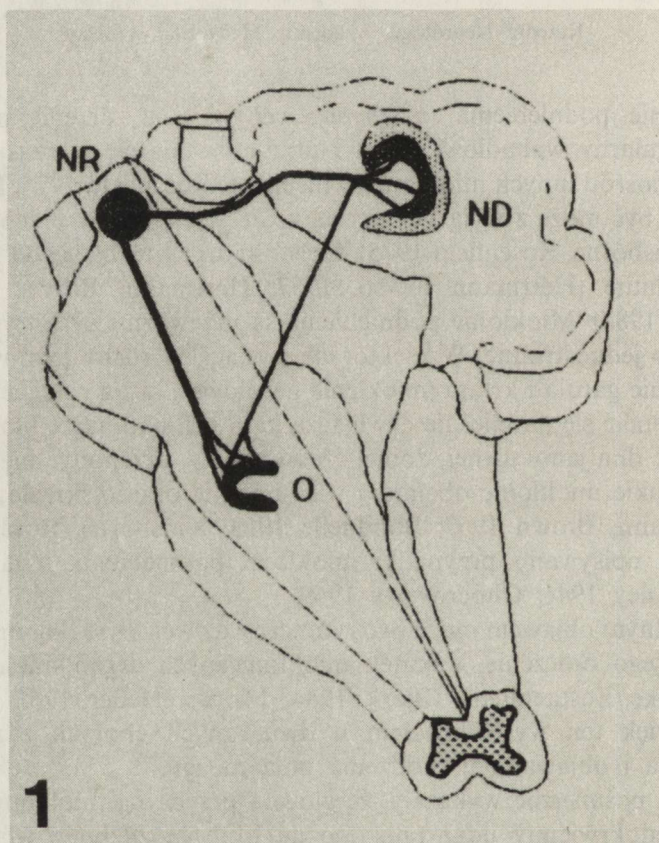
Badania pośmiertne wykazały, że główną przyczyną mioklonii podniebienia jest niedokrwienny udar pnia mózgu i/lub mózdzku z właściwą sobie symptomatologią (Kinsborne, Rosenfield 1975; Rudkowska i wsp. 1975). Opisywano je również w guzach i malformacjach naczyniowych mózgowia, jego urazach, zapaleniach, także w jamistości rdzenia przedłużonego i stwardnieniu zanikowym bocznym (Swanson i wsp. 1962).

Omawiane mioklonie występują wskutek uszkodzenia pęczka środkowego nakrywki, jądra zębatego i drogi zębato-oliwkowej (Guillain, Mollaret 1931;



Matsuo, Ajax 1979; Kaps, Kisselbach 1983). Są to części tzw. trójkąta Mollareta (*nucleus dentatus* – *nucleus ruber* – *olivae*) (ryc. 1). Włókna nerwowe tworzące ten trójkąt wychodzą z jądra zębatego mózdzku i podzielone somatotycznie wnikają do górnej części robaka mózdzku i jego konarów górnych, w dalszym przebiegu krzyżują się w tzw. spoidle Wernekincka, wnikając do przeciwstawnego jądra czerwienego i dalej biegną w pniu mózgu w obrębie środkowego pęczka nakrywki do oliwek dolnych, a stamtąd z powrotem przez konary dolne mózdzku do jądra zębatego (Brodal 1940; Lapresle, Hamida 1970).

Poza połączeniami idącymi z jądra czerwienego liczne włókna drogi środkowej nakrywki biegnące do oliwek dolnych pochodzą z kory mózgu oraz z okołowodociągowej istoty szarej śródmózgowia. Niektóre włókna aferentne



Ryc. 1. Schematyczne przedstawienie trójkąta Mollareta według Kapsa i Kisselbacha (1983). ND – *nucleus dentatus*, O – *olivae*, NR – *nucleus ruber*. Odcinek NR–O przebiega w pęczku środkowym nakrywki

Fig. 1. Schematic depiction of the triangle of Mollaret after Kaps and Kisselbach (1983). ND – dentate nucleus, O – inferior olives, NR – red nucleus. The section NR–O runs within the medial longitudinal fasciculus



do oliwek dolnych pochodzą z dolnego jądra przedsionkowego, z części jądra pasma rdzeniowego nerwu trójdzielnego oraz z przeciwstronnych głębokich jąder mózdzku (Carpenter 1985). Włókna rdzeniowo-oliwkowe są najważniejszym wstępującym szlakiem aferentnym oliwek dolnych. Stanowią one ogniwo w kręgu połączeń rdzeniowo-mózdkowych.

Aksony komórek oliwki dolnej krzyżują się w szwie pośrodkowym, zawijają w kierunku tylnobocznym i wnikają do przeciwnej strony mózdzku przez jego konary dolne. Skrzyżowanie włókna oliwkowo-mózdkowego stanowią największy składnik konaru dolnego mózdzku i biegną do wszystkich części kory mózdzku oraz głębokich jąder mózdzku (Brodal 1940).

Zmiany w przebiegu drogi zębato-czerwiennie-oliwkowej lub pęczka środkowego nakrywki wywołują tzw. przerostowe zwyrodnienie oliwek dolnych (Herrmann, Brown 1967; Alajouanine, Hornet 1968; Lapresle, Hamida 1970; Jellinger 1973; Halliday 1975) wyrażające się powiększeniem ich neuronów (Alajouanine, Hornet 1968). Przerostowe zwyrodnienie oliwek dolnych nie zawsze łączy się z miokloniami podniebienia (Bonduelle 1968; Halliday 1975).

#### OPIS PRZYPADKU

Mężczyzna 61-letni, pracownik naukowy (hist. chor. nr 302/73) przebywał w Klinice Neurologicznej AM we Wrocławiu dwukrotnie w latach 1973–1974. Rozpoznano cukrzycę i rozlany proces miażdżycowy, zwłaszcza tętnic mózgowych. Wystąpił początkowo połowiczny niedowład lewostronny, potem dołączyły się prawostronne objawy mózdkowe oraz zespół opuszkowy, który doprowadził do anartrii i dysfagii na rok przed śmiercią.

Obserwowano mimowolne nierytmiczne ruchy podniebienia miękkiego o częstotliwości 2c/s (tj. 120/min), utrzymujące się we śnie, które zarejestrowano w emg. Opis tych mioklonii podano w pracy Rudkowskiej i wsp. (1975).

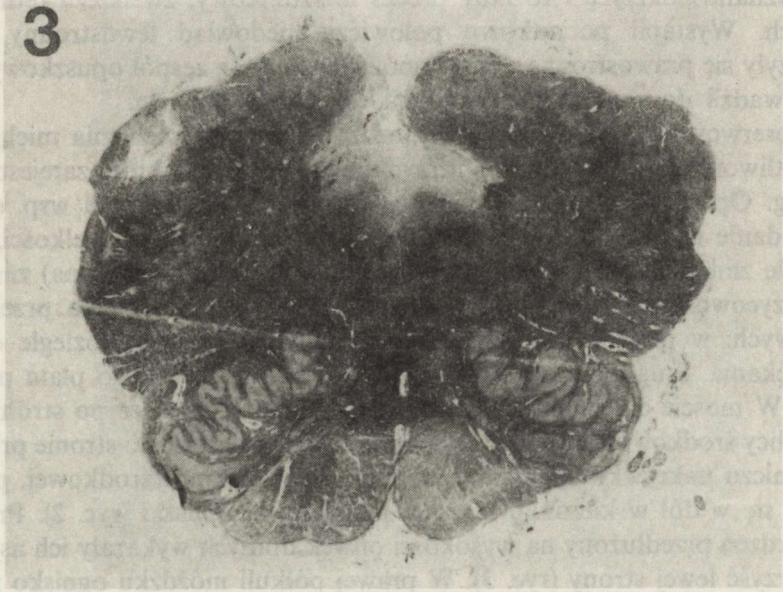
Badanie neuropatologiczne (nr 1014/74). Mózg średniej wielkości, opony miękkie zmleczale. Naczynia podstawy (w tym tętnica podstawna) zmienione miażdżycowo. W prawej tętnicy mózgu tylnej – zakrzep. Na przekrojach czołowych: w płatach czołowym i ciemieniowym prawym rozległe ognisko rozmiękania, drugie ognisko widoczne na podstawie prawego płata potylicznego. W moście dwa ogniska rozmiękania bladego: większe po stronie lewej w okolicy środkowo-podstawnej w pobliżu szwu, mniejsze po stronie prawej na pograniczu nakrywki i podstawy bocznie od wstęgi przyśrodkowej, przedłużające się w dół w kierunku bocznej powierzchni opuszki (ryc. 2). Przekroje przez rdzeń przedłużony na wysokości oliwek dolnych wykazały ich asymetrię na korzyść lewej strony (ryc. 3). W prawej półkuli mózdzku ognisko rozmiękania w obszarze jądra zębatego.

Badanie mikroskopowe ujawniło w ogniskach rozmiękania cechy rozbiórki ruchowej. „Przerosła” oliwka dolna cechowała się pozornie zwiększoną gęstością neurocytów wskutek ich powiększenia (ryc. 4). Komórki te nie wykazywały cech zwyrodnienia w obrazach rutynowych (mikroskopu świetlnego).



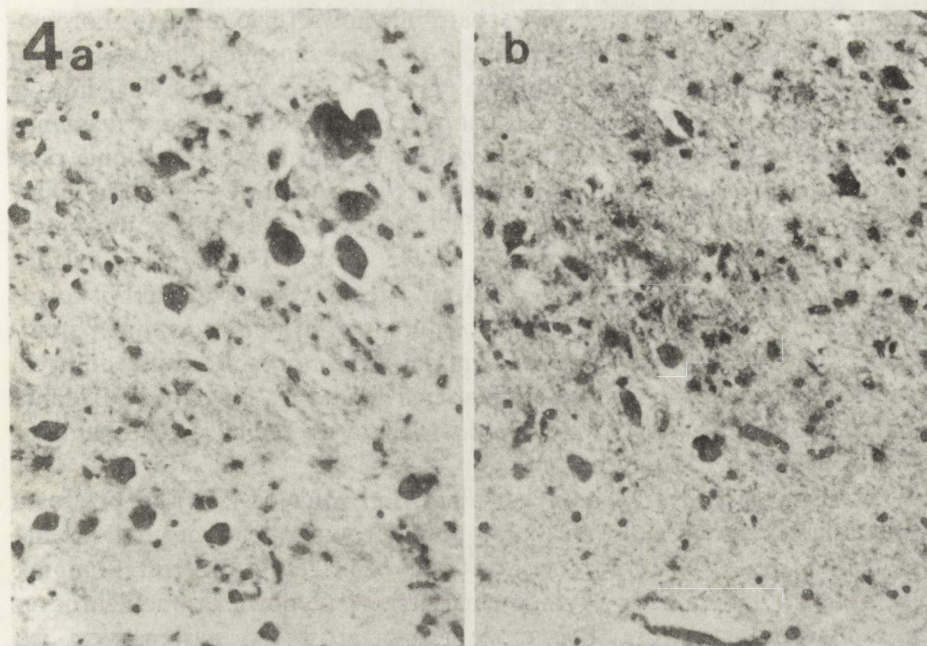


Ryc. 2. Przekrój mostu. Widoczne dwa ogniska martwicy bladej. Heidenhain. Pow. lupowe 5 ×  
 Fig. 2. Frontal section through the pons. Two foci of pale infarctions are visible.  
 Heidenhain. × 5



Ryc. 3. Przekrój przez rdzeń przedłużony na wysokości 1/3 dolnej opuszki. Po lewej stronie wstęgi oliwki dolnej wyraźnie pogrubiały. Po stronie prawej ognisko rozmiękania i demielinizacja w grzbietowo-bocznej części opuszki. Heidenhain. Pow. lupowe 5 ×  
 Fig. 3. Frontal section through the inferior third of the medulla. On the left side olivary ribbons are thickened. In the dorso-lateral part on the right side necrotic focus and demyelination are seen.  
 Heidenhain. × 5





Ryc. 4a. Przekrój przez oliwkę dolną po stronie lewej. Neurony znacznie powiększone w porównaniu ze stroną prawą. H-E. Pow. 625 ×

Fig. 4a. Frontal section through the inferior olive on the left side. Neurons are markedly hypertrophied as compared with their counterparts on the right side. H-E. × 625

Ryc. 4b. Przekrój przez oliwkę dolną po stronie prawej. H-E. Pow. 625 ×

Fig. 4b. Frontal section through the inferior olive on the right side. H-E. × 625

#### OMÓWIENIE

W opisanym przypadku mioklonie podniebienia wystąpiły w przebiegu nawracających udarów mózgu u chorego z cukrzycą i miażdżycą tętnic mózgu. Choroba ta doprowadziła do licznych ognisk rozmiękania (dwa w prawej półkuli mózgu, jedno w prawym jądrze zębatym mózdzku oraz dwa w moście). Wykryto ponadto drobne ognisko rozmiękania w bocznej części opuszki po prawej stronie. Po lewej stronie stwierdzono powiększenie dolnej oliwki, które odpowiadało transneuronalnemu „zwyrodnieniu” przerostowemu jakie występuje wskutek uszkodzenia drogi zębato-oliwkowej, biegnącej z przeciwstronnego jądra zębatego mózdzku. Droga ta została uszkodzona co najmniej w dwóch miejscach (prawe jądro zębate oraz lewa połowa pnia mózgu). Zapewne przerwane były nadto połączenia korowo-oliwkowe biegnące w środkowej drodze nakrywki po lewej stronie. Uszkodzenia te mogły być przyczyną symetrycznych mioklonii podniebienia (Kaps, Kisselbach 1983).

Występowanie mioklonii podniebienia łączy się z zagadnieniem tzw. funkcji fazowych w układzie nerwowym (fazy snu i czuwania, wahania neurohormonalne, oczopląs, itp.), w tym przypadku patologicznych, powstałych zapewne wskutek ustania bodźców hamujących (Swanson i wsp. 1962; Herrmann,



Brown 1967), przewodzonych drogą zębato-oliwkową i być może też korowo-oliwkową. Pojęcie funkcji fazowych łączy się z zagadnieniem biocybernetyki (Jovanović 1976). Patologiczne lub fizjologiczne wahania równowagi między dopływem bodźców pobudzających i hamujących powoduje albo wygaszenie, albo uwolnienie spod kontroli automatyzmów biologicznych. Mioklonie podniebienia uważane są przez Laforę (1955) oraz Swansona i wsp. (1962) za objaw deliberacyjny z pnia mózgu. Scheibel i Scheibel (1955) uważają, że bogactwo połączeń dendrytycznych predysponuje oliwki do synchronicznych wyładowań, które fizjologicznie podlegają kontroli zstępujących dróg nakrywkowo-oliwkowych. Kloniczne skurcze podniebienia mogą być powodowane patologicznymi niekontrolowanymi wyładowaniami w komórkach oliwek dolnych. Herrmann i Brown (1967) nazwali ten fenomen „padaczką oliwkową”. Badania elektrofizjologiczne (Eccles i wsp. 1966) wskazują na pobudzający charakter dróg oliwkowo-mózdkowych.

W przedstawionym przypadku potwierdzono istnienie zjawiska przerostu transneuronalnego oliwek dolnych, który powstaje w następstwie uszkodzenia drogi zębato-oliwkowej w obrębie „trójkąta Mollareta”. Przerost komórek oliwek dolnych nie ma cech zwyrodnienia, przeciwnie powiększone neurocyty mają zachowaną strukturę. Być może ich przerost jest następstwem ich nadmiernej czynności tj., odhamowania funkcji fazowych, która doprowadza do mioklonii nie znikających we śnie.

#### PALATAL MYOCLONUS AND OLIVARY HYPERTROPHY. CASE REPORT

##### Summary

A case is described of a 61-year-old diabetic patient with palatal myoclonus in the course of multiple strokes. Autopsy revealed multiple infarcts in the cerebral hemispheres, right dentate nucleus of the cerebellum and in the brainstem. Left-sided olivary hypertrophy was noted. The phenomenon of transneuronal olivary hypertrophy resulting from damage to the dento-olivary pathway has thus been confirmed. The hypertrophied cells did not show any signs of degeneration.

#### МИОКЛОНИИ НЕБА И ГИПЕРТРОФИЯ ОЛИВ — ОПИСАНИЕ СЛУЧАЯ

##### Резюме

Описан патологический материал от 61-летнего мужчины, больного диабетом, у которого в результате множественных мозговых инсультов появились миоклонии неба. Вскрытие показало ишемические очаги в мозговых полушариях, в правом зубчатом ядре мозжечка и в стволе мозга. Обнаружена также гипертрофия нижних олив с левой стороны. Подтвержден феномен трансневральной гипертрофии олив, вызванной повреждением зубчато-оливарного пути. Гипертрофические клетки не проявляли признаков дегенерации.



## PIŚMIENNICTWO

1. Alajouanine T., Hornet T.: Myoclonies de desafferentation olivaire. *Rev. Neurol.*, 1968, 119, 143–146.
2. Bonduelle M.: The myoclonias. W: *Disease of the basal ganglia*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. North Holland Publishing Company, Amsterdam 1968.
3. Bjørk H.: Objective tinnitus due to clonus of the soft palate. *Acta Otolaryngol. (Suppl)*, 1954, 116–139.
4. Brodal A.: Experimentelle Untersuchungen über die olivocerebellare Lokalisation. *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.*, 1940, 169–153.
5. Carpenter M. B.: *Core text of neuroanatomy*. Williams and Wilkins, Baltimore 1985.
6. Chocroverty S.: Palatal myoclonus and rhythmic ocular movements: A polygraphic study. *Neurology*, 1969, 19, 975; cyt. za Lapresle, Hamida 1970).
7. Dobson J. P., Riley H. A.: Rhythmic myoclonus. A clinical report of six cases. *Arch. Neurol. Psychiatr. (Chic.)*, 1941, 45, 145; cyt. za Jovanovic 1976).
8. Eccles J., Llinas R., Sasaki K.: The excitatory synaptic action of climbing fibres on the Purkinje cells of the cerebellum. *J. Physiol.*, 1966, 182, 268–296.
9. Gryczyńska D.: Przypadek obiektywnych szumów usznych w przebiegu mioklonii podniebienia. *Otolaryngol. Pol.*, 1972, 26, 593; cyt. za Lapresle, Hamida 1970).
10. Guillain G., Mollaret P.: Deux cas de myoclonies synchrones et rythmes velo-pharyngo-oculo-diaphragmatiques. *Rev. Neurol.*, 1931, 2, 545–566.
11. Halliday A. M.: The neurophysiology of myoclonic jerking – a reappraisal. W: *Myoclonic seizures*. Red. M. H. Charlton. *Excerpta Med.* Amsterdam, 1975, 1–29.
12. Herrmann C., Crandall P., Fang H.: Palatal myoclonus. *Neurology*, 1957, 7, 37–51.
13. Herrmann C. Jr., Borwn J. W.: Palatal myoclonus: A reappraisal. *J. Neurol. Sci.*, 1967, 5, 473–492.
14. Jellinger K.: Hypertrophy of the inferior olives. *Z. Neurol.*, 1973, 205, 153–174.
15. Jovanovic V. J.: Schlaf und Vegetatives Nervensystem. W: *Klinische Pathologie des vegetativen Nervensystems*, Red. A. Sturm, W. B. Birkmayer. Fischer Verlag (Jena) 1976, 363–450.
16. Kaps M., Kisselbach G.: Stimmbandmyoklonus. Ein kasuistischer Beitrag zum Syndrom der Arteria cerebelli inferior posterior. *Arch. Psychiatr. Nervenkr.*, 1983, 233, 409–414.
17. Kinsborne M., Rosenfield D. B.: Nonprogressive myoclonus. W: *Myoclonic seizures*. Red. M. H. Charlton, *Excerpta Med.*, Amsterdam 1975, 30–59.
18. Lafora G.: Myoclonus. Physiological and pathological considerations. *Proc. 2nd Internat. Congr. Neuropathol.*, London 1955, 9–21.
19. Lapresle J., Hamida M. B.: The dentato-olivary pathway. *Arch. Neurol.*, 1970, 22, 135–143.
20. Matsuo F., Ajax E. T.: Palatal myoclonus and denervation supersensitivity in the central nervous system. *Ann. Neurol.*, 1979, 5, 72–78.
21. Morris F., Heller M.: Vibratory tinnitus and palatal myoclonus. *Acta Otolaryngol.*, 1962, 55, 292; cyt. za Lafora 1955).
22. Rudkowska A., Podemski R., Borodulin L., Gruszka A.: Mioklonie podniebienia: analiza kliniczno-elektrofizjologiczna. *Pol. Tyg. Lek.*, 1975, 30, 15–17.
23. Scheibel M., Scheibel A.: The inferior olive. *J. Comp. Neurol.*, 1955, 102, 77–132.
24. Swanson P. D., Luttrell C., Magladery J.: Myoclonus. A report of 67 cases and review of the literature. *Medicine*, 1962, 41, 339–356.

Adres autora: Katedra Neurologii AM, ul. Traugutta 118, 50-420 Wrocław.



ANNA TARASZEWSKA

## ULTRASTRUCTURE OF AXONS IN DISTURBED CNS MYELINATION IN pt RABBIT

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

The mechanisms of axonal influence on myelination during all phases of myelin sheaths formation and their involvement in affected myelination are up till now not completely understood. The role of axons is thought to be essential for initiation of the myelination process and for regulation of the amount of myelin production. Morphological studies of central and peripheral nervous system myelination indicate a relationship between the caliber of axons and the onset and sequence of their myelin sheaths development (Matthews, Duncan 1971), the sheath thickness (Friede 1972; Wender, Goncerzewicz 1986) and length of their internodes (Hess, Young 1949). It has also been established, that in the central nervous system a single oligodendrocyte can myelinate simultaneously several axons of varying caliber and form myelin sheaths of different thickness matched to the axonal size (Waxman, Sims 1984). These observations suggest, that development of myelin is dependent not only on glial myelin-forming cells, but also upon the control of factors related with the growth and size of the axons. It seems, that these factors can also play an important role in myelination pathology.

In the pt rabbit mutant with CNS hypomyelination, quantitative evaluation of myelination disturbances revealed a relationship between the size of nerve fibers and the severity of hypomyelination in the optic nerve and corpus callosum (Taraszewska, Zelman 1985, 1986). Myelination in pt rabbit is delayed, prolonged and incomplete and these disturbances affect more severely the small axons with diameter  $< 0.5 \mu\text{m}$  than axons of larger calibers. Furthermore, retarded and arrested growth of axons in corpus callosum has been established (Taraszewska, Zelman 1986).

Like in other known mutants with CNS hypomyelination, the myelin deficit in the pt mutant is connected directly with the abnormalities of oligodendroglial cells, namely, with their delayed differentiation and maturation (Taraszewska, Zelman 1987). Coincident changes observed in astrocytes



(Taraszewska 1986; Taraszewska, Zelman 1987) and in neurons (Taraszewska, Zelman 1981) indicate, that alternations are not limited to one cell type only, however, the primary pathogenetic cause of these changes has not as yet been elucidated.

This report presents the electron-microscopic pattern of myelinating axons of the central nervous system in pt rabbits in comparison with axons in control rabbits at various myelination periods. The purpose of these studies was to qualify axonal changes associated with abnormal myelination and to discuss their possible significance in the pathology of myelin sheath development in the pt mutant.

#### MATERIAL AND METHODS

The study was performed on the material of 24 pt rabbits and 20 control rabbits at the age of 2, 8, 14 days, 1, 2, 3 months and on adults. From 14 pt and 14 control rabbits, the optic nerves, corpus callosum and dorsal funiculi of the spinal cord were examined for each age and these studies were in part performed on material previously used for morphometric evaluation of the myelination process (Taraszewska, Zelman 1985, 1986). In addition, the cerebellum and medulla oblongata were examined in 10 pt and 6 control rabbits at the age of 1–3 months. In each age group at least two pt rabbits and 2 control animals were used for study.

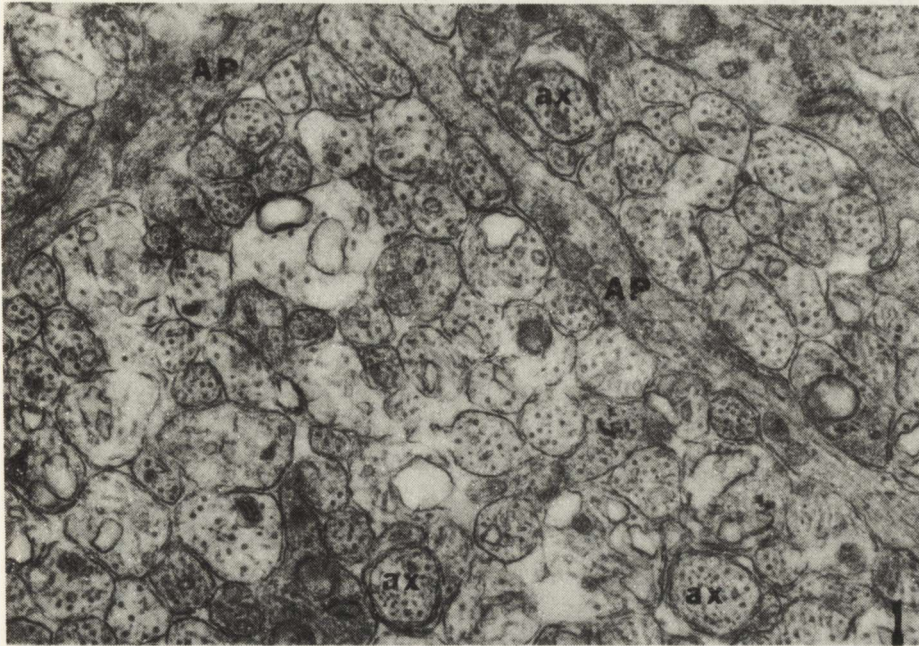
The animals were anesthetized with 8% chloralhydrate by intraperitoneal injection of 0.5 ml per 100 g body weight and perfused through the aorta ascendens with a solution of 3.9% glutaraldehyde in 0.4 M phosphate buffer (pH 7.6). The tissue specimens were postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in ethanol and propylene oxide and embedded in Epon. Ultrathin sections stained with uranyl acetate and lead citrate were examined with a JEM 100B electron microscope.

The ultrastructural pattern of axons was evaluated in pt and control rabbits of the same age in separate brain structures, taking into consideration the different myelination time of these structures. The results are presented together for the whole examined material.

#### RESULTS

In the premyelination period, the axons showed in cross-section a similar ultrastructural pattern in pt and control rabbits. Axoplasm contained mainly microtubules, concomitant with neurofilaments, occasionally mitochondria and lamellar bodies and relatively frequent vesiculotubular profiles of smooth membranes (Fig. 1). Arrangement of axons and glial processes was, however, more irregular in pt rabbits (Fig. 2) as compared with controls. Astrocytic processes characterized by the presence of glial filaments and glycogen granules were more numerous in pt rabbits and their multiple branches were inter-





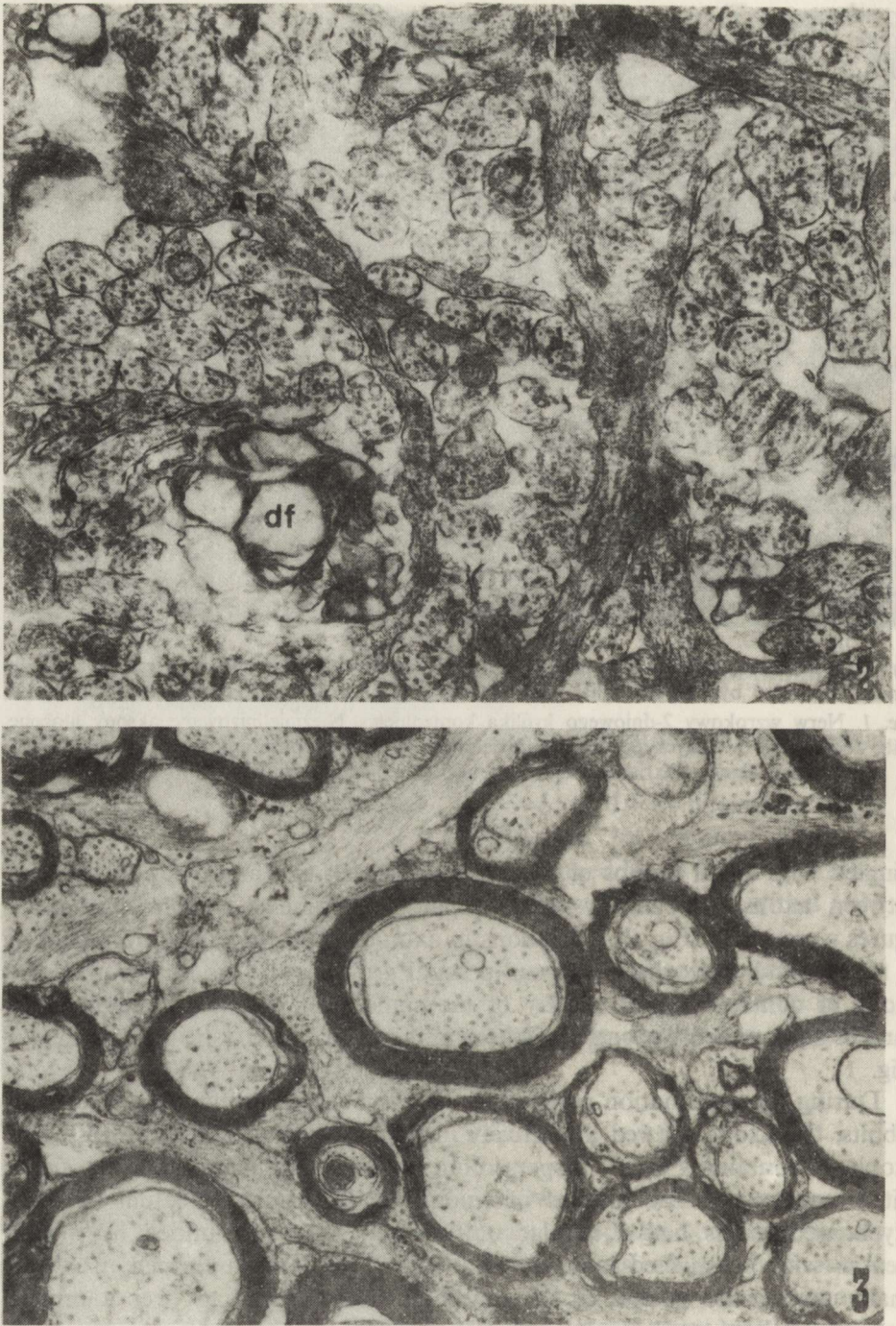
*Fig. 1.* Optic nerve of 2-day-old control rabbit. Unmyelinated axons closely arranged in large bundles separated by long astroglial processes (AP). Some axons (ax) are ensheathed.  $\times 25230$   
*Ryc. 1.* Nerve wzrokowy 2-dniowego królika kontrolnego. Niezmielinizowane aksony ułożone ściśle obok siebie w dużych pęczkach rozdzielonych długimi wypustkami astroglejowymi (AP). Niektóre aksony (ax) są otoczone wypustkami mielinizacyjnymi. Pow.  $25230 \times$

mingled with small groups of axons or single axons. The extracellular space between axons was usually enlarged and sometimes vacuolar myelin-like figures were noted (Fig. 2). Variations in axon calibers were also prominent in pt rabbits and were observed even in small groups of axons. In contrast, the axons in control rabbits, mostly of the same size, were arranged in large bundles surrounded by long, straight-running branches of astrocytic processes (Fig. 1).

During the myelination period and after the end of myelination in control rabbits, the axons showed a relatively uniform appearance of electron-lucent axoplasm containing evenly dispersed microtubules and neurofilaments, single mitochondria and few profiles of smooth endoplasmic reticulum (Fig. 3). Myelinated axons had a regular outline and were surrounded by myelin sheaths with compacted lamellae. The innermost lamella formed usually a small cytoplasmic pocket of the inner mesaxon, extending over a limited segment of the axonal circumference. Larger cytoplasmic layers surrounding the whole axon circumference were seen only in sheaths consisting of few myelin lamellae in an early stage of their development.

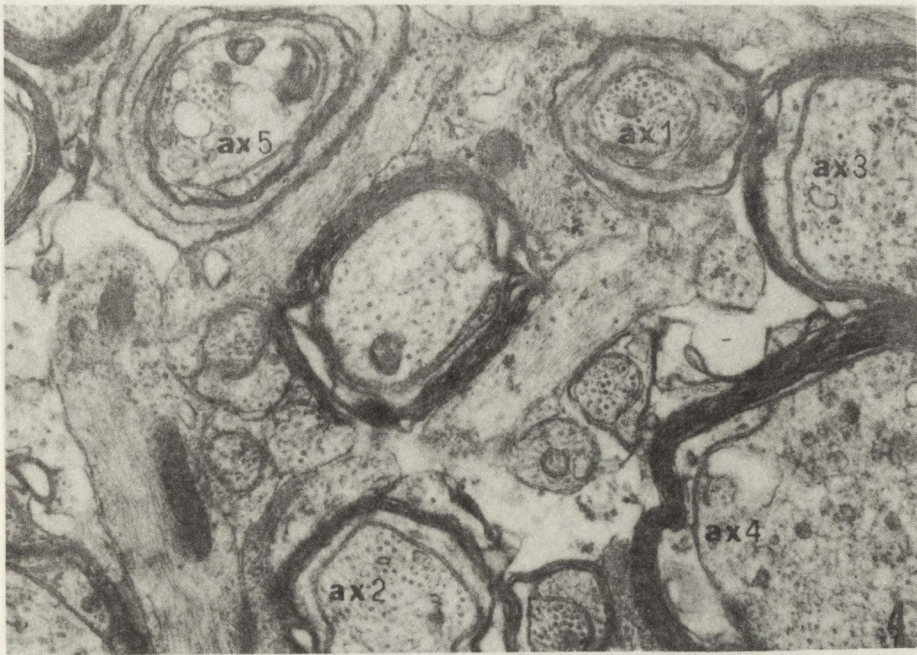
In contrast to control material, in pt rabbits great variability in the





*Fig. 2.* Optic nerve of 2-day-old pt rabbit. Unmyelinated axons divided into irregular groups by numerous branches of astroglial processes (AP). Enlarged extracellular space and degenerating figures (df) between axons  $\times 26500$





*Fig. 4.* Optic nerve of 1-month-old pt rabbit. Varied changes in axoplasm of myelinated axons: increased density of microtubules (ax1, ax2), numerous profiles of axoplasmic reticulum and uneven distribution of neurofilaments (ax2, ax3), disintegration of axoplasmic components and degenerating axons (ax4, ax5).  $\times 23530$

*Ryc. 4.* Nerw wzrokowy 1-miesięcznego królika pt. Zmiany o różnym nasileniu w aksoplazmie zmielinizowanych aksonów: zagęszczenie mikrotubul (ax1, ax2), liczne profile siateczki aksoplazmatycznej i nierównomierne rozmieszczenie neurofilamentów (ax2, ax3), rozpad składników aksoplazmy i zmiany zwyrodnieniowe (ax4, ax5). Pow. 23530  $\times$

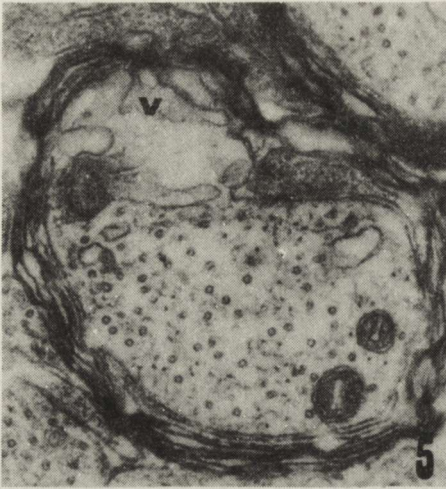
ultrastructural pattern of myelinated axons, concerning the appearance both of axoplasm and surrounding myelin sheaths was observed during the myelination period. In the majority of fibers, the axoplasmic changes were slight and consisted in increased content of microtubules and of smooth-walled vesicles, especially in the early period of myelination (Fig. 4 and 5), as well as increased density of neurofilaments (Fig. 6) and in their uneven distribution. Most advanced changes were represented by a fine granular, osmophilic appearance

*Ryc. 2.* Nerw wzrokowy 2-dniowego królika pt. Niezmielinizowane aksony rozdzielone na nieregularne grupy przez liczne rozgałęzienia wypustek astroglejowych (AP). Między aksonami widoczne figury zwyrodnieniowe (df) oraz poszerzona przestrzeń pozakomórkowa. Pow. 26500  $\times$

*Fig. 3.* Optic nerve of 1-month-old control rabbit. Myelinated axons with normal appearance of axoplasm and myelin sheaths.  $\times 23530$

*Ryc. 3.* Nerw wzrokowy 1-miesięcznego królika kontrolnego. Zmielinizowane aksony z prawidłowym obrazem aksoplazmy i osłonek mielinowych. Pow. 23530  $\times$





*Fig. 5.* Optic nerve of 14-day-old pt rabbit. Axon with irregular contour. At axolemma aggregation of disrupted smooth membrane vesicles (v). Myelin sheath with irregularly, loosely arranged lamellae.  $\times 37880$

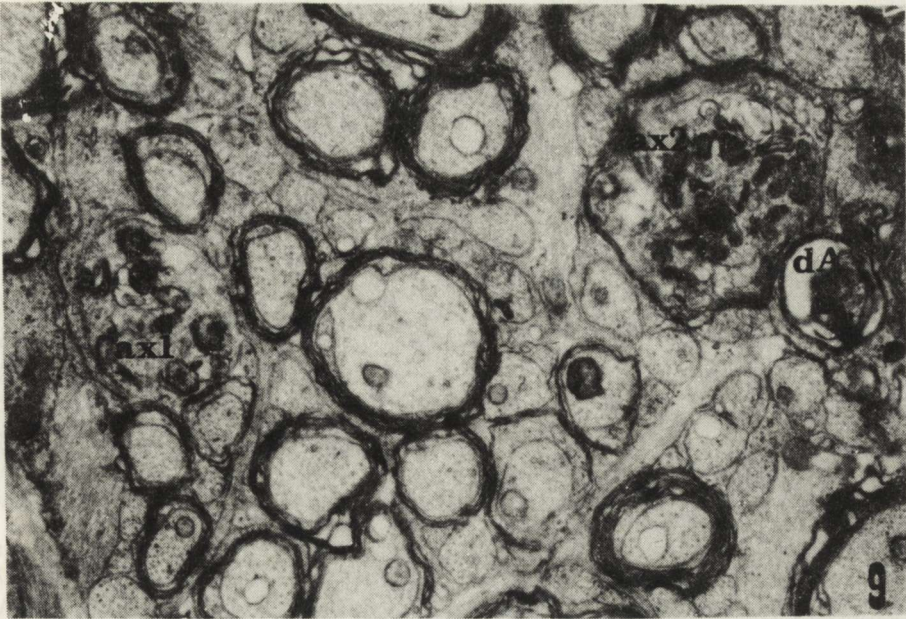
*Ryc. 5.* Nerw wzrokowy 14-dniowego królika pt. Akson o nieregularnym obwodzie. Przy błonie aksonalnej skupienie rozpadających się pęcherzyków błon gładkich (v). W osłonce mielinowej luźny, nierówny układ blaszek. Pow. 37880  $\times$

*Fig. 6.* Optic nerve of 3-month-old pt rabbit. Axon with irregular outline showing deep indentation of axoplasm (x) and increased density of neurofilaments and microtubules. Very thin myelin sheath with distorted folds and disintegration of lamellae (dM).  $\times 22020$

*Ryc. 6.* Nerw wzrokowy 3-miesięcznego królika pt. Akson o nieregularnym obwodzie z głębokim wgłobieniem aksoplazmy (x) i zagęszczeniem neurofilamentów i mikrotubul. Bardzo cienka osłonka mielinowa z poskręcanymi pętłami i rozpadem blaszek mielin. Pow. 22020  $\times$

*Fig. 7.* Medulla oblongata of 14-day-old pt rabbit. Axon with granular disintegration of axoplasm (dA) and abnormal myelin sheath. Large fragment of oligodendroglial cytoplasm in outer part of sheath (dM).  $\times 16700$





*Fig. 9.* Optic nerve of 1-month-old pt rabbit. Accumulation of convoluted lamellar electron-dense bodies in axoplasm of both unmyelinated (ax1) and thinly myelinated (ax2) axons. Electron-dense axon (dA) is present nearby.  $\times 13570$

*Ryc. 9.* Nerw wzrokowy 1-miesięcznego królika pt. Nagromadzenie kłębiastych blaszkowych ciał elektronowo-gęstych w aksoplazmie aksonu niezmielinizowanego (ax1) i w aksonie z cienką osłonką mielinową (ax2). Obok widoczny elektronowo-gęsty akson (dA). Pow. 13570  $\times$

of the axoplasm with disintegration of all axoplasmic constituents (Fig. 4 and 7) and occurrence of dark degenerated axons (Fig. 8, 9 and 10). Some axons exhibited accumulation of multiple polymorphic dense bodies, membraneous structures and degenerated mitochondria in the axoplasm (Fig. 9 and 10). Altered axons were often surrounded by very thin myelin sheaths or completely deprived of them. These changes were observed in pt rabbits both in the myelination period and after it then in adult mutants (Fig. 10). Some similar changes were seen also in control rabbits but very rarely.

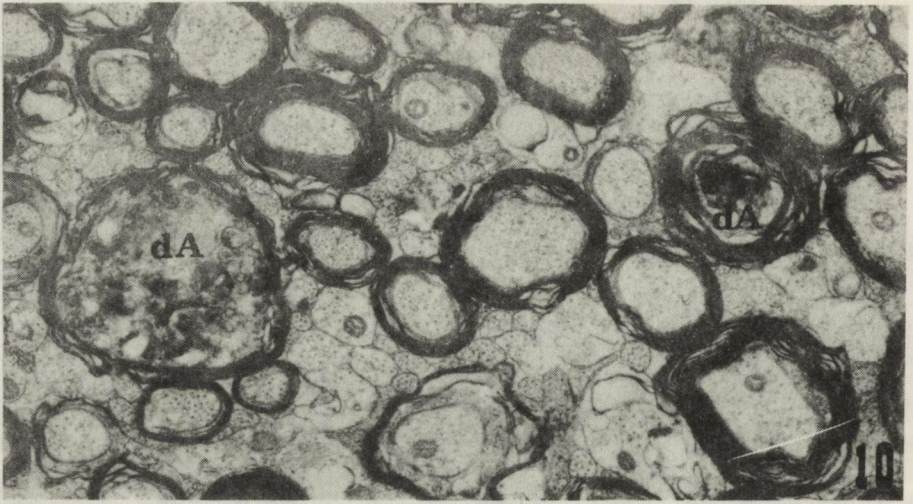
---

*Ryc. 7.* Rdzeń przedłużony 14-dniowego królika pt. Akson z ziarnistym rozpadem aksoplazmy (dA) i zmienioną osłonką mielinową. W zewnętrznej części osłonki duży fragment cytoplazmy oligodendrogleju (dM). Pow. 16700  $\times$

*Fig. 8.* Cerebellum of 2-month-old pt rabbit. Myelinated axons (dA) with electron-dense axoplasm and convoluted myelin. An axon (ax) with irregular profile and thin myelin sheath.  $\times 8560$

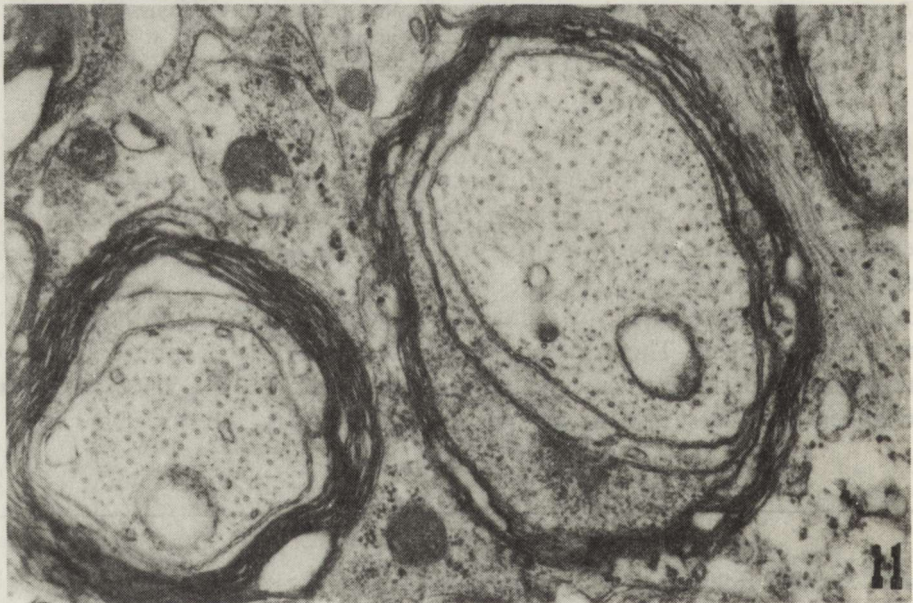
*Ryc. 8.* Mózdzek 2-miesięcznego królika pt. Zmielinizowane aksony (dA) z elektronowo-gęstą aksoplazmą i skłębioną mieliną. Akson (ax) o nieregularnym obwodzie z cienką osłonką mielinową. Pow. 8560  $\times$





*Fig. 10.* Corpus callosum of adult pt rabbit. Degenerating myelinated axons (dA) with aggregations of electron-dense deposits or convoluted membrane structures in axoplasm.  $\times 20970$

*Ryc. 10.* Spoidło wielkie dorosłego królika pt. Zwyrodniałe aksony zmielinizowane (dA) ze skupieniami elektronowo-gęstych mas bądź skłębionych błoniastych struktur w aksoplazmie. Pow. 20970  $\times$



*Fig. 11.* Optic nerve of 1-month-old pt rabbit. Axons surrounded by myelin sheaths with adaxonal large layers of oligodendroglial cytoplasm and loosely arranged outer lamellae.  $\times 28750$

*Ryc. 11.* Nerve wzrokowy 1-miesięcznego królika pt. Aksony otoczone osłonkami mielinowymi z szerokimi warstwami cytoplazmy oligodendrogleju w części przyaksonalnej i rozluźnionym układem blaszek mielinowych w części zewnętrznej osłonek. Pow. 28750  $\times$





Fig. 12. Spinal cord of 14-day-old pt rabbit. Enlarged adaxonal layers of oligodendroglial cytoplasm (xxx) are visible over large segment of axonal length.  $\times 25230$

Ryc. 12. Rdzeń kręgowy 14-dniowego królika pt. Poszerzone warstwy przyaksonalnej cytoplazmy oligodendrogleju (xxx) widoczne na długim odcinku wzdłuż aksonu. Pow. 25230  $\times$

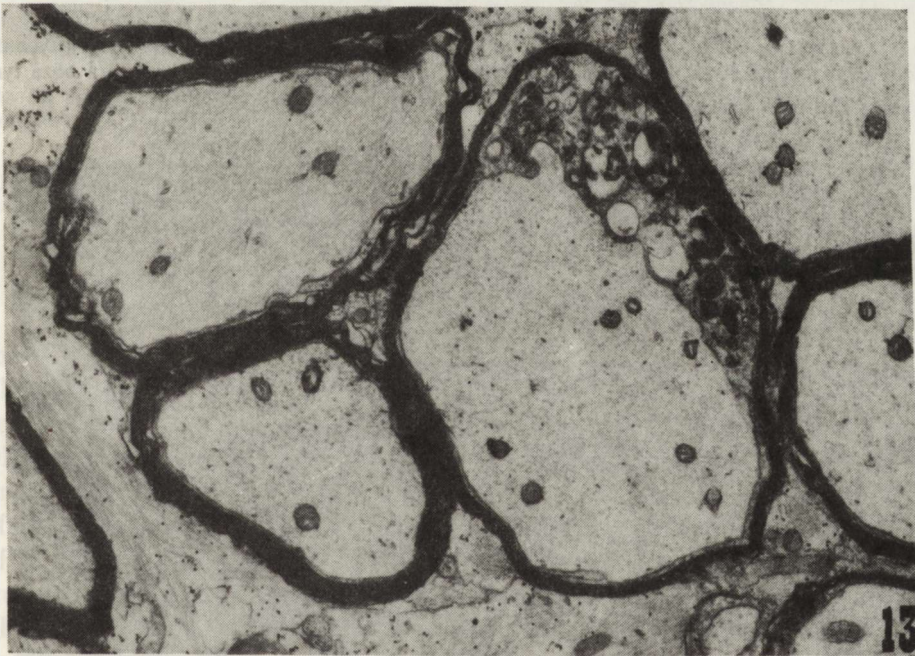


Fig. 13. Cerebellum of 2-month-old pt rabbit. Adaxonal accumulation of convoluted membrane structures and of electron-lucent vacuoles in enlarged oligodendroglial cytoplasm. Axoplasm contains several small mitochondria and numerous neurofilaments. Myelin sheaths surrounding axons are too thin in regard to the axon diameter.  $\times 11800$

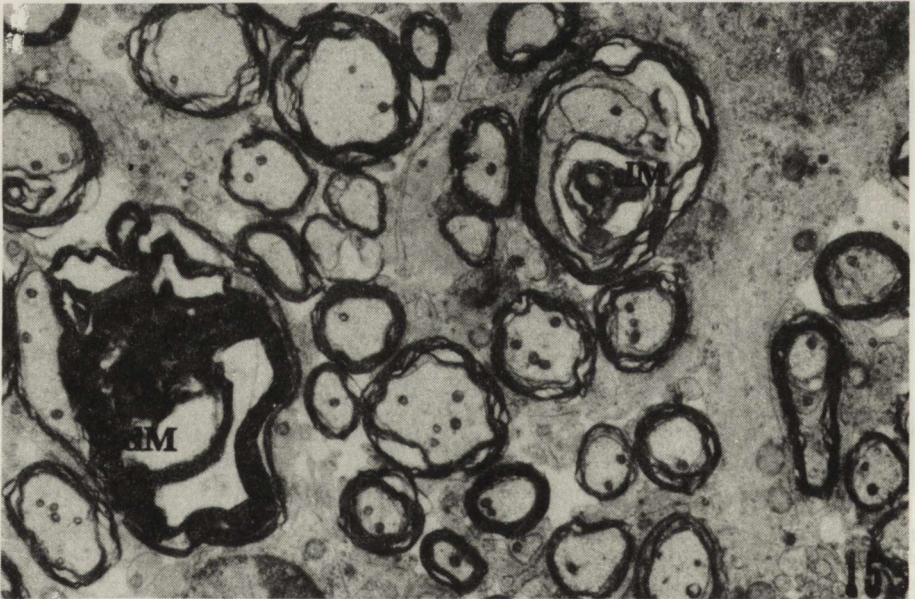
Ryc. 13. Mózdzek 2-miesięcznego królika pt. Przyaksonalne nagromadzenie skłębionych błonistych struktur elektronowo-gęstych oraz elektronowo-przeziernych wakuoli w poszerzonej cytoplazmie oligodendrogleju. W aksoplazmie widoczne liczne neurofilamenty i drobne mitochondria. Osłonki mielinowe wokół aksonów są niewspółmiernie cienkie w stosunku do średnicy aksonów. Pow. 11800  $\times$





*Fig. 14.* Medulla oblongata of adult pt rabbit. Disintegration of myelin lamellae adjacent to segmental expansion of adaxonal cytoplasmic layers in a sheath showing in other respects normal compact lamellar structure.  $\times 38070$

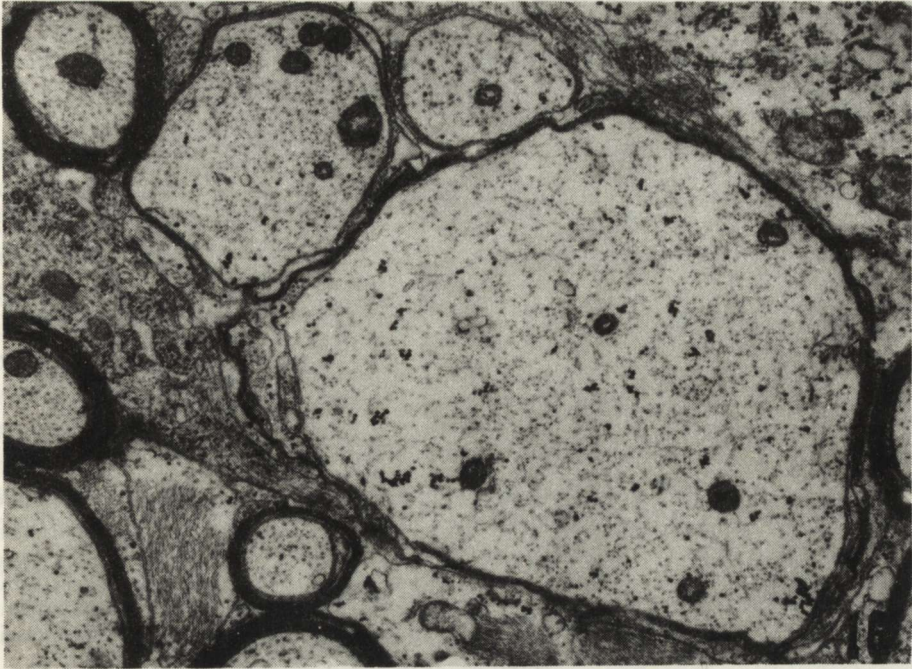
*Ryc. 14.* Rdzeń przedłużony dorosłego królika pt. Rozpad blaszek mielinowych przylegających do odcinkowo poszerzonych przyaksonalnych warstw cytoplazmatycznych osłonki, która poza tym wykazuje prawidłową zwartą strukturę blaszkową. Pow. 38070  $\times$



*Fig. 15.* Spinal cord of 1-month-old pt rabbit. Large deposits and folds of degenerated myelin in adaxonal part of sheaths (dM).  $\times 6440$

*Ryc. 15.* Rdzeń kręgowy 1-miesięcznego królika pt. Olbrzymie złoża i pętle zwyrodniałej mieliny w przyaksonalnej części osłonek (dM). Pow. 6440  $\times$





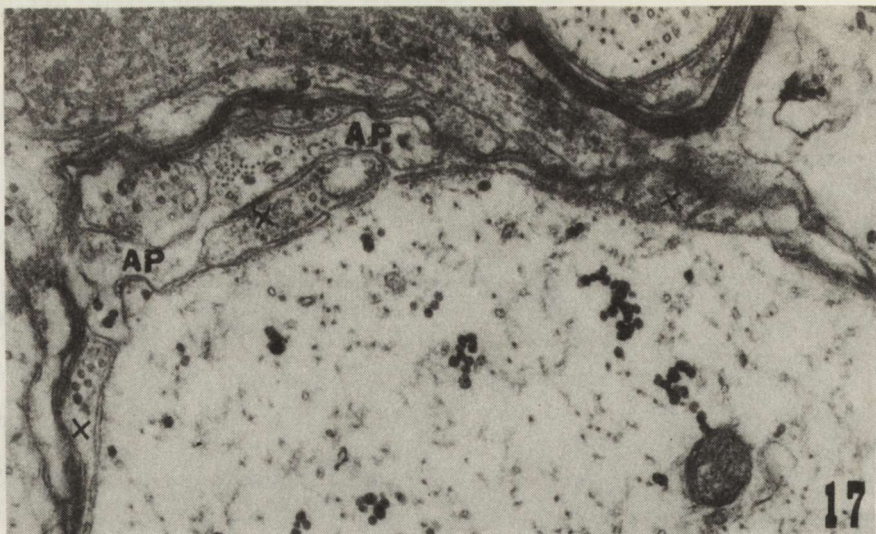
*Fig. 16.* Spinal cord of 3-month-old pt rabbit. Axons with very thin myelin sheaths and axoplasm containing glycogen granules, randomly distributed neurofilaments and small condensed mitochondria.  $\times 17740$

*Ryc. 16.* Rdzeń kręgowy 3-miesięcznego królika pt. Aksony z bardzo cienkimi osłonkami mielinowymi i z aksoplazmą zawierającą ziarna glikogenu, nierównomiernie rozmieszczone neurofilamenty i drobne mitochondria. Pow. 17740  $\times$

Despite changes in the axoplasm, the myelinating axons in pt rabbits were characterized often by an irregular profile and undulated axonal membrane. The surrounding sheaths displayed loosely arranged, distorted myelin lamellae and large adaxonal layers of oligodendroglial cytoplasm, wrapped around the whole circumference of the axon in often two or more turns (Fig. 5 and 11). The presence of periaxonal space between the axonal membrane and the membrane of the glial adaxonal cytoplasm was characteristic for internodal segments of myelin sheaths and differentiated this arrangement of cytoplasmic layers from the paranodal terminal loops of myelin. Enlarged adaxonal layers of oligodendroglial cytoplasm occupying internodal segments of sheaths were seen also on longitudinal sections of nerve fibers (Fig. 12).

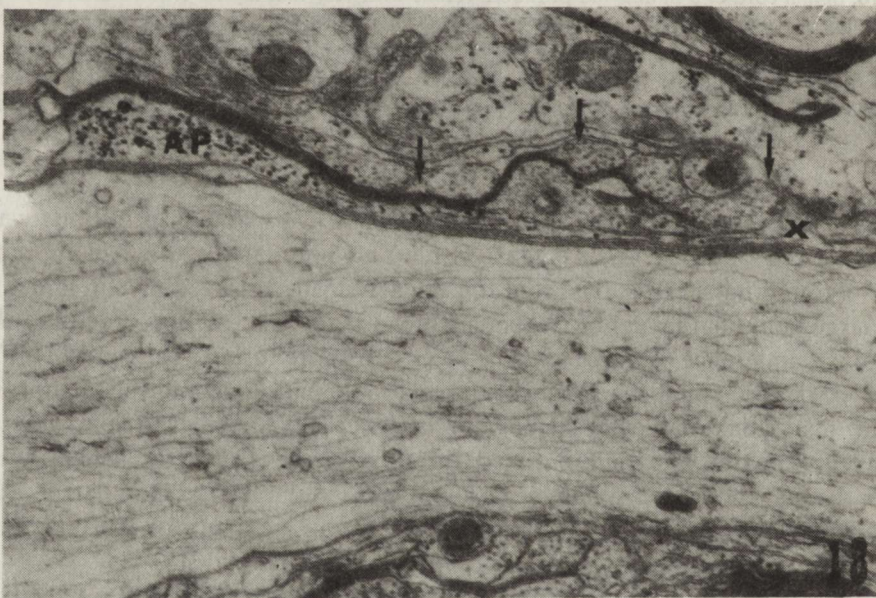
In the late period of myelination in pt rabbits some axons still retained an irregular contour with less or more deep indentation between axoplasm and adaxonal glial cytoplasm. Sometimes, in enlarged adaxonal cytoplasm accumulation of heterogeneous dense bodies with detached fragments of axoplasm were observed (Fig. 13). Axons with irregular profile had usually thin and undulated sheaths with disarranged myelin lamellae. Splitting of lamellae and





*Fig. 17.* Higher magnification of a fragment of *Fig. 16*. Astrocytic process (AP) containing glial filaments and glycogen granules, adjacent directly to axolemma and myelin lamellae is visible between oligodendroglial adaxonal processes (x).  $\times 41930$

*Ryc. 17.* Większe powiększenie fragmentu *ryc. 16*. Pomiedzy przyaksonalnymi wypustkami oligodendrogleju  $\times$  widoczna wypustka astrocytarna (AP) z filamentami glejowymi i ziarnami glikogenu, która przylega bezpośrednio do aksolemy i do blaszek cienkiej osłonki mielinowej. Pow. 41930  $\times$



*Fig. 18.* Spinal cord of 2-month-old pt rabbit. Longitudinal section of a thin myelinated fiber with maldeveloped paranodal region (arrows). Cytoplasm of astrocytic process (AP) penetrating from paranodal region ( $\times$ ) is seen between myelin sheath and axon.  $\times 19000$

*Ryc. 18.* Rdzeń kręgowy 2-miesięcznego królika pt. Przekrój podłużny włókna z cienką osłonką mielinową i nieprawidłową okolicą przywęzłową (strzałki). Między osłonką mielinową i aksonem jest widoczna cytoplazma wypustki astrocytarnej (AP) wnikającej z okolicy okołowęzłowej ( $\times$ ). Pow. 19000  $\times$



distorted, redundant myelin loops were seen more frequently (Fig. 6 and 14). Sometimes, large degenerated myelin balls situated adaxonally within sheaths and pressed on the axon were observed (Fig. 15).

In late period of myelination many axons displayed very thin myelin sheaths consisting only of few lamellae. The axons surrounded with such thin sheaths were characterized by the diverse axoplasmic changes, described above. Furthermore, accumulation of organelles, especially of mitochondria and smooth endoplasmic reticulum, high density of neurofilaments and presence of glycogen granules in the axoplasm were seen also in thin myelinated axons (Fig. 16). In addition, within abnormal myelin sheaths, the adaxonal occurrence of astroglial processes, characterized by the presence of glial filaments and glycogen granules was recognized. These astrocytic processes were apposed immediately to the axolemma and neighbored with oligodendroglial processes and myelin lamellae (Fig. 17). In one fiber on longitudinal section, penetration of an astrocytic process under the sheath at the site of malformed terminal loops of myelin from the region of node of Ranvier has been observed (Fig. 18).

#### DISCUSSION

The present study indicates that axonal changes in pt rabbits appear mainly in the period of myelination and involve mostly the fibers with abnormal very thin myelin sheaths or those completely devoid of sheaths, whereas the premyelinating axons show no appreciable axoplasmic changes. This observation suggests that axon lesions develop secondary to disturbed myelination; however, with respect to all the abnormalities in the pattern of myelinating fibers, a more complex mechanism of axonal involvement in the process of pathological myelination cannot be excluded in the pt mutant.

Neither has the significance of axonal changes associated with CNS hypomyelination in known mutants of other animal species been definitively resolved. The occurrence of degenerated axons and axonal spheroids with accumulation of multiple organelles, dense bodies and abnormal membranous structures has been described in mouse mutants, that is in Jimpy (Hirano et al. 1969; Rosenfeld, Friedrich 1983), Quaking (Suzuki, Zagoren 1975) and Shiverer (Friedrich et al. 1980) and also in md rats (Dentinger et al. 1982). These changes were regarded as additional or secondary axonal alterations due to the abnormal development of myelin sheaths. On the other hand, a possibility of primary neuroaxonal defect in Jimpy mouse has been suggested by some authors with regard to findings of retarded growth of axons in corpus callosum, spinal cord (Robain, Mandel 1974) and optic nerve (Webster et al. 1976) and of structural abnormalities in the dendrites of neocortical neurons (Kristt, Butler 1978). Omlin and Anders (1983) postulated, that the abnormal relationship between astrocytes and axons before myelination may cause an alteration in the axonal growth in Jimpy mouse. The authors suggest, that an excessive network of astrocytic processes branching between axons may highly reduce



mutual axon-axon contact and change the local environment of developing axons. Furthermore, some observations point to presumably metabolic damage of axons. In axons of the optic nerve, increased axonal proteolysis in *Jimpy* and *Quaking* mice (Nixon 1982) and increased density and size of mitochondria in *md* rat (Dentinger et al. 1985) have been observed. All these data indicate that axonal pathology in the disturbed myelination process is not yet sufficiently recognized.

Hypomyelination in the *pt* mutant is less severe than in other mutants, in particular in comparison with *Jimpy* and *md* characterized by almost complete lack of myelinated fibers. In *pt* rabbits, the majority of fibers become myelinated, however, myelin sheath thickness is reduced, the rate of myelination is decreased and myelination of small fibers is most retarded and incomplete. Evidence of retarded and arrested growth of axons in corpus callosum of *pt* rabbits suggested that the relationship between disturbances of myelination and size of axons may be connected in part with changes in the axon itself, particularly with regard to the critical axon diameter and the role of axons for initiation of the process of myelination (Taraszewska, Zelman 1986).

The present morphological studies showed, that disorder in distribution of axons and astroglial processes in the premyelination period in *pt* rabbits is comparable with the changes reported in *Jimpy* mouse (Omlin, Anders 1983). In *pt* rabbit, the astrocytic processes show an enhanced tendency to surround single premyelinating and myelinated fibers, and hyperplasia of these processes appears before onset of myelination and augments during myelination of axons (Taraszewska, Zelman 1987). It is not well known, what factors stimulate the reaction of astrocytes and whether excessive hyperplasia of astroglial processes can influence axon growth (Omlin, Anders 1983), or on the contrary, the astrocytic reaction is secondary to disturbed development of axons.

In *pt* rabbits, the majority of myelinated fibers were characterized by relatively small axoplasmic changes. These changes, in comparison with the control, consist mostly in increased content of microtubules, particularly in the early period of myelination, increased number of smooth-walled vesicles, uneven distribution of neurofilaments and microtubules and sometimes occurrence of glycogen granules.

A transient increase in the microtubular density has been reported in normal growing axons and a possible contribution of microtubules in the determination of axonal caliber during development has been suggested by Faundez and Alvarez (1986). Intraaxonal clusters of vesicotubular profiles prior to myelination contribute probably to the longitudinal growth of axons (Hildebrand, Waxman 1984). Furthermore, it is also known, that both microtubules and axoplasmic vesicles are involved in the mechanism of axonal transport (Ochs 1982; Miller et al. 1987), especially for high molecular weight components.

It may be supposed, that the slight axoplasmic changes observed in myelinating fibers in *pt* rabbits reflect some quantitative disturbances of



processes connected with growth of axons and presumably with axonal transport. However, most advanced changes lead to degeneration of axons, but this concerns a relatively small proportion of fibers in their total population. Some abnormalities in development and maturation of axons may be also suspected indirectly by findings of structural changes in the innermost part of myelin sheaths. It is known, that the process of myelin sheath formation is associated with simultaneous differentiation of axolemma into internodal, paranodal and nodal domains (Waxman, Foster 1980). In all these regions the intercourse between axolemma and the membranes of oligodendroglial and astroglial processes varies. In the normal myelin sheath, the cytoplasmic portions of the oligodendroglial process are present only in the inner and outer mesaxons and in terminal loops at the paranodal region. These parts of the myelin sheath in CNS showed selectively a high content of myelin-associated glycoprotein (MAG), which is probably involved in maintenance of interaction between myelin and axon (Quarles 1983/1984). The amount and molecular weight of MAG is higher in early stages of myelin sheath development and decreases in the course of compaction and maturation of myelin. It has been reported that in the Quaking mutant this glycoprotein presents a higher molecular weight than normal in coincidence with structural abnormalities of myelin sheaths characterized by incomplete compaction of myelin lamellae and presence of many cytoplasmic layers within the sheaths (Matthieu et al. 1978).

In the pt mutant protracted appearance of uncompacted cytoplasmic layers of the oligodendroglial process in the axonal part of sheaths was observed. This is usually accompanied by an irregular profile of axons with invaginations both of axolemma and glial membrane, sometimes with periaxonal accumulation of degenerated dense bodies, by advanced axoplasmic changes and distorted or disintegrated myelin lamellae. These changes as well as the incidence of astrocytic processes within some myelin sheaths and occurrence of numerous fibers, with inadequate to size of axon very thin sheaths, may indicate a disturbed interrelationship between glia and axons. Although, abnormal, formation of myelin sheaths could be attributed mainly to a dysfunction of oligodendroglial cells, the question arises whether and how far these changes may be influenced by the affected mechanisms of axonal control upon myelination.

The normal course of the process of myelination depends on the complex mechanism of continuous interaction between axon and glia, responsible for spatial formation of the myelin sheath suitably to axon development and to regional modification of the axonal membrane (Waxman, Foster 1980; Hildebrand, Waxman 1984).

The presented results suggest, that in the pt mutant damage of axons may constitute a significant factor contributing to the pathological process of disturbed myelination, particularly in development of abnormal axo-glial interrelationships.



## ULTRASTRUKTURA AKSONÓW W ZABURZENIACH MIELINIZACJI OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO U KRÓLIKA pt

### Streszczenie

Celem badań było określenie zmian w ultrastrukturalnym obrazie mielinizujących się aksonów u mutantu pt w hipomielinizacji ośrodkowego układu nerwowego. Badania przeprowadzono na materiale nerwów wzrokowych, spoidła wielkiego, mózdzku, rdzenia przedłużonego i rdzenia kręgowego u królików pt i kontrolnych w wieku 2, 8, 14 dni, 1, 2, 3 miesięcy i dorosłych. Stwierdzono, że zmiany aksonalne u królików pt rozwijają się równolegle z mielinizacją włókien. W aksoplazmie mielinizujących się włókien występowało większe zagęszczenie mikrotubul, nierównomierne rozmieszczenie neurofilamentów, zwiększenie ilości pęcherzyków błon gładkich. Ponadto aksony u królików pt charakteryzowały się często nieregularnym obwodem i pofałdowaniem błony aksonalnej a otaczające je osłonki mielinowe nierównym układem rozluźnionych lub poskręcanych blaszek mielinowych. W części przyaksonalnej osłonek mielinowych obserwowano przedłużone utrzymywanie się „niezlepionych” szerokich warstw cytoplazmatycznych wypustek oligodendrogleju, a niekiedy również obecność wypustek astrogleju. Zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe aksoplazmy występowały głównie w aksonach z nieprawidłowo wykształconymi, bardzo cienkimi osłonkami mielinowymi lub w aksonach niezmielinizowanych.

Przedstawione zmiany, jak również wcześniejsze obserwacje wskazujące na opóźniony wzrost aksonów i zależność między zaburzeniami mielinizacji a wielkością aksonów, pozwalają przypuszczać, że w procesie patologicznej mielinizacji u mutantu pt uszkodzenia aksonów mogą odgrywać ważną rolę w patomechanizmie rozwoju nieprawidłowych współzależności aksonalno-glejowych.

## УЛЬТРАСТРУКТУРА АКСОНОВ ПРИ НАРУШЕНИЯХ МИЕЛИНИЗАЦИИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ КРОЛИКА РТ

### Резюме

Определялись изменения в ультраструктурной картине миелинизирующихся аксонов кролика-мутанта рт при гипомиелинизации центральной нервной системы. Электронно-микроскопически исследовался зрительный нерв, мозолистое тело, мозжечок, продолговатый и спинной мозг кроликов рт и контрольных в возрасте 2, 8, 14 дней, 1, 2, 3 месяца и взрослых кроликов. Обнаружено, что аксональные изменения у кроликов рт развиваются параллельно с миелинизацией волокон. В аксоплазме миелинизирующихся волокон найдено увеличенное уплотнение микротрубочек, неравномерное размещение нейрофиламентов, увеличение количества пузырьков гладких мембран. Кроме того, аксоны у кроликов рт часто характеризовались нерегулярностью окружности и складчатостью аксональных мембран. Окружающие их миелиновые оболочки обнаруживали неравномерное расположение разрыхленных или свитых миелиновых бляшек. В приаксональной части миелиновых оболочек обнаружено длительное сохранение неслепленных широких цитоплазматических слоев отростков олигодендроглии, а иногда также наличие отростков астроглии. Выявленные дегенеративные изменения аксоплазмы появлялись главным образом в аксонах с патологически сформированными очень тонкими миелиновыми оболочками или в немиелинизированных аксонах. Указанные изменения, а также прежние наблюдения замедленного роста аксонов и зависимости между нарушениями миелинизации и величиной аксонов позволяют предполагать что в процессе патологической миелинизации у мутанта рт повреждения аксонов могут играть важную роль в патогенезе нарушений аксонно-глиальных взаимоотношений.



## REFERENCES

1. Dentinger M. P., Barron K. D., Csiza C. K.: Ultrastructure of the central nervous system in a myelin deficient rat. *J. Neurocytol.*, 1982, 11, 671–691.
2. Dentinger M. P., Barron K. D., Csiza C. K.: Glial and axonal development in optic nerve of myelin deficient rat mutant. *Brain Res.*, 1985, 344, 255–266.
3. Faundez V., Alvarez J.: Microtubules and calibers in developing axons. *J. Comp. Neurol.*, 1986, 250, 73–80.
4. Friede R. L.: Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J. Comp. Neurol.*, 1972, 144, 233–252.
5. Friedrich V. L., Konecki D. L., Massa P. T.: Neuronal abnormalities in the cerebellum of quaking and shiverer mice. In: *Neurological mutations affecting myelination*. Ed.: N. Baumann, Elsevier, Amsterdam, 1980, 141–146.
6. Hess A., Young J. Z.: Correlation of internodal length and fiber diameter in the central nervous system. *Nature*, 1949, 164, 490–491.
7. Hildebrand C., Waxman S. G.: Postnatal differentiation of rat optic nerve fibers: electron microscopic observations on the development of nodes of Ranvier and axoglial relations. *J. Comp. Neurol.*, 1984, 224, 25–37.
8. Hirano A., Sax D. S., Zimmermann H. M.: The fine structure of the cerebella of the Jimpy mice and their normal litter mates. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1969, 28, 388–400.
9. Kristt D. A., Butler F. K.: Neuronal abnormalities associated with impaired myelination during brain development: a Golgi study of neocortex in the Jimpy mouse. *Neurosci. Lett.*, 1978, 7, 107–113.
10. Matthews M. A., Duncan D.: A quantitative study of morphological changes accompanying the initiation and progress of myelin production in the dorsal funiculus of the rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.*, 1971, 142, 1–22.
11. Matthieu J. M., Koellreutter B., Joyet M. L.: Protein and glycoprotein composition of myelin and myelin subfractions from brains of Quaking mice. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 783–790.
12. Miller R. H., Lasek R. J., Katz M. J.: Preferred microtubules for vesicle transport in lobster axons. *Science*, 1987, 235, 220–222.
13. Nixon R. A.: Increased axonal proteolysis in myelin-deficient mutant mice. *Science*, 1982, 215, 999–1001.
14. Ochs S.: On the mechanism of axoplasmic transport. In: *Axoplasmic transport*. Ed. D. G. Weiss. Berlin, Springer-Verlag, 1982, 342–350.
15. Omlin F. X., Anders J. J.: Abnormal cell relationships in Jimpy mice: electron microscopic and immunocytochemical findings. *J. Neurocytol.*, 1983, 12, 767–784.
16. Quarles R. H.: Myelin-associated glycoprotein in development and disease. *Dev. Neurosci.*, 1983/1984, 6, 285–303.
17. Robain O., Mandel P.: Etude quantitative de la myélinisation de la croissance axonale dans le corps calleux et le cordon postérieur de la moëlle chez la souris Jimpy. *Acta Neuropathol.*, (Berl.), 1974, 29, 293–309.
18. Rosenfeld J., Friedrich V. L., Jr.: Axonal swellings in Jimpy mice: does lack of myelin cause neuronal abnormalities. *Neuroscience*, 1983, 10, 959–966.
19. Suzuki K., Zagoren J. C.: Focal axonal swelling in cerebellum of Quaking mouse: light and electron microscopic studies. *Brain Res.*, 1975, 85, 38–43.
20. Taraszewska A.: Morfologiczna charakterystyka złoǳów sudanofilnych występujących w przebiegu nieprawidłowej mielinizacji u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 183–194.
21. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka topografii zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441–459.
22. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 219–227.



23. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. II. Spoidło wielkie. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 443–454.
24. Taraszewska A., Zelman I. B.: Electron microscopic study of glia in pt rabbit during myelination. *Neuropat. Pol.*, 1987, 25, 351–368.
25. Waxman S. G., Foster R. E.: Ionic channel distribution and heterogeneity of the axon membrane in myelinated fibers. *Brain Res. Rev.*, 1980, 2, 205–234.
26. Waxman S. G., Sims T. J.: Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain Res.*, 1984, 292, 179–185.
27. Webster H. de F., Reier P. J., Matthieu J. M., Quarles R. H.: Axonal abnormalities in optic nerves of Jimmy mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1976, 35, 309.
28. Wender M., Goncerzewicz A.: Morphometric studies of the developing optic nerve in Wistar rats. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 109–123.

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



MIECZYSLAW WENDER, HANNA HEJDUK-HANTKE, ANTONI GODLEWSKI

## KARYOMETRIC STUDIES OF GLIAL CELLS IN CORPUS CALLOSUM OF RATS DEVELOPING A FAT DEFICIENT DIET

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

The aim of this investigation was to study the effects brought about by long lasting fat deficiency, from the late stage of intrauterine life throughout the whole postnatal development till maturity, on the glia of corpus callosum. In view of the difficulty of quantitating changes in the cytoplasm of glial cells, only the karyometric method can provide an insight into structural changes in glial cells in the course of normal and dietary disturbed maturation of the brain.

The increase in mean diameter of the nuclei of glial cells in the course of brain maturation, markedly accentuated during myelinogenesis, and indicating increased biologic activity of the neuroglia at that time, was observed in developing white rats by Wender and Mularek (1971). Histoenzymatic studies on the neuroglia also indicated that differentiation and maturation of the components of the central nervous system during early development as well as in the course of myelination are associated with enhanced activity of phosphatases and esterases, in parallel to the morphological transformations (Friede 1968; Wender et al. 1971).

Dietary lipid deficiencies, involving essentially a shortage of polyunsaturated fatty acids, caused a delayed development of the central nervous system as well as some alterations in various membraneous structures of the nervous tissue (White et al. 1971; Wiggins et al. 1976). In our earlier studies, we established that rats fed a fat-deficient diet during their ontogenic develop a myelin with a reduced content of all basic myelin lipids and with a changed proportion of specific lipid fractions as well as an altered composition of their fatty acids (Wender et al. 1983a, b). It was also established that myelinogenesis in the optic nerve of Wistar rats was severely retarded in the experimental conditions (Wender, Goncerzewicz 1986). The axon diameter of the optic nerves was normal in the first weeks of postnatal development, but it did not reach the normal value for young adult animals. The myelin-axon interrela-



tionship in the optic nerve in the course of myelinogenesis showed qualitative changes, as indicated by an altered ratio of myelin lamellae number to axon diameter (the regression equation changed from linear to parabolic).

The present karyometric studies on glial cells in the corpus callosum of rats developing on a fat-deficient diet have documented another dimension of the pathology.

#### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on Wistar rats. Pregnant females were divided into two groups. The experimental group was fed on artificially composed lipid-deficient diet (containing 0.12% rape seed oil). The control group was fed the same diet but supplemented to 2.0% with rape seed oil. The composition of the experimental diets is presented in details in Table 1. Pregnant females were fed the artificial diet beginning 6 days before the expected delivery and the chow continued to be the only source of food for both dams and their offsprings over the whole postnatal period. The animals were sacrificed after 12, 21, 30 and 60 days of extrauterine life. Each group (control and experimental) included 6 rats. The brains were instantly removed and fixed in Baker solution at room temperature. Paraffin sections, 7 $\mu$ m thick were stained with cresyl violet.

Table 1. Formula of experimental diets

Tabela 1. Zestawienie diet doświadczalnych

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



Karyometric studies were carried out in monochromatic light, at 560 nm wave length, using the automatic analyser of microscopic images "Morphoquant" (VEB Carl Zeiss Jena, GDR). The following parameters of the cells were measured using the MOSAIK programe (Voss et al. 1979).

KONL – length of nuclear circumference determined by the number of raster points covering the circumference of examined structure;

KOFL – cross section area of cell nucleus expressed by the total number of raster points on and inside the circumference of examined object;

FOFA – shape index of cell nucleus representing quotient of squared circumference to the cross-section area;

DMVH – elongation index determined by the quotient of minimal to maximal diagonals. The extent of elongation is inversely proportional to the value of this index;

FLVH – shape regularity index of cell nucleus determined by the quotient of the cross-section area to the area of the smallest octagon circumscribed on the cross-section of examined object; it illustrates the extent of folding of the examined object surface;

EXTM – mean of extinctions of examined object;

EXTS – sum of extinctions at all points of examined object;

KOMP – index determining compactness of nuclear chromatin;

ZNTR – index determining rate of chromatin concentration around center of the nucleus.

The results of measurements of glial cells in experimental animals were compared with those in control rats by using the Kolmogorov-Smirnov nonparametric test (KST). The observed changes were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

Results of karyometric studies on the total population of glial nuclei in corpus callosum are presented in Table 2. In the course of normal development the length of nuclear circumference (KONL) and cross section area of cell nucleus (KOFL) showed a marked increase with advancing age up to maturity of the animals (60 days of postnatal life). The shape index of cell nuclei (FOFA) also increased during the studied period of extrauterine development. In contrast to these findings, the elongation index (DMVH) exhibited changes indicating spheric transformation of cell nuclei in the course of early extrauterine development (from 12 to 21 days of life) and reciprocal changes in the next studied period (30 and 60 days old rats). The index of shape regularity (FLVH) was unchanged during extrauterine development.

Results of cytophotometric estimations of chromatin extinction values in glial nuclei indicated numerous changes in the course of extrauterine development. The mean of extinction (EXTM) was the highest in the first studied group (12 days old rats) and the lowest in 30 days old animals, whereas the sum



Table 2. Results of karyometric studies of glia cells in corpus  
Tabela 2. Wyniki badań kariometrycznych komórek gleju spoidła wielkiego

Group Grupa	Value Wartość	KONL	KOFL	FOFA
<b>Control</b> <b>Kontrola</b>				
12 days of postnatal life 12 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	58 ± 4	123 ± 14	133 ± 8
	min.	51	98	118
	max.	80	185	196
21 days of postnatal life 21 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	67 ± 6	173 ± 21	143 ± 12
	min.	50	116	127
	max.	90	241	198
	KST*	< 0.001	< 0.001	< 0.001
30 days of postnatal life 30 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	75 ± 8	191 ± 30	148 ± 17
	min.	58	124	130
	max.	99	283	199
	KST*	< 0.001	< 0.001	< 0.001
60 days of postnatal life 60 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	87 ± 12	254 ± 78	150 ± 17
	min.	58	63	123
	max.	127	497	207
	KST*	< 0.001	< 0.001	n.s.
<b>Experimental</b> <b>Doświadczenie</b>				
12 days of postnatal life 12 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	64 ± 5	139 ± 14	136 ± 6
	min.	53	107	124
	max.	83	190	161
	KST**	< 0.001	< 0.001	< 0.001
21 days of postnatal life 21 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	73 ± 7	184 ± 27	149 ± 17
	min.	57	125	126
	max.	99	251	200
	KST*	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	KST**	< 0.001	< 0.001	< 0.001
30 days of postnatal life 30 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	81 ± 7	206 ± 26	149 ± 16
	min.	65	143	128
	max.	104	307	201
	KST*	< 0.001	< 0.001	< 0.001
	KST**	< 0.001	< 0.001	n.s.
60 days of postnatal life 60 dni od urodzenia	$\bar{x} \pm SD$	89 ± 12	274 ± 32	147 ± 16
	min.	60	109	127
	max.	132	529	207
	KST*	< 0.01	< 0.001	< 0.001
	KST**	n.s.	< 0.001	n.s.

\* Statistical comparison between particular age groups of control or  
Porównanie statystyczne pomiędzy poszczególnymi grupami wieku

\*\* Statistical comparison between experimental and control group

\*\*\* Explanation of abbreviations in text



callosum of developing rats kept on a fat-deficient diet.

szczurów utrzymanych w czasie rozwoju na diecie z niedoborem tłuszczu

DMVH	FLVH	EXTM	EXTS	KOMP	ZNTR***
86±6	88±2	136±28	45±4	47±5	58±7
59	85	21	36	33	35
100	94	191	59	61	70
89±5	88±2	116±26	50±4	59±6	60±10
70	85	54	40	35	19
100	94	309	63	73	85
< 0.001	n.s.	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
84±6	88±2	108±20	58±5	67±8	68±12
67	85	46	41	40	30
97	99	167	72	89	100
< 0.001	n.s.	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
77±7	88±2	113±19	73±15	73±8	68±12
56	82	63	28	54	35
88	93	163	113	92	100
< 0.001	n.s.	n.s.	< 0.001	< 0.001	n.s.
87±5	88±2	137±28	49±4	47±6	50±8
64	85	69	36	28	18
100	94	197	60	68	70
n.s.	n.s.	n.s.	< 0.001	n.s.	< 0.001
85±5	88±2	121±19	55±5	52±6	49±12
67	85	76	44	37	15
97	94	174	73	71	77
< 0.001	n.s.	< 0.001	< 0.001	< 0.001	n.s.
< 0.001	< 0.001	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001
80±6	88±1	119±16	63±5	69±7	64±10
50	85	78	48	48	36
93	94	166	85	87	91
< 0.001	n.s.	n.s.	< 0.001	< 0.001	< 0.001
< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
79±5	89±1	115±20	76±13	74±7	72±11
60	83	63	39	57	38
90	93	177	122	92	100
n.s.	n.s.	n.s.	< 0.001	< 0.001	< 0.001
< 0.01	< 0.001	n.s.	n.s.	n.s.	< 0.01

experimental animals

zwierząt kontrolnych lub doświadczalnych

Porównanie statystyczne pomiędzy grupą doświadczalną i kontrolną

Objaśnienie skrótów w tekście



of extinctions increased steadily during the studied period of development, concomitantly with the increase in the index of compactness of nuclear chromatin (KOMP) and ZNTR index (rate of chromatin concentration around center of the nucleus).

Table 3. Nuclei of glia cells in corpus callosum of developing rats kept on a fat-deficient diet categorized into classes according to KOFL index value (section area of cell nucleus)

Tabela 3. Jądra komórek spoidła wielkiego szczurów utrzymywanych w czasie rozwoju na diecie z niedoborem tłuszczu, podzielone na klasy według wartości wskaźnika KOFL (pole jądra komórkowego)

Classes Klasy	Individual nuclei Poszczególne jądra							
	Controls Kontrola (%)				Experimental Doświadczenie (%)			
	12 days 12 dni	21 days 21 dni	30 days 30 dni	60 days 60 dni	12 days 12 dni	21 days 21 dni	30 days 30 dni	60 days 60 dni
0-99	0.9	0	0	1.3	0	0	0	0
100-129	71.2	0.6	0.6	2.0	26.7	1.6	0	0.6
130-159	25.3	27.4	16.7	8.6	62.3	18.4	4.0	5.3
160-189	2.6	49.1	29.7	10.1	10.7	38.5	20.6	9.4
190-219	0	20.6	36.4	10.4	0.3	29.8	45.7	8.7
220-249	0	2.3	13.3	16.4	0	11.4	24.7	12.4
250-275	0	0	3.0	16.1	0	0.3	4.0	14.4
280-309	0	0	0.3	14.3	0	0	1.0	19.4
310-339	0	0	0	6.0	0	0	0	13.4
340-369	0	0	0	7.3	0	0	0	6.7
370-399	0	0	0	3.0	0	0	0	5.6
400-429	0	0	0	2.3	0	0	0	2.6
430-519	0	0	0	1.3	0	0	0	0.6
520-2047	0	0	0	0.9	0	0	0	0.9

The results of karyometric estimations in the group of animals developing on a fat-deficient diet demonstrated some similarities and also differences when compared with results obtained in normally maturing animals. The general trend of changes of KONL and of KOFL values during development was similar in both groups (normal and experimental). It should, however, be noted that the values were significantly higher in all groups of animals kept on a fat-deficient diet than those observed during normal development. FOFA increased similarly in both groups (control and experimental) in the course of



Table 4. Nuclei of glia cells in corpus callosum of developing rats kept on a fat-deficient diet categorized into classes according to DMVH index value (elongation index)

Tabela 4. Jądra komórek gleju spoidła wielkiego szczurów utrzymywanych w czasie rozwoju na diecie z niedoborem tłuszczu podzielone na klasy według wartości wskaźnika DMVH (wskaźnik wydłużenia)

Classes Klasy	Individual nuclei Poszczególne jądra							
	Controls Kontrola (%)				Experimental Doświadczenie (%)			
	12 days 12 dni	21 days of postnatal life 21 dni po urodzeniu	30 days 30 dni	60 days 60 dni	12 days 12 dni	21 days of postnatal life 21 dni po urodzeniu	30 days 30 dni	60 days 60 dni
0-49	0	0	0	0	0	0	0	0
50-54	0	0	0	0	0	0	0.3	0
55-59	0.3	0	0	2.0	0	0	0	0
60-64	0.3	0	0	4.0	0.3	0	0.3	2.3
65-69	0	0	1.0	9.6	0	2.0	3.3	1.3
70-74	2.3	0.6	6.0	14.6	1.3	5.0	11.7	13.4
75-79	6.7	3.3	13.3	23.7	5.6	7.0	21.4	28.0
80-84	21.6	10.0	21.7	29.4	17.1	23.5	28.7	39.7
85-89	42.6	30.7	42.7	16.7	43.1	44.5	33.7	15.0
90-94	24.3	36.0	13.7	0	27.6	16.4	0.6	0.3
95-99	0	16.4	1.6	0	4.0	1.6	0	0
100-104	1.9	3.0	0	0	1.0	0	0	0
105-2047	0	0	0	0	0	0	0	0

early extrauterine development (between 12 and 21 days of life) but, in contrast to normal development, it proved stable in animals fed a fat-deficient diet during the subsequent period of maturation. No differences between normal and experimental groups could be demonstrated in the elongation index (DMVH) and shape regularity index (FLVH).

When comparing the karyometric estimations of relative chromatin content (EXTM, EXTS and KOMP values) in glial nuclei of the corpus callosum between the group of rats developing on a normal and a fat-deficient diets, it should be noted that the general trends of changes observed in the course of brain maturation as well as individual results did not vary markedly and only some minor differences were observed.

The changes in mean values of the karyometric estimations, shortly described above, and listed in Table 2, resulted in relative alterations in categorization of individual glial cells to distinct size classes. Some examples of these shifts are given in Tables 3 to 5.



Table 5. Nuclei of glia cells in corpus callosum of developing rats kept on a fat-deficient diet categorized into classes according to KOMP index value (compactness of nuclear chromatin)

Tabela 5. Jądra komórek gleju spoidła wielkiego szczurów utrzymywanych w czasie rozwoju na diecie z niedoborem tłuszczu, podzielone na klasy według wartości wskaźnika KOMP (wskaźnik zbitości chromatyny jądrowej)

Classes Klasy	Individual nuclei Poszczególne jądra							
	Controls Kontrola (%)				Experimental Doświadczenie (%)			
	12 days 12 dni	21 days of postnatal life 21 dni po urodzeniu	30 days 30 dni	60 days 60 dni	12 days 12 dni	21 days of postnatal life 21 dni po urodzeniu	30 days 30 dni	60 days 60 dni
0-29	0	0	0	0	0.3	0	0	0
30-37	4.6	0.3	0	0	5.0	0.3	0	0
38-45	30.3	2.3	0.6	0	38.0	17.3	0	0
46-53	54.9	13.3	3.0	0	40.7	42.2	3.0	0
54-61	10.2	48.1	17.7	7.0	13.7	30.2	24.4	3.0
62-69	0	31.4	33.0	27.0	2.3	9.0	44.4	25.0
70-77	0	4.6	33.7	39.7	0	1.0	22.6	38.0
78-85	0	0	11.7	18.7	0	0	4.6	27.7
86-93	0	0	0.3	7.6	0	0	1.0	6.3
94-2047	0	0	0	0	0	0	0	0

## DISCUSSION

In our previous paper dealing with the morphology of the developing white matter in the rat brain (Wender et al. 1971) we have been able to demonstrate that differentiation of the immature neuroglia takes place before and in the course of myelination. Accordingly, the myelinating white matter exhibits glial cells of various degree of maturation, i.e. spongioblasts, intermediate forms, immature as well mature oligodendrocytes and astrocytes. Myelination of the nerve fibers of corpus callosum was incomplete in 12 and 21 days old animals, whereas in 30 days old rats myelinated fibers could not be distinguished from those of young adult animals (60 days old). When myelinogenesis is studied by chemical methods of investigation, deposition of myelin is observed to proceed over the whole period of maturation till adulthood, and even then it is not entirely completed. The highest daily output of myelin in the rat brain coincides with the 21st day of postuterine life (Pankrac 1982).

Owing to the wide morphological diversity of glial cells in the course of postnatal development, accentuated during myelination gliosis, it is extremely



difficult to interpret the values found in our karyometric studies in terms of particular glial components or their maturation stages. It may only be said, that glial nuclei in rat corpus callosum grow steadily during extrauterine brain development, concomitantly with changes in the cell nucleus (elongation) and with the increase of nuclear chromatin compactness.

Mitrová (1967), on the basis of karyometric studies of cerebellar white matter, and Wender and Mularek (1971) studying the changes of the glia in corpus callosum established the predominance of cells with small nuclei, corresponding to spongioblasts, in the first days of postnatal life. In the maturation period just before and in the early phase of myelinogenesis, a wide variety of nuclear sizes is observed, indicating that none of the glial cell types predominates. In our recent material the KOFL index value (section area of cell nucleus) indicated an overwhelming majority of one class of small cells, which might correspond to spongioblasts, also before the myelination (12th day of life). During the early (21st day of life) and late myelination period (30th day of life) greater differences in the percentage of particular nuclear classes have been observed. However, an even greater diversity of KONL and KOFL index values was noted in young adult animals (60 days of life). A partial explanation of the glial cell nuclei variability in young adult rats may be provided by the data established in our previous studies (Wender et al. 1974). They indicate that the interfascicular oligodendroglia of the white matter as well as the neuroglial cells of the subependymal layer of mature rats retain some mitotic activity as judged by their ability to incorporate radioactive thymidine.

Quantitatively or qualitatively insufficient alimentation in course of development results in morphological and biochemical abnormalities of the brain, including severe changes in the myelin (Dobbing 1972; Wiggins et al. 1976; Patel 1983). During the accelerated phase of growth of the central nervous system, including the myelinogenesis period, the vulnerability of the brain is enhanced (Dobbing 1968).

In our karyometric studies of glial cells in corpus callosum of rats developing on the fat-deficient diet some findings are rather unexpected and difficult to explain. First of all, we have established that the diameter (KONL value) and area (KOFL value) of glial nuclei are greater in all age groups of experimental animals than in rats developing on a normal diet. This leads to the hypothesis that the alimentary lipid deficiency produces morphological parameters of accelerated glial development. However, this seems to be associated with some kind of functional impairment since the myelin membranes generated by the myelinating glia are chemically defective. The myelin of animals kept on a fat-deficient diet during their ontogenic development shows a reduced content of all basic myelin lipids, a changed proportion of the particular lipid fractions and altered composition of their fatty acids pattern (Wender et al. 1983a, b).



## CONCLUSIONS

1. During extrauterine development, the glial cell nuclei of rat corpus callosum grow steadily in size, concomitantly with elongation of their shape and increase in compactness of nuclear chromatin.
2. Before myelination one class of small cells predominates in the rat corpus callosum. The small cells may correspond to spongioblasts.
3. During the myelination period and in young adult rats glial cell nuclei in corpus callosum are very heterogenous.
4. The diameter and area of glial nuclei in corpus callosum of rats developing on the fat deficient diet are larger than in animals developing on the normal diet.
5. The alimentary lipid deficiency produces a developmental acceleration of morphological parameters of glial maturation.

**KARIOMETRYCZNE BADANIA KOMÓREK GLEJOWYCH SPOIDŁA  
WIELKIEGO SZCZURÓW ROZWIJAJĄCYCH SIĘ NA DIECIE  
Z NIEDOBREM LIPIDÓW**

Streszczenie

Przeprowadzono badania wpływu diety z niedoborem kwasów tłuszczowych na rozwój komórek glejowych spoidła wielkiego u szczurów rasy Wistar. Pomiary kariometryczne gleju wykonywano na automatycznym analizatorze obrazów mikroskopowych "Morphoquant" produkcji Zeiss Jena.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. W czasie rozwoju pozapłodowego komórki glejowe spoidła wielkiego wykazują stały wzrost, równoległy z wydłużeniem kształtu i wzrostem zbitości chromatyny jądrowej.
2. Przed okresem mielinizacji w spoidle wielkim szczura przeważa jedna klasa małych komórek, które mogą odpowiadać spongioblastom.
3. W czasie mielinizacji oraz u młodych szczurów dorosłych jądra komórek glejowych spoidła wielkiego odznaczają się dużą różnorodnością.
4. Przekrój i pole jądra komórek glejowych spoidła wielkiego szczurów rozwijających się na diecie ubogiej w tłuszcz są większe od analogicznych danych u zwierząt utrzymywanych na diecie normalnej.
5. Niedobór tłuszczu w pożywieniu powoduje przyspieszenie rozwoju morfologicznych wykładników dojrzewania gleju.

**КАРИОМЕТРИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ГЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК  
МОЗОЛИСТОГО ТЕЛА КРЫС, РАЗВИВАЮЩИХСЯ НА ДИЕТИЧЕСКОМ  
РЕЖИМЕ С НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ЛИПИДОВ**

Резюме

Исследовалось влияние диеты с недостаточностью жирных кислот на развитие глиальных клеток мозолистого тела крыс линии Вистар. Кариометрические измерения глиии проводились автоматическим анализатором микроскопических объектов Morphoquant производства Zeiss, Jena.



Результаты исследования позволили сделать следующие выводы.

1. Во время внеутробного развития глиальные клетки мозолистого тела постоянно увеличиваются, параллельно с удлинением формы и увеличением плоскости ядерного хроматина.
2. Перед периодом миелинизации в мозолистом теле крысы преобладает один тип мелких клеток, которые, вероятно, соответствуют спонгиобластам.
3. Во время миелинизации и у молодых взрослых крыс ядра глиальных клеток мозолистого тела очень разнородны.
4. У крыс, развивающихся на диете с недостаточностью липидов, поперечное сечение и площадь ядра глиальных клеток мозолистого тела больше, чем у животных, развивающихся на нормальной диете.
5. Недостаточность липидов в пище вызывает ускорение появления морфологических признаков созревания глиии.

#### REFERENCES

1. Dobbing J.: Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system. In: *Malnutrition, learning and behaviour*. Eds. N. Serimshaw, J. Gordon. MIT Press, Cambridge, Mass., 1968, pp. 181–202.
2. Dobbing J.: Vulnerable periods of brain development. In: *Lipids, malnutrition and the developing brain*. Elsevier, North Holland, Amsterdam, 1972, pp. 9–20.
3. Friedie R.: Enzyme histochemistry of neuroglia. *Progr. Brain Res.*, vol. 15, Elsevier, Amsterdam, 1968.
4. Mitrova E.: Karyometric investigation of glia cells in the cerebellum in the course of myelination. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 1967, 77, 304–312.
5. Pankrac J.: Myelin formation in developing rat brain with particular reference to the late maturation period. *Neuropatol. Pol.*, 1982, 20, 25–29.
6. Patel A.: Undernutrition and brain development. *Trends in Neurosciences*, 1983, 6, 151–154.
7. Voss K., Neumann E., Witsack V.: "Universelle Programmsystem" für den automatischen Mikroskopbildanalysator Morphoquant. *Jenauer Rundsch.*, 1979, 24, 167–169.
8. Wender M., Mularek O.: Karyometric studies on the development of neuroglia in the rat brain. *Folia Morphol.*, 1971, 30, 41–47.
9. Wender M., Kozik M., Mularek O.: Histoenzymology of cerebral white matter in the developing rat brain. *J. Hirnforsch.*, 1971, 13, 223–230.
10. Wender M., Kozik M., Mularek O., Ożarzewska E.: Incorporation of (<sup>3</sup>H)-thymidine into neuroglial cells in the course of myelinogenesis. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1974, 12, 115–124.
11. Wender M., Kozik M., Śniatała-Kamasa M., Mularek O., Pankrac J.: Neuroglia of the optic nerve in the course of myelination. *J. Hirnforsch.*, 1979, 20, 191–200.
12. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acid deficient diet on myelin lipids of the developing rat brain. *Neuropatol. Pol.*, 1983a, 21, 36–43.
13. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żurawski A.: Fatty acid composition of myelin lipids in developing rats kept on a fat deficient diet. *Neuropatol. Pol.*, 1983b, 21, 363–376.
14. Wender M., Goncerzewicz A.: The effect of fatty acid deficient diet on the developing optic nerve of the rat. *J. Hirnforsch.*, 1986, 4, 435–440.
15. White H. Jr., Galli G., Paoletti R.: Brain recovery from essential fatty acid deficiency in developing rats. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 869–882.
16. Wiggins R., Miller S., Benjamins J., Krigman M., Morell P.: Myelin synthesis during postnatal nutritional deprivation. *Brain Res.*, 1976, 107, 257–264.

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



MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

EFFECT OF REDUCED GLUTATHIONE (GSH) ON  
DOPAMINE (DA) AND GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID (GABA)  
CONCENTRATION IN THE MOUSE BRAIN FOLLOWING  
INTOXICATION WITH 1-METHYL-4-PHENYL-  
-1,2,3,6-TETRAHYDROPYRIDINE (MPTP)

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

Studies on the pathomechanism of the neurotoxic effect of MPTP show, that the  $MPP^+$  ion, the product of MPTP oxygen metabolism with monoaminooxidase B (MAO B) was responsible for evoking the parkinsonian syndrome in humans and in animals (Burns et al. 1983; Chiba et al. 1984; Heikkila et al. 1984; Hallman et al. 1985). MPTP produces mainly degeneration and neuronal atrophy in *pars compacta* of *substantia nigra* in the nigrostriatal pathway (Heikkila et al. 1984; Mossakowski, Dydyk 1987), and a concomitant decrease of the DA level in brain structures in experimental animals (Heikkila et al. 1984; Śmiałek 1987). Experimental studies on mitochondrial respiratory activity in the presence of MPTP showed a decrease of oxygen metabolism at some steps of the tricarboxylic acid cycle and a concomitant increase of glutamate and GABA levels (Vyas et al. 1986). The role of GABA in development of the parkinsonian syndrome in humans is well known. Appearance of parkinsonian signs following experimental intoxication with manganese and cobalt was attributed to changes of the physiological GABA/DA ratio in the brain (Bugera et al. 1987; Kosicka et al. 1987).

It has been postulated, that antioxidants, alpha-tocopherol, beta-carotene and ascorbic acid attenuate the toxic effect of MPTP and reduce the decrease of DA concentration in the structures of the extrapyramidal system (Heikkila et al. 1984; Young et al. 1986b; Śmiałek 1987). A decreased level of GSH in the *substantia nigra* in parkinsonian patients indicated, that this antioxidant acts also as a possible pathogenic factor in Parkinson's disease (Perry et al. 1982). On the basis of the above mentioned hypothesis a study was undertaken of the influence of the GSH on the DA and GABA levels and on the GABA/DA ratio in experimental MPTP intoxication in mice.



## MATERIAL AND METHODS

C57 black mice, 82 males (about 20 g) were used for the experiment. The animals were divided into 4 groups: 1 – intact (norm), 2 – two intraperitoneal injections of GSH (100 mg/kg) at 40 min intervals for 4 days, 3 – i.p. injection of 40 mg/kg of MPTP daily for 4 days, 4 – i.p. injection of 40 mg/kg of MPTP and 20 min before and 20 min after the intoxication with MPTP, injection of 100 mg/kg of GSH (single dose) for 4 days. The animals were thrown into liquid nitrogen 24 hours and 30 days after the last injection. The striatum and basal part of the midbrain were taken for biochemical studies. DA level was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detector (Melamed et al. 1983) and DA concentration was calculated as pmoles/mg protein. GABA content was measured after incubation with ninhydrine according to Love et al. (1958) with modification of Sutton and Simmonds (1974) in an Aminco-Bowman spectrofluorimeter at 380–450 nm. Proteins were measured after Lowry et al. (1951). The results were calculated by analysis of variance after Newman and Keuls and significance was estimated according to Snedecor's F distribution table (Greń 1970).

## RESULTS

Table 1 illustrates DA concentration in the striatum and in the midbrain of the mouse.

*Striatum.* DA level amounted to  $984.91 \pm 98.53$  pmoles/mg protein in the intact animals. No significant difference was noted after administration of GSH in comparison with the norm both after 24 hours and after 30 days. In the group of animals intoxicated with MPTP a 87.3 per cent decrease of DA level was observed after 24 hours and 86.1 per cent after 30 days. Additional administration of GSH during MPTP intoxication diminished DA concentration after 24 hours and after 30 days to 33.5 per cent and 36.7 per cent respectively, of the control values.

*Midbrain.* DA level in intact animals amounted to  $89.16 \pm 78$  pmoles/mg protein. GSH did not evoke any significant changes. After administration of MPTP a decrease of DA concentration was noted to 63.1 per cent and 59.7 per cent of the control values, respectively after 24 hours and after 30 days. In the mice subjected to intoxication with MPTP and treated with GSH the DA level dropped to 61.7 per cent after 24 hours and to 66.0 per cent after 30 days as compared with the norm.

Table 2 shows GABA concentration and GABA/DA ratio in the striatum and in the midbrain of the mice.

*Striatum.* GABA concentration amounted to  $22.03 \pm 0.84$  nmoles/mg protein in the norm. The level of the neurotransmitter did not change significantly after administration of GSH. A significant increase of GABA level was observed after 24 hours (58.2 per cent) and after 30 days (285 per cent)



Table 1. DA content (pmoles/mg) protein in the brain of CB-57 mouse following GSH and/or MPTP administration

Tabela 1. Zawartość DA (pmol/mg białka) w mózgowiu myszy CB-57 po podaniu GSH i/lub MPTP

Experimental group Grupa doświadczalna	Survival time after last injection Czas przeżycia po ostatniej iniekcji	Striatum Prążkowie		Midbrain Śródmózgowie	
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	%	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	%
Control (norm) Kontrola (norma)		984.91 $\pm$ 44.06	(5) 100	89.16 $\pm$ 3.78	(6) 100
GSH	24 hrs 24 godz.	988.87 $\pm$ 44.23	(5) 100.4	88.79 $\pm$ 3.82	(5) 99.6
	30 days 30 dni	992.01 $\pm$ 44.37	(5) 100.7	88.75 $\pm$ 3.75	(5) 99.5
MPTP	24 hrs 24 godz.	125.53 $\pm$ 5.92 <sup>xx</sup>	(5) 12.7	56.25 $\pm$ 2.59 <sup>x</sup>	(5) 63.1
	30 days 30 dni	137.32 $\pm$ 6.49 <sup>xx</sup>	(5) 13.9	53.26 $\pm$ 2.42 <sup>x</sup>	(5) 59.7
MPTP+GSH	24 hrs 24 godz.	330.39 $\pm$ 13.71 <sup>xx, yy</sup>	(5) 33.5	54.98 $\pm$ 2.28 <sup>x</sup>	(5) 61.7
	30 days 30 dni	361.11 $\pm$ 15.21 <sup>xx, yy</sup>	(5) 36.7	58.89 $\pm$ 2.43 <sup>x</sup>	(5) 66.0

Significance: <sup>x</sup>  $\leq$  0.05, <sup>xx</sup>  $\leq$  0.01 – in comparison with the norm

<sup>yy</sup>  $\leq$  0.01 – in comparison with the MPTP group

Poziom istotności: <sup>x</sup>  $\leq$  0,05, <sup>xx</sup>  $\leq$  0,01 – w porównaniu z normą

<sup>yy</sup>  $\leq$  0,01 – w porównaniu z grupą z MPTP

In brackets – number of animals

W nawiasach – liczba zwierząt

following intoxication with MPTP. In animals subjected to administration of MPTP and GSH the increase of GABA content was insignificant after 24 hours (17.9 per cent), but the 240 per cent rise of GABA concentration was significant in comparison with the norm after 30 days.

*Midbrain.* GABA content amounted to 20.02  $\pm$  0.76 nmoles/mg protein in the norm. No significant effect on GABA level was noted after administration of GSH only. Intoxication with MPTP caused an increase to 60.2 per cent of GABA content after 24 hours and 299.6 per cent after 30 days. In animals treated with MPTP and GSH an insignificant increase of GABA level was observed after 24 hours (18.3 per cent) and a significant one (244.4 per cent) after 30 days.

GABA/DA ratios after determination of the control values for 1 were calculated as follows: Striatum – 0.99 after administration of GSH both after 24 hours and after 30 days, 7.78 and 7.15 respectively following intoxication with MPTP and 2.97 and 2.72, respectively, in animals intoxicated with MPTP and treated with GSH. Midbrain – no changes were noted after injection of



Table 2. GABA level (nmoles/mg protein) and GABA/DA ratios in the CB-57 mouse brain following MPTP and/or GSH administration  
 Tabela 2. Poziom GABA (nmol/mg białka) oraz stosunki stężeń GABA/DA w mózgowiu myszy CB-57 po podawaniu MPTP i/lub GSH

Experimental group Grupa doświadczalna	Survival time after last injection Czas przeżycia po ostatniej iniekcji	Striatum Prążkowie			Midbrain Śródmózgowie		
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	%	GABA/DA	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	%	GABA/DA
Control (norm) Kontrola (norma)		22.03 ± 0.84	100.0	1.00	20.02 ± 0.76	100.0	1.00
GSH	24 hrs 24 godz.	21.01 ± 0.80	95.4	0.99	18.62 ± 0.71	93.0	1.00
	30 days 30 dni	20.33 ± 0.77	92.3	0.99	10.08 ± 0.72	95.3	1.00
MPTP	24 hrs 24 godz.	35.08 ± 1.38 <sup>x</sup>	159.2	7.78	32.07 ± 1.22 <sup>x</sup>	160.2	1.58
	30 days 30 dni	84.81 ± 3.23 <sup>xx, yy</sup>	385.0	7.15	79.40 ± 3.03 <sup>xx, yy</sup>	396.6	1.67
MPTP+GSH	24 hrs 24 godz.	25.97 ± 1.00	117.9	2.97	23.69 ± 1.02	118.3	1.92
	30 days 30 dni	74.90 ± 2.87 <sup>xx, yy</sup>	340.0	2.72	68.99 ± 2.64 <sup>xx, yy</sup>	344.4	1.51

Significance: <sup>x</sup> ≤ 0.05, <sup>xx</sup> ≤ 0.01 – in comparison with the norm

<sup>yy</sup> ≤ 0.01 – in comparison with the animals investigated after 24 hrs

Poziom istotności: <sup>x</sup> ≤ 0,05, <sup>xx</sup> ≤ 0,01 – w porównaniu z normą

<sup>yy</sup> ≤ 0,01 – w porównaniu ze zwierzętami badanymi po 24 godz.

GABA/DA ratio after fixation of the control values for 1

GABA/DA – stosunek stężeń przy przyjęciu wartości kontrolnych za 1

Number of animals in each group: 7

Liczba zwierząt w każdej grupie: 7



GSH. GABA/DA ratios figured 1.58 and 1.67 in mice subjected to MPTP intoxication and 1.92 and 1.51 in the group of animals treated with MPTP and GSH after 24 hours and 30 days, respectively.

#### DISCUSSION

An important and prolonged decrease of DA content, more intensive in the striatum as compared with that in the midbrain was shown in the present experiment after intoxication with MPTP in the mouse. Similar changes have been reported recently in experimental animals intoxicated with MPTP (Heikkilä et al. 1985; Jonsson et al. 1985). Javitch et al. (1985) postulate of a different reaction of the striatum and the midbrain with MPTP, connected with selective binding of  $MPP^+$  ions in synaptic dopaminergic nerve endings, localized mainly in the striatum. An other hypothesis may be taken into consideration too, because tyrosine-3-monooxidase, the DA synthesizing enzyme exhibits different sensitivity to the toxic effect of MPTP in different structures of the brain (Schneider, Markham 1986). The way of collection of the brain samples, e.g. excision of the substantia nigra, the main structure of the nigrostriatal pathway, with surroundings modified our results obtained from the midbrain in the present work. DA content was measured in the basal part of the midbrain containing some branches of the mesolimbic pathway, which was found to be less sensitive to MPTP in ultrastructural studies (Mossakowski, Dydyk 1987) and in biochemical ones (Sershen et al. 1985; Śmiałek 1987).

Administration of GSH attenuated the toxic effect of MPTP on the DA pool in the striatum only. This phenomenon may be concerns the antioxidant action of GSH, similar to that of ascorbic acid (Sershen et al. 1985; Śmiałek 1987). It has been postulated that antioxidants inhibit the  $MPP^+$  reaction with oxygen and  $Fe^{++}$  ions and diminish free radical synthesis e.g.  $\cdot OH$  and  $O_2^{\cdot -}$ , the main pathogenic factors in damage of dopaminergic neurons (Poirier, Barbeau 1985; Sinha et al. 1986).

A different toxic effect of MPTP was noted on GABA concentration in the present work. The high increase of GABA content (240 per cent) persisted for 30 days both in the striatum and in the midbrain. On the basis of the results of Vyas et al. (1986) it is possible to suggest, that the increase of GABA level concerned the neurotoxic effect of MPTP on oxygen metabolism, inducing and increase of glutamate content, the main substrate in GABA synthesis.

Recovery of the GABA level was shown after treatment with GSH 24 hours after MPTP intoxication. On the other hand no beneficial effect was noted after 30 days, contrary to the positive effect of GSH on the DA pool. Probably  $MPP^+$  shows a different reaction with substrates and intermediates of GABA and DA metabolism. Vyas et al. (1986) demonstrated, that consumption of glutamate and beta-hydroxybutyrate depends not only on a concentration of the pyridinium ion, but on the time of its toxic activity on the rat liver.



Greater changes of the GABA/DA ratio were noted in the striatum than in the midbrain following intoxication with MPTP. It can be postulated that the unbalanced GABA/DA ratios in the named structures of the brain play an important role in evoking the parkinsonian syndrome in the mouse intoxicated with MPTP. It may be suggested, that the phenomenon of increase of the GABA/DA ratio is secondary to neuronal damage in the pars compacta of the substantia nigra following MPTP intoxication (Javitch et al. 1985).

#### CONCLUSIONS

1. MPTP intoxication caused a rapid decrease of DA level and high increase of GABA content in the striatum and midbrain of the mouse.
2. Administration of MPTP with GSH attenuated the toxic effect of MPTP on DA and GABA concentration and on the GABA/DA ratio in a different way in the striatum and the midbrain.

#### WPLYW ZREDUKOWANEGO GLUTATIONU (GSH) NA POZIOM DOPAMINY (DA) I KWASU GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA) W MÓZGU MYSZY PO ZATRUCIU 1-METYLO-4-FENYLO-1,2,3,6-CZTEROHYDROPIRYDYNA (MPTP)

#### Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu zredukowanego glutationu na poziom DA, GABA oraz stosunek stężeń GABA/DA w prążkowiu i śródmózgowiu myszy CB57 z 24 godzinnym i 30 dniowym przeżyciem po zatruciu MPTP.

MPTP podawano dootrzewnowo przez 4 kolejne dni w jednorazowej dawce 40 mg/kg masy ciała. GSH w dawce 100 mg/kg masy ciała podawano dootrzewnowo 20 min przed i 20 min po każdej iniekcji MPTP.

Stwierdzono, że MPTP gwałtownie obniża poziom DA, bardziej w prążkowiu niż w śródmózgowiu. Równocześnie wykazano przyrost puli GABA w obu badanych strukturach mózgu, znacznie większy u myszy z 30 dniowym przeżyciem po intoksykacji. Zaburzenie stosunku GABA/DA było znacznie wyższe w prążkowiu ze względu na znacznie wyższy procentowy przyrost GABA w tej strukturze. Wydaje się, że przyrost GABA w prążkowiu myszy z dłuższym przeżyciem może stanowić zjawisko wtórne, związane z uszkodzeniem neuronów dopaminergicznych warstwy zbitej istoty czarnej i mieszanych zakończeń synaptycznych GABA- i dopaminergicznych.

#### ВЛИЯНИЕ ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛЮТАТИОНА (GSH) НА УРОВЕНЬ ДОФАМИНА (DA) И ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (GABA) В МОЗГУ МЫШИ ПОСЛЕ ИНТОКСИКАЦИИ 1-МЕТИЛ-4-ФЕНИЛ-1,2,3,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНОМ (МРТП)

#### Резюме

Исследовано влияние восстановленного глутатиона на уровень DA, GABA, и на соотношение концентраций GABA/DA в стриарной системе и в среднем мозгу мышей CB57, переживших 24 часа и 30 дней после интоксикации МРТП. МРТП вводили внутривбрюшинно



в течение 4-х дней подряд в разовой дозе 400 мг/кг массы тела. GSH в дозе 100 мг/кг массы тела вводили внутривенно за 20 мин до и через 20 мин после каждой инъекции МРТР.

Обнаружено, что МРТР резко понижает уровень DA, причем более значительно в стриарной системе, чем в среднем мозгу. Одновременно найдено увеличение GABA в обеих структурах мозга, гораздо большее у мышей, переживших 30 дней после интоксикации. Нарушение соотношения GABA/DA было гораздо более значительным в стриарной системе в связи с более высоким процентом прироста GABA в этой структуре. Можно полагать, что увеличение GABA в стриарной системе мышей, проживших дольше после инъекции МРТР, является вторичным феноменом, связанным с повреждением дофаминергических нейронов плотного слоя черной субстанции и смешанных синаптических окончаний (GABA и дофаминергических).

## PIŚMIENNICTWO

1. Bugera T. E., Kosicka B., Śmiałek M.: Wpływ ostrego zatrucia octanem kobaltowym na poziom dopaminy i stosunek stężeń DA/GABA w mózgowiu szczura. *Neuropat. Pol.*, 1987, subjected for publication.
2. Burns R. S., Chiueh C. C., Markey S. P., Ebert M. H., Jacobovitz D. M., Kopin I. J.: A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 4546–4550.
3. Chiba K., Trevor A., Castagnoli N. Jr.: Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, 120, 574–578.
4. Greń J.: Modele i zadania statystyki matematycznej. PIW, Warszawa, 1970.
5. Hallman H., Olson L., Jonsson G.: Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.*, 1984, 224, 1451–1453.
6. Hallman H., Lange J., Olson L., Stromberg I., Jonsson G.: Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *J. Neurochem.*, 1985, 44, 117–127.
7. Heikkilä R. E., Hess A., Duvoisin R. C.: Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*, 1984a, 224, 1451–1453.
8. Heikkilä R. E., Hess A., Duvoisin R. C.: Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationship between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci.*, 1985, 36, 231–236.
9. Heikkilä R. E., Manzino L., Cabbat F. S., Duvoisin R. C.: Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature*, 1984b, 311, 467–469.
10. Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittmatter S. M., Snyder S. H.: Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenyl-pyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1985, 82, 2173–2177.
11. Jonsson G., Sundström E., Mefford I., Olson L., Johnsson S., Freedman R., Hoffer B.: Electrophysiological and neurochemical correlates of the neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in the mouse. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 1985, 331, 1–6.
12. Kosicka B., Bugera-Piecuch T. E., Śmiałek M.: Stosunek stężeń dopaminy/GABA w mózgu szczura w następstwie zatrucia chlorkiem manganawym. 1987 – unpublished data.
13. Love I. P., Robins E., Eyerma G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8–13.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1955, 193, 265–275.



15. Melamed E., Durst R., Frucht Y., Globus M.: Differential effect of acute and chronic haloperidol administration on dopamine turnover in rat nigrostriatal and retinal dopaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 1983, 89, 279–289.
16. Mossakowski M. J., Dydyk L.: Influence of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on the structure of substantia nigra and striatum of BC57 mouse. Abstracts of The VII Conference of the Assoc. Polish Neuropathologists and V Polish-Hungarian Neuropathological Symposium, Gdańsk, June 4–6, 1987, Abstr. pp. 19–20.
17. Perry T. L., Godin D. V., Hansen S.: Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.* 1982, 33, 305–310.
18. Poirier J., Barbeau A.: A catalyst function for MPTP in superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 131, 1284–1289.
19. Schneider J. S., Markham C. H.: Neurotoxic effect of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the cat. Tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res.*, 1986, 373, 258–267.
20. Seršen H., Reith M. E. A., Hasim A., Lajtha A.: Protection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity by the antioxidant ascorbic acid. *Neuropharmacol.*, 1985, 24, 1257–1259.
21. Sinha B. K., Singh Y., Krishna G.: Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion  $MPP^+$ . Reductive activation by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, 135, 583–588.
22. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801–1812.
23. Śmiałek M.: Effect of MPTP on redox reactions in the mouse brain. *Neuroscience* 1987, 22 (suppl.), 60.
24. Vyas I., Heikkilä R. E., Niclas W. J.: Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.*, 1986, 46, 1501–1507.
25. Yong V. W., Perry T. L., Krisman A. A.: Depletion of glutathione in brain stem of mice caused by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is prevented by antioxidant pretreatment. *Neurosci. Lett.*, 1986, 63, 56–60.

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



MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK, MAREK KITTEL\*

EFFECT OF QUINOLINIC ACID (QUIN) ON  
GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID CONCENTRATION  
IN THE RAT BRAIN

Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw,  
and \*Department of Experimental and Clinical Pharmacology, Institute of Physiology, School of  
Medicine, Warsaw

Quinolinic acid (QUIN) – 2,3-dicarboxypyridine, a tryptophan metabolite proved to have neurotoxic properties and an excitatory effect, similar to n-methyl-dl-aspartate (NMA) on some neurons of the central nervous system (Perkins, Stone 1983a). The striatum, hippocampus and cerebral cortex were found to be most sensitive to the toxic action of QUIN (Perkins, Stone 1983b). Neuronal degeneration in the striatum in experimental QUIN intoxication and similar histopathological changes in Huntington's chorea in humans suggested, that QUIN, the endogenous neurotoxin should be considered as a possible etiological factor in this disease (McGeer, Singh 1984). Moroni et al. (1984) observed an increased QUIN level and much more frequent epileptic seizures in rats during aging. Neuronal atrophy, similar to the pathomorphological changes in senile dementia suggested, that QUIN might be involved in neurodegenerative diseases (Schwarcz, Köhler 1983). Experimental studies on hippocampus in monkey showed, that QUIN evoked atrophy of pyramidal cells and damage of their postsynaptic endings and dendrites (Schwarcz et al. 1983). In some experimental models an increased motor activity and convulsions were noted both after intraventricular administration of QUIN and after stereotaxic injection into the hippocampus and striatum (Lapin 1980; Schwarcz et al. 1983). Gusel and Mikhailov (1980) suggested, that GABA may be involved in the development of kynurenine and QUIN-induced seizures. Additionally it has been noted, that activity of glutamic decarboxylase (GAD), the GABA synthesizing enzyme, decreases after administration of QUIN into the dorsal part of the hippocampus in dependence on the dose and time interval (Aldinio et al. 1987). Many authors report, that GABA concentration decreased in Huntington's disease (Perry et al. 1975), in senile dementia



(Manyam et al. 1980; Seidal et al. 1981) and in epilepsy (Schmidt, Löschner 1982). The aim of the present work was to evaluate GABA concentration in some structures of the rat brain after intracerebral administration of QUIN.

#### MATERIAL AND METHODS

White Wistar rats, males 150–180 g of body weight were used for the experiment. The animals were divided into four groups: 1st group – intact rats, 2nd group – rats injected intraperitoneally with chloralhydrate (0.3 g/kg), 3rd group – rats anesthetized with chloralhydrate and placed in a stereotaxic frame. Injections were made through a burr hole in the right parietal bone by means of a Hamilton syringe into the hippocampus. Coordinates were chosen: 2 mm from the midline, 4.25 mm posterior to the bregma and 3 mm below the dura. One  $\mu$ l of 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 was administered and the accuracy of the injection was controlled histologically and in the stereotaxic microscope during the experiment. Fourth group comprised rats operated under similar conditions as animals of the 3rd group, but instead phosphate buffer injected with the same volume of QUIN (120  $\mu$ g dissolved in 2 N NaOH and buffered with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 (according to Björklund et al. 1986).

The animals were decapitated 4 hours after the beginning of the experiment and the heads were immediately frozen in liquid nitrogen. The striatum, parietal cortex and hippocampus were used for the estimations, separately from the right and left hemisphere. GABA concentration was measured spectrofluorimetrically in an Aminco-Bowman apparatus at 380–450 nm according to Love et al. (1958) with Sutton and Simmond's (1974) modification. Protein was measured after Lowry et al. (1951). The results were calculated by analysis of variance after Newman and Keuls and significance was estimated according to Snedecor's F distribution table (Greń 1970).

#### RESULTS

GABA concentration in the rat brain structures following experimental intoxication with QUIN are shown in Table 1.

GABA concentrations in intact animals were as follows: in the striatum  $22.46 \pm 0.65$  nmoles/mg protein, in the parietal cortex –  $14.84 \pm 0.41$  nmoles/mg protein and in the hippocampus  $14.53 \pm 0.52$  nmoles/mg protein. Anesthesia with chloralhydrate evoked a mild, however, significant increase of GABA concentration in the striatum, parietal cortex and hippocampus, respectively by 11.5%, 13.2% and 14.7%. In the animals injected with the phosphate buffer into the dorsal part of the right hippocampus increase of GABA level was almost similar to the concentration in the animals of the 2nd group and in the operated right hemisphere it was insignificantly higher than in the left one. After intoxication with QUIN a significant decrease of GABA



Table 1. GABA content (nmoles/mg protein) in the rat brain following intoxication with QUIN

Tabela 1. Zawartość GABA w mózgu szczura (nmol/mg białka) po podaniu kwasu chinolinowego do hipokampa

Experimental group Grupa doświadczalna	Striatum Prążkowie		Parietal cortex Kora ciemieniowa		Hippocampus Hipokamp	
	right prawe	left lewe	right prawa	left lewa	right prawy	left lewy
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$		$\bar{x} \pm \text{SEM}$		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	
Control (norm) Kontrola (norma)	22.46 ± 0.65	(5)	14.48 ± 0.41	(6)	14.53 ± 0.52	(6)
Chloralhydrate Wodzian chloralu	25.05 ± 0.43 <sup>x</sup>	(6)	16.80 ± 0.18 <sup>x</sup>	(6)	16.67 ± 0.17 <sup>x</sup>	(6)
Sham operation Operacja kontrolna	26.26 ± 0.62 <sup>x</sup>	(6)	24.97 ± 0.57 <sup>x</sup>	(6)	17.36 ± 0.27 <sup>x</sup>	(6)
QUIN	17.19 ± 0.17 <sup>x,v,o,z</sup>	(6)	22.30 ± 0.35 <sup>v,o,z</sup>	(6)	12.31 ± 0.13 <sup>x,v,o,z</sup>	(6)
					15.64 ± 0.24 <sup>z</sup>	(6)
					12.86 ± 0.27 <sup>x,v,o,z</sup>	(6)
					15.77 ± 0.25 <sup>xx,z</sup>	(6)

In brackets number of animals is given.

W nawiasach - liczba zwierząt.

Significance <sup>xx,x</sup> - in comparison with the norm  $\leq 0.05$  and  $\leq 0.01$ , respectively

<sup>v</sup> -  $\leq 0.01$  in comparison with the group with chloralhydrate

<sup>o</sup> -  $\leq 0.01$  in comparison with the sham operation

<sup>z</sup> -  $\leq 0.01$  differences between right and left hemisphere

Poziomy istotności: <sup>xx,x</sup> - w porównaniu z normą odpowiednio  $\leq 0,05$  i  $\leq 0,01$

- <sup>v</sup>  $\leq 0,01$  w stos. do grupy z wodzianem chloralu

- <sup>o</sup>  $\leq 0,01$  w porównaniu z operacją kontrolną

- <sup>z</sup>  $\leq 0,01$  różnice między prawą i lewą półkulą



concentration in the right hemisphere was noted in comparison with the control animals, e.g. in the striatum by 34.5%, in the parietal cortex by 29.1% and in the hippocampus by 26.1%. A significant depletion of GABA level was observed too in the right hemisphere injected with QUIN in comparison with the unoperated left one and in the striatum by 22.8%, in the parietal cortex 21.3% and in the hippocampus 18.5%. The concentration of GABA approximated the normal level in the striatum and in the parietal cortex, and increased insignificantly (by 8.5%) in the hippocampus of the left hemisphere in this experimental group.

#### DISCUSSION

Following administration of 120 µg of QUIN into the right hippocampus a decrease of GABA level by about 1/4 to 1/3 in comparison with the norm was noted in the striatum, parietal cortex and hippocampus. It would seem that the described phenomenon was connected with a decrease of GABA synthesis. This hypothesis seems to be confirmed by results indicating a depletion of glutamic decarboxylase activity by about 30 per cent after injection with QUIN (50 µg), up to the 60th day (Aldinio et al. 1987). The very high decrease of GABA level after injection of a higher dose of QUIN observed in our experiment after 4 hours may suggest a possible additional stimulation of GABA catabolism by the neurotoxin.

Schwarcz et al. (1983) observed epileptic seizures in the rat as early as 19 to 32 min after injection of QUIN into the hippocampus. Czuczwar and Meldrum (1982) noted convulsions in the mouse 14 min after i.p. injections and Lapin (1981) 137 min after intraventricular administration of QUIN (5 µg). It is known that epileptic seizures may be connected with a decrease of the GABA pool. In our experiment, although a depletion of the GABA level was noted, no increased motor activity and no epileptic seizures were observed during a 4-hour period. The behaviour of the animals seemed to be similar to that of controls. The animals awake 1 to 1 and 1/2 hour after chloralhydrate injection and showed a decreased motor activity during the experiment.

The greatest drop of GABA level was noted in the present experimental material in the striatum, however, QUIN was administered directly into the hippocampus. Maybe the sensitivity of particular structures of the CNS to QUIN concerns the physiological concentration of this endoneurotoxin in different brain regions. It has been postulated, that the lowest QUIN level is noted in the striatum, it is moderate in the hippocampus and highest in the cerebral cortex. Penetration of QUIN from the hippocampus after intoxication might evoke an increase of its concentration up to the toxic level in the most sensitive to QUIN anterior part of the striatum (Perkins, Stone 1983a). A significant decrease of GABA level (10.7 per cent) in the striatum in the left unoperated hemisphere and small differences between both sides in the cortex and the hippocampus in comparison with the norm in the present work may



confirm the hypothesis, that the striatum represents very high sensitivity to QUIN.

A decrease of GABA concentration by about 18.5 to 22.0 per cent was noted in the right operated hemisphere in comparison with the left one. Except for the hippocampus, the results approximated the norm in the structure of the left hemisphere. A blood-brain barrier penetration of QUIN occurred only in 60 per cent (Gal, Sherman 1978), and hence probably its milder toxic effect was observed in the structures of the left unoperated hemisphere. Moreover, the release of QUIN from the place of its administration appeared to be slower under anesthesia (Stone, Connick 1985). In the present experiment — penetration of QUIN to the left hemisphere seemed to be slight, except to the striatum, during the 4-hour period, because the GABA level decreased only in this structure. Chloralhydrate anesthesia diminished undoubtedly the toxic effect of QUIN on the GABA-ergic system by its ability to increase GABA concentration in the investigated CNS structures.

### CONCLUSIONS

1. QUIN decreased the GABA level especially in the striatum in comparison with the cerebral cortex and hippocampus after intrahippocampal injection into the rat.

2. Reduction of GABA concentration after QUIN intoxication depends on the distances of the cerebral structures from the place of neurotoxin administration.

### WPLYW KWASU CHINOLINOWEGO (QUIN) NA POZIOM KWASU GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA) W MÓZGU SZCZURA

#### Streszczenie

Celem niniejszej pracy była ocena zmian poziomu GABA w prążkowiu, korze mózgowej i hipokampie po domózgowym podaniu QUIN. Do badań użyto 24 szczury Wistar, samce o masie ciała 150–180 g. Kwas chinolinowy w dawce 120 µg podawano jednostronnie do grzbietowej części zakrętu hipokampa, a poziom GABA oznaczano po 4 godzinach. Stwierdzono najwyższe obniżenie puli GABA w prążkowiu w porównaniu z korą mózgową i hipokampem. W badanym przedziale czasu obniżenie stężenia GABA w badanych strukturach mózgu zależy od odległości od miejsca podania neurotoksyny.

### ВЛИЯНИЕ ХИНОЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ (QUIN) НА УРОВЕНЬ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (GABA) В МОЗГУ КРЫСЫ

#### Резюме

Оценивались изменения уровня GABA в стриарной системе, мозговой коре и гиппокампе. Исследования проведены на 24 крысах линии Вистар, самцах весом 150–180 г. Хинолиновую кислоту в дозе 120 µg вводили с одной стороны в дорзальную часть извилины



гиппокампа. Уровень GABA измеряли на 4 часа позднее. По сравнению с новой корой и гиппокампом, самое резкое снижение уровня GABA обнаружено в стриарной системе. В течение исследуемого времени понижение концентрации GABA в различных структурах мозга зависит от их расстояния от места введения QUIN.

## PIŚMIENNICTWO

1. Aldinio C., Ułtas J., Oderfeld-Nowak B.: Neurochemical effect of quinolinic acid in the rat hippocampus. *Neuroscience*, 1987, 22, 663.
2. Björklund H., Olson L., Dahl D., Schwarcz R.: Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res.*, 1986, 371, 267–277.
3. Czuczwar S. J., Meldrum B. S.: Protecting against chemically induced seizures by 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid. *Eur. J. Pharmacol.*, 1982, 83, 335–338.
4. Gal E. M., Sherman A. D.: Synthesis and metabolism of 1-kynurenine in rat brain. *J. Neurochem.*, 1978, 30, 607–613.
5. Greń J.: Modele i zadania statystyki matematycznej. PIW, Warszawa, 1970.
6. Gusel W. A., Mikhailov I. B.: Effect of tryptophan metabolites on activity of the epileptogenic focus in the frog hippocampus. *J. Neural., Transm.*, 1980, 4, 41–52.
7. Lapin I. P.: Effect of kynurenine and quinolinic acid on the action of convulsants mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1980, 13, 17–20.
8. Lapin I. P.: Kynurenines and seizures. *Epilepsia*, 1981, 22, 257–265.
9. Love I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8–13.
10. Loeschner W.: Mechanism of action of antiepileptic drugs. Experimental results on the role of neurotransmitters. *Nervenarzt.*, 1981, 52, 61–67.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265–275.
12. Manyam N. V. B., Katz L., Hare T. A., Gerber J. C., Grosman M. H.: Levels of gamma-aminobutyric acid in cerebrospinal fluid in various neurological disorders. *Arch., Neurol.*, 1980, 37, 352–355.
13. McGeer., Singh E.: Neurotoxic effects of endogenous materials: quinolinic acid, l-pyroglutamic acid and TRH. *Exp. Neurol.*, 1984, 86, 410–413.
14. Moroni F., Lombardi G., Moneti G., Aldinio C.: The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content during the aging process. *Neurosci. Lett.*, 1984, 47, 51–56.
15. Perkins M. N., Stone T. W.: Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res.*, 1983a, 259, 172–176.
16. Perkins M. N., Stone T. W.: In vivo release of (<sup>3</sup>H)-purines by quinolinic acid and related compounds. *Br. J. Pharmacol.*, 1983b, 80, 263–267.
17. Perry T. L., Hansen S., Kennedy J., Wada J. A., Thompson G. B.: Aminoacids in human epileptogenic foci. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 752–754.
18. Schmidt D., Löschner W.: Plasma and cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid in neurological disorders. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1982, 45, 931–935.
19. Schwarcz R., Brush G. S., Foster A. C., French A. D.: Seizure activity and lesions after intrahippocampal quinolinic acid injection. *Exp. Neurol.*, 1984, 84, 1–17.
20. Schwarcz R., Kohler C.: Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci. Lett.*, 1983, 38, 85–90.
21. Schwarcz R., Whetsell W. O., Mangano R. M.: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316–318.
22. Seidel J., Kästner I., Winkelmann E.: A loss of GABAergic hippocampus innervation in rats with



- cobalt induced epilepsy demonstrated by Wolman's method. *Acta Histochem.*, 1981, 34, 115–121.
23. Stone T. W., Connick J. H.: Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system. *Neuroscience*, 1985, 15, 597–617.
24. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801–1805.

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



## DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

4 lutego 1988 r. odbyła się w Gdańsku uroczystość nadania prof. dr med. Żofii Majewskiej tytułu Doktora Honoris Causa, przyznanego jej przez Senat Akademii Medycznej w Gdańsku.

\*

Rada Państwa 10 grudnia 1987 r. nadała tytuł profesora zwyczajnego nauk medycznych prof. Ignacemu Waldowi, Sekretarzowi Naukowemu Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie. 11 marca 1988 r. tytuł profesora nadzwyczajnego uzyskała doc. Ewa Działek z Kliniki Neurologicznej AM w Łodzi, a 18 kwietnia 1988 r. tytuł profesora nadzwyczajnego nadany został doc. Wiesławowi Kawiakowi, kierownikowi Kliniki Neurologicznej AM w Lublinie.

\*

10 grudnia 1987 r. odbyło się w Instytucie Psychiatrii i Neurologii w Warszawie kolokwium habilitacyjne dr med. Olgierda Puciłowskiego. Tematem pracy habilitacyjnej było: „Agresja afektywna: Ośrodkowa regulacja monoaminergiczna”.



Zakład Narodowy im. Ossolińskich – Wydawnictwo. Wrocław 1988.  
Nakład: 590 egz. Objętość: ark. wyd. 12,10, ark. druk. 10,50, ark. A<sub>1</sub>  
– 14. Papier offset. kl. III, 80g, 70 × 100. Oddano do składania  
1988.06.06. Podpisano do druku 1988. 11.15. Druk ukończono w grud-  
niu 1988 r. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 3356/88. K-4.  
Cena zł 200,–



## СОДЕРЖАНИЕ

И. Гаусманова-Петрусевич: Болезнь Emery-Dreifussa . . . . .	265
И. Финовицка, А. М. Каминска: Влияние денервации на созревание мышц крысы . . . . .	283
А. Заремба-Ковальска, Б. Гайковска: Влияние полной ишемии мозга на ультраструктуру гигантоклеточного ядра ствола мозга крысы . . . . .	303
Б. Гайковска, А. Заремба-Ковальска: Влияние полной ишемии мозга на ультраструктуру гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы . . . . .	317
Г. Шуманска, М. Я. Моссаковски, С. Янушевски: Изменение активности щелочной фосфатазы и адениловой циклазы сосудистой сети мозга при экспериментальном постреанимационном синдроме . . . . .	335
С. Краевски, Э. Долинска, Я. Рафаловска: Оценка гемато-энцефалического барьера при некоторых случаях инфаркта мозга человека. Иммуноцитохимическое исследование . . . . .	359
П. Олейничак: Миоклонии неба и гипертрофия олив — описание случая . . . . .	377
А. Гарашевска: Ультраструктура аксонов при нарушениях миелинизации центральной нервной системы кролика <i>pt</i> . . . . .	385
М. Вендер, Х. Хейдук-Хантке, А. Годлевски: Кариометрическое исследование глиальных клеток мозолистого тела крыс, развивающихся на диетическом режиме с недостаточностью липидов . . . . .	403
М. Смялек: Влияние восстановленного глутатиона (GSH) на уровень дофамина (DA) и гамма-аминомасляной кислоты (GABA) в мозгу мыши после интоксикации 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (MPTP) . . . . .	415
М. Смялек, М. Киттель: Влияние хинолиновой кислоты (QUIN) на уровень гамма-аминомасляной кислоты (GABA) в мозгу крысы . . . . .	423



### SPIS TREŚCI

Irena Hausmanowa-Petrusewicz: Choroba Emery-Dreifussa . . . . .	265
Jolanta Finowicka, Anna M. Kamińska: Wpływ odnerwienia na dojrzewanie mięśni u szczura . . . . .	283
Anna Zareba-Kowalska, Barbara Gajkowska: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę jądra olbrzymiokomórkowego pnia mózgu szczura . . . . .	303
Barbara Gajkowska, Anna Zareba-Kowalska: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego . . . . .	317
Grażyna Szumańska, Mirosław J. Mossakowski, Sławomir Januszewski: Zmiany aktywności fosfatazy zasadowej i cyklazy adenylowej w sieci naczyniowej mózgu w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym . . . . .	335
Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Janina Rafałowska: Ocena bariery krew-mózg w wybranych przypadkach zawałów mózgu człowieka. Badania immunocytochemiczne . . . . .	359
Piotr Olejniczak: Mioklonie podniebienia a przerost oliwek — opis przypadku . . . . .	377
Anna Taraszewska: Ultrastruktura aksonów w zaburzeniach mielinizacji ośrodkowego układu nerwowego u królika pt . . . . .	385
Mieczysław Wender, Hanna Hejduk-Hantke, Antoni Godlewski: Karyometryczne badania komórek glejowych spoidła wielkiego szczurów rozwijających się na diecie z niedoborem lipidów . . . . .	403
Mieczysław Śmiałek: Wpływ zredukowanego glutationu (GSH) na poziom dopaminy (DA) i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w mózgu myszy po zatruciu 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-czterohydropirydyną (MPTP) . . . . .	415
Mieczysław Śmiałek, Marek Kittel: Wpływ kwasu chinolinowego (QUIN) na poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura . . . . .	423

### CONTENTS

Irena Hausmanowa-Petrusewicz: The Emery-Dreifuss disease . . . . .	265
Jolanta Finowicka, Anna M. Kamińska: Effect of denervation on muscle maturation in rats . . . . .	283
Anna Zareba-Kowalska, Barbara Gajkowska: Effect of complete cerebral ischemia on the ultrastructure of the nucleus gigantocellularis of the brain stem in the rat . . . . .	303
Barbara Gajkowska, Anna Zareba-Kowalska: Effect of complete cerebral ischemia on the ultrastructure of hypothalamoneurohypophyseal system of rat . . . . .	317
Grażyna Szumańska, Mirosław J. Mossakowski, Sławomir Januszewski: Changes in the activity of alkaline phosphatase and adenylate cyclase in the brain vascular network in experimental postresuscitation syndrome . . . . .	335
Stanisław Krajewski, Ewa Dolińska, Janina Rafałowska: An appraisal of the blood-brain barrier in some cases of human brain infarct. Immunocytochemical investigations . . . . .	359
Piotr Olejniczak: Palatal myoclonus and olivary hypertrophy — a case report . . . . .	377
Anna Taraszewska: Ultrastructure of axons in disturbed CNS myelination in pt rabbit . . . . .	385
Mieczysław Wender, Hanna Hejduk-Hantke, Antoni Godlewski: Karyometric studies of glial cells in corpus callosum of rats developing on a fat deficient diet . . . . .	403
Mieczysław Śmiałek: Effect of reduced glutathione (GSH) on dopamine (DA) and gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration in the mouse brain following intoxication with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) . . . . .	415
Mieczysław Śmiałek, Marek Kittel: Effect of quinolinic acid on gamma-aminobutyric acid concentration in the rat brain . . . . .	423