

eqr 2

C 165

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROATOLOGÓW POLSKICH

NEUROATOLOGIA POLSKA

286, 291

TOM 27

1989

ZESZYT 3

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 27

1989

ZESZYT 3

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda), 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 8.03.1989



MARIA DĄMBSKA¹, PIOTR B. KOZŁOWSKI^{2,3}, JOANNA H. SHER³,
KRYSTYNA WIŚNIEWSKI²

CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN AIDS — AN UPDATE

¹ Laboratory of Developmental Neuropathology Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, Warszawa; ² New York State Institute for Basic Research in Developmental Disabilities, Staten Island, New York; ³ Department of Pathology, State University of New York, Health Science Center at Brooklyn and Kings County Hospital Center, Brooklyn, New York

The acquired immune deficiency syndrome (AIDS) was observed for the first time in the USA and Haiti in 1978–1979 and data were first published in 1981 (CDC 1982, Pape et al. 1983). Since then, its incidence has been increasing in all parts of the world. As of March 21, 1988, 84,256 cases from 129 countries were reported to the World Health Organization (WHO), (CDC 18, 1988). The major abnormality in this syndrome consists of a defect of cell-mediated immunity and appears as depletion of T4 + helper/inducer lymphocytes (Valdiserri 1985). This defect is primarily the result of the selective tropism of the Human Immunodeficiency Virus (HIV), the etiologic agent of AIDS, for this population of lymphocytes (Ho et al. 1987). Immunodeficiency in AIDS leads to a particular susceptibility to a variety of uncommon opportunistic infections. There also, is an increased frequency of uncommon neoplasms like Kaposi sarcoma, lymphoma and basal cell carcinoma (Elder, Sever 1988).

CNS involvement in AIDS may be a result of an opportunistic infection or a result of the direct effect of HIV. Neurological complications in AIDS are frequent and occur in 40 to 90 percent of cases (Epstein, Sharer 1988; Levy, Bredesen 1988; Petito 1988; Price et al. 1988). CNS involvement, which is at present attributed to the direct effect of HIV, is diagnosed as a subacute encephalitis or HIV encephalopathy (Petito et al. 1986; Levy, Bredesen 1988). More frequent appearance of AIDS in infants and children expanded the spectrum of CNS lesions in AIDS.

In this paper we would like to present our most recent experience with the neuropathological picture of AIDS as observed during the years 1982–1987 in a large collection of autopsy cases from a New York City Hospital.

MATERIAL AND METHODS

The autopsy material came from the Neuropathology Laboratory of the State University of New York Health Science Center in Brooklyn, New York. This center (over 1600 beds) serves a population of 2.3 million in Brooklyn. During the period of 1982–1987, 168 cases of AIDS were evaluated in the Neuropathology Laboratory. Four representative cases were selected for presentation including clinical data, pathologic findings and neuropathological examination.

RESULTS

The whole examined material consisted of 168 autopsy cases (Tab. 1). The number of pediatric cases increased yearly in our collection from 1982 to 1987. In 18 of them, the age at death was under two years. Opportunistic CNS

Table 1. AIDS cases in 1982–1987

Tabela 1. Przypadki AIDS w latach 1982–1987

Adults Dorośli		Infants and children Niemowlęta i dzieci	(0–9 years of age) (0–9 lat)
Females Kobiety	29	Females Dziewczynki	11
Males Mężczyźni	115	Males Chłopcy	13
Total Razem	144	Total Razem	24

infections were the most common lesions in adult cases, but HIV encephalopathy was also seen (Tab. 2).

Histologically normal brains were seen in 24 cases (16.7%). There were also cases with pathologically non-specific changes, mainly vasogenic (infarcts, hemorrhages) or hypoxic after respiratory distress, not directly related to opportunistic infections.

The HIV encephalopathy/encephalitis was seen in 6/18 cases together with opportunistic infections (two with toxoplasmosis, three with CMV infections, one with mycotic abscess). HIV encephalopathy first appeared in our collection in 1984 and has been seen more frequently in recent years. In the years 1982 and 1983, not one case of HIV encephalopathy was seen among 36 cases of AIDS, while in 1984, 1985 and 1986, three such cases were diagnosed each year. In 1987, nine cases of HIV encephalopathy were found among 46 cases of AIDS. Only one case of vacuolar myelopathy was found in our material. The pediatric cases also present some peculiarities of CNS involvement (Tab. 3). In addition, one case of primary CNS lymphoma and one of

Table 2. CNS involvement in 144 adults cases

Tabela 2. Zmiany w układzie nerwowym w 144 przypadkach dorosłych

Diagnosis Rozpoznanie	Number of cases Liczba przy- padków	% %
HIV encephalopathy/encephalitis Encefalopatia/encefalit wywołany wirusem HIV	18	12.5
CNS toxoplasmosis Toksoplazmoza OUN	31	21.5
CNS cryptococcosis Kryptokokoza OUN	22	15.3
Cytomegalovirus encephalitis Zapalenie mózgu wywołane wirusem cytomegalii	14	9.7
Progressive multifocal leukoencephalopathy Postępująca wielogniskowa encefalopatia	5	3.5
CNS primary lymphoma Pierwotny chłoniak OUN	4	2.8

Table 3. CNS involvement in 24 infants and children

Tabela 3. Zmiany w układzie nerwowym u 24 niemowląt i dzieci

Diagnosis Rozpoznanie	Number of cases Liczba przy- padków	% %
Microcephaly and/or brain atrophy Małomózgowie i/lub zanik mózgu	14	58.0
Calcific vasopathy and parenchymal mineralization Zwapnienia w ścianie naczyń i w tkankach mózgu	13	55.0
HIV encephalopathy/encephalitis Encefalopatia/encefalit wywołany wirusem HIV	6	25.0
Microglial nodules Grudki mikroglejowe	3	12.5
Cytomegalovirus encephalitis Zapalenie mózgu wywołane wirusem cytomegalii	2	8.3

developmental brain abnormalities (cortical malformations with unclear relations of those changes to HIV infection) were seen. A total of 22 out of the 24 cases showed CNS abnormalities. One case of CNS toxoplasmosis, one of CMV encephalitis with cryptococcosis, one of progressive multifocal leukoencephalopathy and one of HIV encephalopathy/encephalitis were chosen to present characteristic features of neuropathological syndromes occurring in the CNS in AIDS patients.

Description of cases

Case 1. F.P. 29-year-old male

Clinical data: The patient was an IV drug abuser. He had a history of dental abscess, anergy and altered mental state. Generalized seizures occurred and CNS tumor was diagnosed. Brain biopsy resulted in diagnosis of toxoplasmosis (Fig. 1). Two weeks later, bronchopneumonia with subpleural abscess developed. Open lung biopsy revealed interstitial pneumonitis with *pneumocystis carinii* infection and severe necrotizing bronchopneumonia. The patient was cachectic with decubitus ulcers. Respiratory deficiency occurred and resulted in death. Both clinical and pathological (biopsy) findings lead to the diagnosis of AIDS. Pathological findings at autopsy included monilial esophagitis, bilateral necrotizing bronchopneumonia with empyema, pleural and pericardial effusions and ascites.

Neuropathological examination showed four firm, pale, yellow well demarcated necrotic lesions in the left hemisphere, 2 to 2.5 cm in diameter, localized in the frontal, temporal, parietal and occipital lobes, and a large surgical defect in the right hemisphere. Microscopic observation revealed necrotic tissue within this defect. This area was surrounded by a thick layer of macrophages, extensive astrocytic proliferation and some granulation tissue. The four necrotic foci in the left hemisphere consisted of extensive necrotic material, containing central flecks of calcium. There was a variable amount of inflammation surrounding the necrosis (Fig. 2). In some regions, only a few scattered macrophages and lymphocytes were present, whereas, in others there was a broad band of macrophages and accumulations of lymphocytes and plasma cells. Similar infiltrations were present around vessels in these areas. Only a few polymorphonuclear leukocytes were seen. In the surrounding white matter some edema and astrocytosis were found. Within the meninges, there were only small lymphocytic infiltrations if the lesions extended up to them. The cortex adjacent to the inflamed white matter was remarkably free of pathologic changes. Within the observed lesions, several toxoplasma cysts and free toxoplasma organisms were seen. In the midbrain, medulla and dentate nucleus, several microglial nodules were found. Toxoplasmosis of the CNS in the course of AIDS was diagnosed.

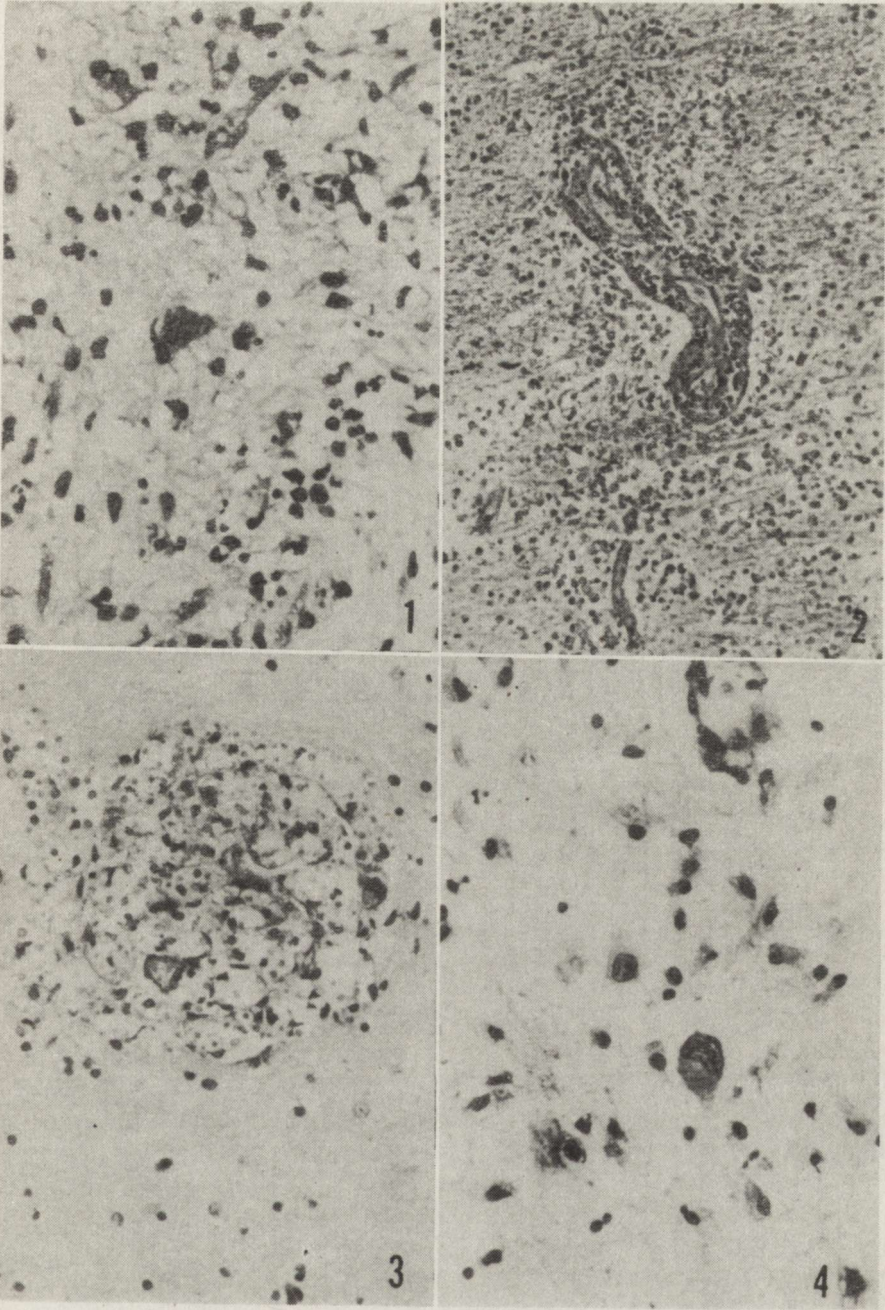


Fig. 1. Toxoplasma cyst in brain biopsy. HE. $\times 104$

Ryc. 1. Cysta z toksoplazmami w biopsji mózgowej. HE. Pow. $104\times$

Fig. 2. The border of tissue necrosis: moderate infiltration and vasculitis. HE. $\times 25$

Ryc. 2. Brzeg ogniska martwicy, umiarkowane nacieki w tkance wokół naczynia. HE. Pow. $25\times$

Fig. 3. Cryptococcal organism collections around parenchymal vessel. HE. $\times 62,5$

Ryc. 3. Skupienie kryptokoków wokół naczynia. HE. Pow. $62,5\times$

Fig. 4. Two cells with cytomegalic inclusions. HE. $\times 104$.

Ryc. 4. Dwie komórki z wtrętami cytomegalii. HE. Pow. $104\times$

Case 2. J. W. 42-year-old male

Clinical data: The patient was an IV drug abuser since the age of ten years, and also a cocaine and alcohol abuser. On admission to the hospital, he had a history of *pneumocystis carinii* pneumonia. Two years ago, he presented with fever, weight loss, headache and seizures. Diffuse lymphadenopathy, stiff neck and 7th cranial nerve paresis were observed. Numerous cryptococci were found in the cerebrospinal fluid (CSF). Immunological testing showed 2700 WBC with 11% lymphocytes. IgG was 2349 mg% (normal – 1800 mg%), IgM 152 mg% (normal – 250 mg%) and IgA was over 500 mg% (normal – 400 mg%). Complement and IgE levels were normal. T-cell levels were 22%, and 45% on two occasions. Using monoclonal antibodies, it was determined that 90% of the T-cells were suppressor and 10% helper. There was no natural killer-cell activity and no *in vitro* interferon production. Responses of lymphocytes to mitogen stimulation were normal for phytohemagglutinin and low for concavalin A. The antibody response to pneumovax was poor. Granulocyte chemoluminescence, chemotaxis and bacterial capacity were normal. During a long treatment, cryptococci were always present in CSF. Fever (about 39°C), anemia and neutropenia continued. At the end of life, renal failure occurred, the patient became confused and died after seven months in the hospital. The clinical course corresponds to the diagnosis of AIDS. Autopsy was limited to the brain only.

Neuropathological examination revealed no macroscopic lesions except for a focus of encephalomalacia in the right cerebellar hemisphere. Microscopically there were cryptococcal organism aggregations in the subarachnoid space and in perivascular areas in the cortex, with extension into the parenchyma of the brain (Fig. 3). Inflammatory response was almost totally absent. In some regions, very small microabscesses were found. In the cerebellum, a large area of semi-cystic malacia included massive aggregations of cryptococcal organisms. In the subependymal area, focal changes corresponding to cytomegalovirus encephalitis including cells with typical inclusions were observed (Fig. 4). Cryptococcal meningitis with perivascular and suprachoroid infiltration and cytomegalovirus encephalitis in the course of AIDS were diagnosed.

Case 3. S. V. 32-year-old female

Clinical data: The patient was an IV drug and alcohol abuser with a history of myoclonic jerks and seizures during the last six months. She was AIDS-seropositive. Progressive neurological deficit was observed as well as progressive respiratory insufficiency, which was the cause of her death. Autopsy was limited to the brain only.

Neuropathological examination revealed on coronal sections of the cerebral hemispheres numerous dark grey irregular spots in the center of the right frontal and occipital lobes and bilaterally in subcortical white matter, some of them involving the cortex. Some foci of shrunken yellowish white matter were also seen. Similar changes were observed in the white matter of the cerebellum

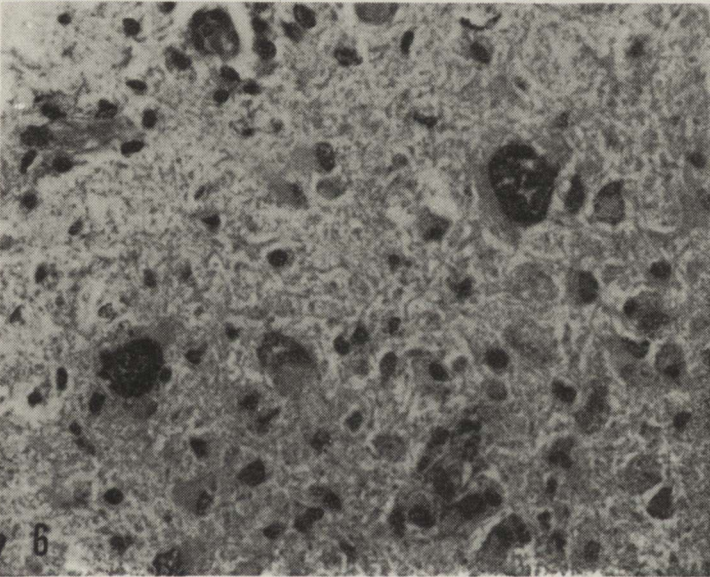
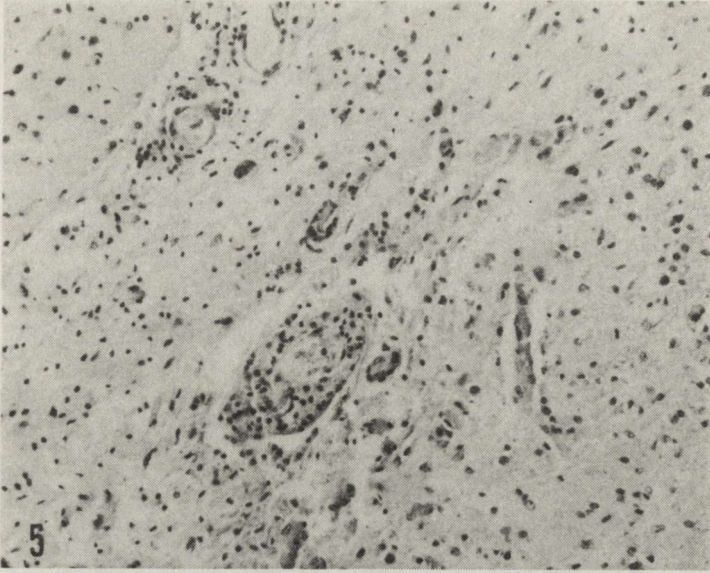


Fig. 5. Small focal white matter lesion with abundant astroglial proliferation. HE. $\times 62.5$
Ryc. 5. Małe ognisko uszkodzenia istoty białej z obfitym rozplemem astrogleju. HE. Pow. $62,5 \times$

Fig. 6. Large bizarre astrocytes with hyperchromatic nuclei. HE. $\times 104$
Ryc. 6. Olbrzymie astrocyty z nadbarwliwymi jądrami. HE. Pow. $104 \times$

and some small spots in the brain stem. Microscopical observation revealed pale, rarefied white matter, occasionally with cystic degeneration topographically corresponding to the macroscopic focal changes. Numerous glial cells were seen within the foci (Fig. 5). Most of them were reactive glial cells, and some looked like Alzheimer type II cells. Large, bizarre astrocytes with

hyperchromatic nuclei were rather numerous (Fig. 6). Oligoglial hypertrophied cells with nuclear inclusion bodies were also found within focal lesions. Microglial proliferation around blood vessels, and numerous microglial nodules in the vicinity of the lesions were seen. Progressive multifocal encephalopathy in AIDS patient was diagnosed.

Case 4. W. W. 30-year-old female

Clinical data: The patient was an IV drug abuser, anorexic, with lymphadenopathy, hospitalized twice during 1–1/2 months with fever, dyspnea and chest pains. Sepsis with embolic events, pancytopenia, renal insufficiency, dehydration and endocarditis were diagnosed and despite treatment, resulted in death. **Pathological findings:** Autopsy confirmed bacterial endocarditis and septic pulmonary embolism. Mycobacteriosis involving the abdominal lymph nodes was the only opportunistic infection found at autopsy.

Neuropathological examination: On coronal sections no focal lesions were found in the CNS. Microscopic examination revealed many microglial nodules disseminated predominantly in the white matter of the frontal, temporal and occipital lobes (Fig. 7). Only single nodules were found in basal ganglia, brain stem and spinal cord. Several microglial nodules contained multinucleated giant cells (Fig. 8). Few perivascular accumulations of macrophages mixed with lymphocytes were seen (Fig. 9). The neurons and the white matter did not present any other significant changes. The vessels with hyalinized walls seen in the white matter were disproportionately numerous with respect to the age of the patient (Fig. 10). AIDS encephalopathy was diagnosed.

DISCUSSION

The material presented is sufficiently extensive to be a representative study of the neuropathological changes in AIDS. The sex distribution of our adult cases is similar to those in large series of cases (CDC 18, 1988; Piot et al. 1988) reported elsewhere and is related to the high incidence of AIDS in homosexuals and bisexual men, the high-risk group for this disease (CDC 47, 1984; CDC 4, 18, 1988). Another high-risk group is the group of intravenous drug abusers (CDC 4, 18, 1988). The transmission of HIV has been proved to occur through sexual contacts, (mostly homosexual) sharing contaminated needles, through transfusion of blood products and also through transplacental transmission to fetuses (CDC 27, 1984; Shannon 1985). The possibility of perinatal transmission, during- and post-delivery, was also entertained (Edmondson 1988). Up to the end of 1987, 750 pediatric patients were reported from U.S.A. and 251 from Europe (MMWR 18, 1988). Two and four tenths percent of AIDS cases in Europe were less than 14 years old (MMWR 4, 1988). The large number of pediatric autopsy AIDS cases appearing in our collection reflects the increasing number of AIDS cases in the pediatric group.

The opportunistic infections in AIDS were diagnosed early in AIDS

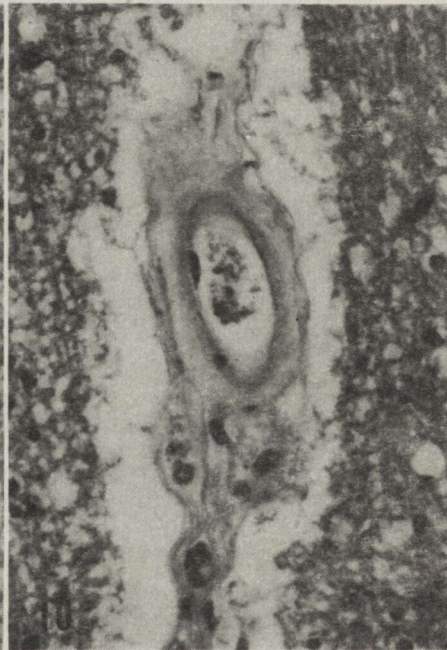
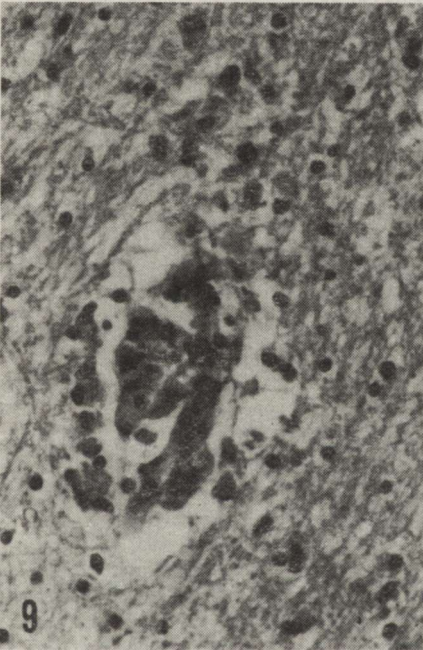
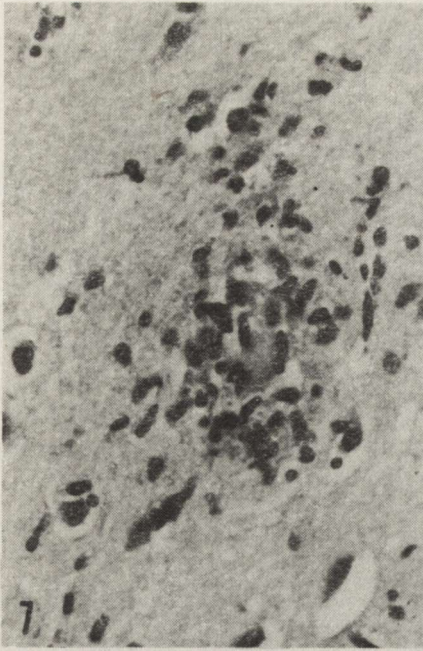


Fig. 7. Microglial nodule in the white matter. HE $\times 62.5$

Ryc. 7. Grudka mikroglejowa w istocie białej. HE. Pow. $62,5 \times$

Fig. 8. Multinucleated giant cell in perivascular area. HE. $\times 200$

Ryc. 8. Wielojądrzasta komórka obrzymia w sąsiedztwie naczynia. HE. Pow. $200 \times$

Fig. 9. Small perivascular infiltration containing macrophages. HE. $\times 62.5$

Ryc. 9. Mały naciek okołonaczyniowy zawierający makrofagi. HE. Pow. $62,5 \times$

Fig. 10. Hyalinized vessel. Perivascular infiltration totally absent. HE. $\times 62.5$

Ryc. 10. Hialinizacja ściany naczynia. Całkowity brak nacieku okołonaczyniowego. HE. Pow. $62,5 \times$

epidemics. CNS toxoplasmosis was particularly frequent (Luft et al. 1984; Koppel et al. 1985; Petito et al. 1986). This is evident in our material. Opportunistic viral and fungal infections are also numerous in the presented collection, which is in agreement with other large series of cases published (Anders et al. 1986; Morgello et al. 1987; Nielsen, Davis 1988). The three cases of opportunistic infections in the course of AIDS presented here show rather typical clinical courses. They belong to the high risk group of drug abusers. Multiple opportunistic infections contributed to the successive deterioration and resulted in the death of patients. Immunological testing, performed in case 2, demonstrated the features typical for AIDS: lymphopenia, decreased helper to suppressor T-cell ratio, selective T-cell deficiency, decreased natural killer cells, elevated IgG and IgA immunoglobulins and decreased mitogen stimulation (Seligmann 1984).

The picture of neuropathological changes seen in these cases seems to be closely related to immunodeficiency. The case of toxoplasmosis (case 1) showed more pronounced necrosis than inflammatory infiltrations, an appearance similar to that of toxoplasmosis in newborns. There seems to be a parallel between tissue reactions in the brains of patients with the immune deficiency syndrome and newborns that are also immunologically "deficient" (not mature). The hardly noticeable inflammatory infiltrations in case 2 also may reflect a deficiency of lymphocytic response in the course of the infection. The coexistence of both CMV encephalitis and CNS cryptococcosis in this case demonstrates the possibility of multiple opportunistic infections. Progressive multifocal leukoencephalopathy in the CNS (case 3) presents a rather typical picture of this syndrome. The abundance of reactive glial cells within the pathological foci, their small size, and the great number of those foci (brain hemispheres, cerebellum, and brain stem) may reflect the acute course with rapid dissemination of virus.

The last case (case 4) presents lesions which are attributed directly to HIV infection. These cases have appeared in our collection with higher frequency during recent years. HIV infection is estimated to be the most common cause of clinically diagnosed CNS involvement in the course of AIDS (Epstein et al. 1988; Rosenblum et al. 1988). The discovery of this syndrome was aided by clinical observations of progressive dementia in AIDS patients (Ho 1985; Shaw 1985) and also by the knowledge of the type of AIDS virus. HIV belongs to the group of cytopathic retroviruses, lentiviruses similar to visna virus which is known for its neurotropism (Ho et al. 1987). Direct CNS infection with HIV has been largely documented by detection of viral particles within the brain, viral cultures of cerebrospinal fluid (CSF) and brain tissue, analysis of CSF antibody production and other techniques (Rostad et al. 1987). It was said that "HIV has as a target both the immune system and the nervous system" (Levy, Bredesen 1988). The virus-like particles have been detected in monocytes, macrophages, particularly often in multinucleated giant cells, and also in glial

and nerve cells (Stoler et al. 1986). Most likely the HIV invade the CNS through infection of monocytes (Ho et al. 1987).

The lesions attributed to direct HIV infection are not morphologically uniform. Nielsen and Davis (1988) use the name of subacute encephalitis, accepting also other names for this disease: AIDS encephalopathy, giant cell encephalitis and microglial nodule encephalitis. Ho et al. (1987) consider that this subacute encephalitis includes gliosis of the cerebral cortex, focal necrosis of the white matter, perivascular inflammation, formation of microglial nodules and multinucleated giant cells and demyelination of the white matter. Following the neuropathological studies of Kleihues et al. (1985), Budka et al. (1987) as a result of a comprehensive analysis of a very large collection of cases have distinguished two separate syndromes induced by HIV infection. The first was called multifocal giant cell encephalitis (MGCE) and it was characterized by perivascular infiltrations of rod cells, macrophages, monocytes and multinucleated giant cells deriving from macrophages. The second, progressive diffuse leukoencephalopathy (PDL) was characterized by diffuse myelin loss, astroglial proliferation and the presence of mono- and multinucleated macrophages. A similar picture of AIDS-leukoencephalopathy was also given by Rostad et al. (1987). The question arises whether the lack of distinction between the two syndromes cited above could be due to the insufficient sampling or inadequate sections in neuropathological examinations of HIV-infected brains. It seems possible in routinely examined material, but it is highly unlikely in all the evaluated cases. The suggestion that the syndrome of leukoencephalopathy evolves, with time, into subacute encephalitis, with increased severity of disease was formulated by Petito (1988). It seems that the possibility of some geographical variants in the morphology of CNS infection by HIV should be considered. There is also a possibility that geographic variations between hospital populations and the proportion of the various risk factors in different populations may be responsible for a difference in the picture of CNS involvement. These also, is a possibility that genetic variations in HIV itself may produce varying pictures of disease (Benn et al. 1985; Levy 1988).

Neither is the significance of microglial nodules in the syndrome of HIV encephalitis clear. Budka et al. (1987) considered "nodular encephalitis" to be a separate syndrome in the majority of cases due to CMV infection. Kato et al. (1987) concentrated on the significance of microglial nodules as HIV-attributed lesions in brain tissue and found microglial nodules in half of their material with no opportunistic infection detected. He considered them as a histological feature of AIDS encephalopathy or encephalitis and treated microglial nodules as a nonspecific response to the virus (HIV or other). In our case, microglial nodules were numerous, but multinucleated giant cells were not. In this case, perivascular infiltration of macrophages with a few lymphocytes was not common. There was no evident myelin pallor in the white matter. This overall

picture of CNS changes is very often seen in our material. The differential diagnosis between HIV encephalopathy or encephalitis is not easy, particularly if microglial nodules are underestimated in this syndrome. This case may illustrate the scenario of very acute disease in a patient dying before a full pathological picture of lesions could develop. Aseptic meningitis, which was described in the course of HIV infection, was not observed in our material.

The problem of HIV encephalopathy or encephalitis is particularly important in pediatric cases. It was observed (Belman et al. 1988), and it is demonstrated in our collection that opportunistic infections are relatively rare in children, possibly because of limited exposure or less dramatic immunodeficiency. On the other hand, direct HIV infection of the CNS is highly probable in the majority of infants with AIDS or AIDS-related complex (ARC), (Epstein et al. 1988). The cause of microcephaly (primary or secondary atrophy? regressive lesions? arrested development?) in the course of HIV infection remains unclear. The vascular changes with calcium deposits in pediatric cases and their relations to HIV also require further investigation.

We have not focused our attention on neoplastic processes in the CNS in the course of AIDS, those being well known and rare in our material. We are aware that on the basis of our material, we are not able to discuss all the problems of CNS involvement in the course of AIDS. Nevertheless, it presents a wide spectrum of changes as observed during a relatively long span of time in one of the largest neuropathologic collections of AIDS cases. It may indicate which types of change require our present most extensive investigation.

NOWE DANE O USZKODZENIU OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO W PRZEBIEGU AIDS

Streszczenie

Przedstawiono przegląd zmian w układzie nerwowym w przebiegu nabytej niewydolności immunologicznej (AIDS). Przeanalizowano 168 przypadków zebranych w latach 1982–1987 w Pracowni Neuropatologii Stanowego Uniwersytetu w Nowym Jorku. Wśród badanych przypadków przeważali mężczyźni. Zaznaczyło się znaczne zwiększenie w ostatnich latach przypadków dziecięcych. Zakażenia oportunistyczne, zwłaszcza toksoplazmoza, kryptokokoza, zakażenie wirusem cytomegalii oraz postępująca wielogniskowa leukoencefalopatia były obserwowane w wielu przypadkach. Przedstawiono charakterystyczny obraz tych zakażeń w AIDS na podstawie wybranych przypadków. W przebadanym materiale zaobserwowano w kolejnych latach 1982–1987 stopniowy wzrost liczby przypadków, w których zmiany są przypisywane bezpośredniemu zakażeniu przez wirus HIV. Dochodzi wówczas do powstawania zespołów neuropatologicznych określanych jako zapalenie mózgu lub leukoencefalopatia. Opisany w pracy przypadek ilustruje zmiany umiarkowane, ale uwierzytelnione obecnością wielojądrzastych komórek olbrzymich, występujące często w omawianej kolekcji. Są one trudne do zakwalifikowania do jednej z proponowanych grup i stanowią podstawę do dyskusji tego problemu na podstawie przeglądu piśmiennictwa. Wskazano na konieczność dalszych badań zespołów neuropatologicznych w przebiegu AIDS, zwłaszcza występujących w przypadkach dziecięcych.

REFERENCES

1. Anders K. H., Guerra H. F., Tomiyasu U., Verity M. A., Vinters H. V.: The neuropathology of AIDS. UCLA experience and review. *Am J Pathol*, 1986, 124, 537–558.
2. Belman A. L., Diamond G., Dickson D., Horoupian D., Llena I., Lantos G., Rubinstein A.: Pediatric acquired immunodeficiency syndrome, neurologic syndromes. *Am J Dis Child*, 1988, 142, 29–35.
3. Benn S., Rutledge R., Folks T., Gold I., Baker L., McCormick I., Feorino P., Piot P., Quinn T., Martin M.: Genomic heterogeneity of AIDS retroviral isolates from North America and Zaire. *Science*, 1985, 230, 949–951.
4. Budka H., Constanzi G., Cristina S., Lechi A., Parravicini C., Trabattoni R., Vago L.: Brain pathology induced by infection with the human immunodeficiency virus (HIV). *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 75, 185–198.
5. Centers for Disease Control: Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi sarcoma and opportunistic infections. *N Engl J Med*, 1982, 306, 248–252.
6. Centers for Disease Control: Antibodies to a retrovirus etiologically associated with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in populations with increased incidences of the syndrome. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 33, 1984, 27, 608–609.
7. Centers for Disease Control: Update: Acquired immunodeficiency syndrome – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 33, 1984, 47, 3355–3356.
8. Centers for Disease Control: Quarterly report to the domestic policy council on the prevalence and rate of spread of HIV and AIDS in the United States: Leads from the *Morbidity and Mortality Weekly Report* 37, 1988, 4, 2657–2661.
9. Centers for Disease Control: Update: Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) – Worldwide. Leads from the *Morbidity and Mortality Weekly Report* 37, 1988, 18, 3104–3107.
10. Edmondson K. S.: Acquired immune deficiency syndrome in the neonate. *Neonatal Network*, 1988, 6, 7–11.
11. Elder G. A., Sever J. L.: AIDS and neurological disorders: An overview. *Ann Neurol (Suppl.)*, 1988, 23, S4–S6.
12. Epstein L. G., Sharer L. R.: Neurology of human immunodeficiency virus infection in children. In: *AIDS and the nervous system*, Eds.: M. L. Rosenblum, R. M. Levy, D. E. Bredesen, Raven Press, New York, 1988.
13. Epstein I. G., Sharer L. R., Goudsmit J.: Neurological and neuropathological features of human immunodeficiency virus infection in children. *Ann Neurol (Suppl.)*, 1988, 23, S19–S23.
14. Ho D. D.: Isolation of HTLV-III from cerebrospinal fluid and neural tissues of patients with neurologic syndromes related to the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med*, 1985, 313, 1493–1497.
15. Ho D. D., Pomerantz R. J., Kaplan J. C.: Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*, 1987, 317, 278–286.
16. Kato T., Hirano A., Llena J. F., Dembitzer H. M.: Neuropathology of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in 53 autopsy cases with particular emphasis on microglial nodules and multinucleated giant cells. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 73, 287–294.
17. Kleihues P., Lang W., Burger P. C., Budka H., Vogt M., Maurer R., Luthy R., Siegenthaler W.: Progressive diffuse leukoencephalopathy in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, 68, 333–339.
18. Koppel B. S.: Central nervous system involvement in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Acta Neurol Scand*, 1985, 71, 337–353.
19. Levy J. A.: The biology of the human immunodeficiency virus and its role in neurological disease. In: *AIDS on the nervous system*. Eds.: M. L. Rosenblum, R. M. Levy, D. E. Bredesen. Raven Press, New York, 1988, pp. 327–354.
20. Levy R. M., Bredesen D. E.: Central nervous system dysfunction in acquired immunodeficiency

- ciency syndrome. In: AIDS and the nervous system. Eds.: M. L. Rosenblum, R. M. Levy, D. E. Bredesen. Raven Press, New York, 1988, pp. 29–56.
21. Luft B. J., Brooks J. G., Conley F. K., McCabe R. E., Remington J. S.: Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immune deficiency syndrome. *J Am Med Assoc*, 1984, 252, 913–917.
 22. Morgello S., Cho E.-S., Nielsen S., Devinsky O., Petito K.: Cytomegalovirus encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome: An autopsy study of 30 cases and a review of the literature. *Hum Pathol*, 1987, 18, 289–297.
 23. Nielsen S. L., Davis R. L.: Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome. In: AIDS and the nervous system. Eds.: M. L. Rosenblum, R. M. Levy, D. E. Bredesen. Raven Press, New York, 1988, pp. 155–158.
 24. Pape J. W., Liautaud B., Thomas F., Mathwrin J. R. Sr., Amand M. M. A., Bony M., Peon V., Pamphile M., Slovache A. E., Johnson W. D. Jr.: Characteristic of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Haiti. *N Engl J Med*, 1983, 309, 945–950.
 25. Petito C. K.: Review of central nervous system pathology in human immunodeficiency virus infection. *Ann Neurol (Suppl)*, 1988, 23, S54–S57.
 26. Petito C. K., Cho E.-S., Lemann W., Navia B. A., Price R. W.: Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): An autopsy review. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1986, 6, 635–646.
 27. Piot P., Plummer F. A., Mhalu F. S., Lamboray J.-L., Chin J., Mann J. M.: AIDS: An international perspective. *Science*, 1988, 239, 573.
 28. Price R. W., Brew B., Sidtis J., Rosenblum M., Scheck A. C., Cleary P.: The brain in AIDS: central nervous system HIV-I infection and AIDS dementia complex. *Science*, 1988, 239, 586–592.
 29. Rosenblum M. L., Levy R. M., Bredesen D. E.: Overview of AIDS and the nervous system. In: AIDS and the nervous system. Eds.: M. L. Rosenblum, R. M. Levy, D. E. Bredesen, Raven Press, New York, 1988, pp. 1–12.
 30. Rostad S. W., Sumi M., Shaw G.-M., Olson K., McDougall J. K.: Human immunodeficiency virus (HIV) infection in brains with AIDS-related leukoencephalopathy. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1987, 3, 363–372.
 31. Seligmann M.: AIDS: An immunologic reevaluation. *N Engl J Med*, 1984, 311, 1286–1287.
 32. Shannon K. M.: Acquired immune deficiency syndrome in childhood. *J Pediatr*, 1985, 106, 332–342.
 33. Shaw G. M.: HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science*, 1985, 227, 117–181.
 34. Stoler M. H., Eskin T. A., Benn S., Angerer R. C., Angerer L. M.: Human T-cell lymphotropic virus type III infection of the central nervous system. A preliminary *in situ* analysis. *J Am. Med Assoc*, 1986, 256, 2360.
 35. Valdiserri R. O.: Retrovirus and AIDS. *Lab Med*, 1985, 16, 101–104.

Address for correspondence: Maria Dąmbaska, Laboratory of Developmental Neuropathology Medical Research Center, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw, Poland.

HALINA WEINRAUDER

IMMUNOCYTOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA ORGANOTYPOWEJ HODOWLI MÓZDŻKU PRZY UŻYCIU METODY KOMPLEKSU AWIDYNA-BIOTYNA (ABC)

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Jednoznaczna identyfikacja różnych typów komórek w hodowlach tkankowych układu nerwowego, ze względu na znaczny polimorfizm cechujący komórki rosnące *in vitro*, a także ze względu na występowanie różnic regionalnych i istnienie subpopulacji w ramach jednego typu komórek, wymaga stosowania całego szeregu dostępnych obecnie antygenowych markerów komórkowych. Ekspresja antygenów zależy od wielu czynników, m. in. od wieku zwierzęcia, od którego jest pobierana tkanka, od rodzaju hodowli (organotypowa, dysocjowana, agregowana), a także od składu środowiska odżywczego w jakim rosną hodowane komórki. Ta zmienność ekspresji antygenowej, a także wspomniany już polimorfizm w pełni uzasadnia prowadzenie tego rodzaju badań, gdyż dokładna charakterystyka antygenowa komórek *in vitro* stanowi podstawę szeregu badań istotnych dla neurobiologii.

Zastosowana w niniejszej pracy metoda ABC ma szereg walorów. Jest bardziej czuła niż stosowane dotychczas tzw. metody pośrednie, co pozwala na używanie wysokich rozcieńczeń surowic odpornościowych i zmniejsza intensywność tła. Zastosowanie metody ABC z użyciem kompleksu czerwieni teksaskiej ze streptawidyną powoduje, że uzyskane zabarwienie preparatów jest trwałe, praktycznie nie występuje zabarwienie tła, a wskutek niewystępowania zjawiska wygaszania świecenia, możliwe jest kilkakrotne fotografowanie tego samego pola. Ponadto kompleks przeciwciał pierwszej i drugiej warstwy z awidyną jest mniejszy od kompleksu stosowanego na przykład w metodzie PAP, co pozwala na lepszą penetrację w głąb tkanki.

Celem przeprowadzonych w obecnej pracy badań było określenie występowania i lokalizacji komórkowej kilku swoistych markerów w organotypowej hodowli mózdzku noworodka szczura, rosnącej *in vitro* w ciągu 5 tygodni.

MATERIAŁ I METODY

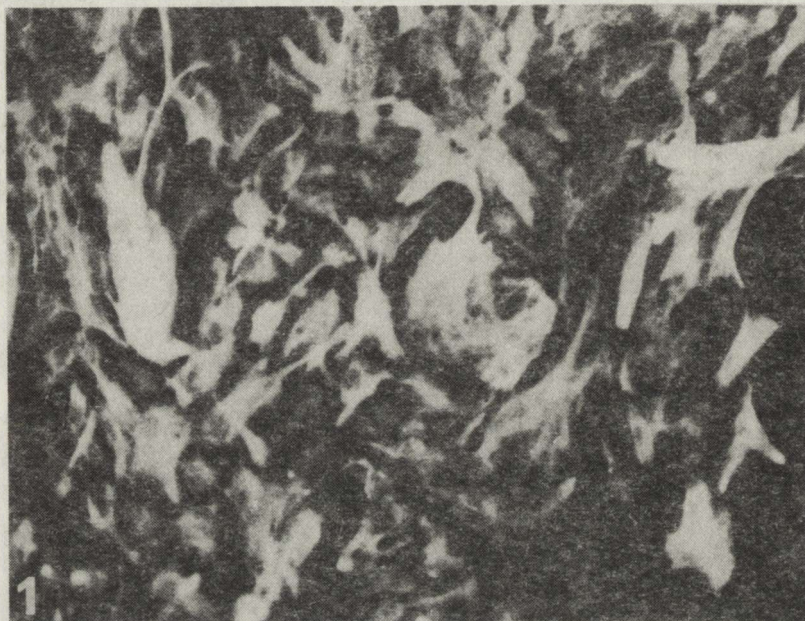
Badania przeprowadzono na organotypowych hodowlach mózdku noworodków szczurzych. Hodowle zakładano i prowadzono w sposób rutynowy, opisany uprzednio (Kraśnicka, Mossakowski 1965). Do środowiska odżywczego dodawano 30% surowicy ludzkiej i zmieniano je co 3 dni. Wyselekcjonowane hodowle po 1, 2, 3, 4 i 5 tygodniach wzrostu przemywano dokładnie PBS (2×15 min), utrwalano w zimnym (-20°C) acetonie przez 4 min i suszono na powietrzu w temperaturze pokojowej. Preparaty przechowywano w -20°C .

Metoda kompleksu awidyna-biotyna (ABC). Odczyn ABC wykonywano według metody opisanej przez Hsu i wsp. (1981), w modyfikacji Maunoury'ego (informacja ustna), przy zastąpieniu kompleksu z peroksydazą kompleksem streptawidyna-czerwień teksaska (Texas Red). Utrwalone hodowle inkubowano z normalną surowicą kozią rozcieńczoną 1:20 w buforze fosforanowym o pH 7,2 przez 30 min lub z normalną surowicą końską, rozcieńczoną 1:20, w przypadku stosowania przeciwciał monoklonalnych, a następnie przez 60 min z odpowiednią surowicą odpornościową, rozcieńczoną wstępnie 1:2 w glicerolu i przechowywaną w -20°C . Surowice odpornościowe były rozcieńczone bezpośrednio przed użyciem w normalnej surowicy koziej lub końskiej. Po inkubacji z surowicą odpornościową preparaty płukano przez 10 min w buforze fosforanowym i inkubowano przez 30 min kompleksem biotynowanych kozich immunoglobulin przeciwko IgG króliczym rozcieńczonym 1:200 lub z biotynowanymi przeciwciałami końskimi przeciwko IgG mysim, także w rozcieńczeniu 1:200. Po płukaniu przez 10 min w buforze, hodowle inkubowano z kompleksem streptawidyna-czerwień teksaska rozcieńczonym 1:200 przez 30 min w ciemności, płukano 10 min w buforze i dobarwiano jądra komórkowe barwnikiem Hoechst 33258, w roboczym rozcieńczeniu 1:1000 (roztwór wyjściowy $50 \mu\text{g/ml}$) przez 20 min. Po płukaniu w buforze fosforanowym preparaty montowano w zbuforowanej glicerynie, oglądano w mikroskopie fluorescencyjnym firmy Leitz z odpowiednim zestawem filtrów i fotografowano na filmie Kodak.

Surowice i odczynniki. 1. Surowica odpornościowa królicza przeciwko GFAP (Dakopatts, Dania). 2. Surowica odpornościowa królicza przeciwko GFAP z mózgu jagnięcia otrzymana w laboratorium dra Delpecha (Rouen, Francja). 3. Surowica przeciwko białku S-100 (BRL, Francja). 4. Surowica przeciwko wimentynie otrzymana w laboratorium dr Maunoury (Paryż, Francja). 5. Przeciwciała monoklonalne mysie przeciwko neurofilamentom (Vector Laboratories, USA). 6. Biotynowane przeciwciała kozie przeciwko IgG króliczym i biotynowane przeciwciała końskie przeciwko IgG mysim (Vectastain, USA). 7. Kompleks streptawidyna-czerwień teksaska (Vectastain, USA). 8. Barwnik Hoechsta (bis-benzimide H 33258, Serva, NRF). Wszystkie stosowane odczynniki i surowice, z wyjątkiem surowicy przeciwko GFAP firmy Dakopatts, otrzymano od dr Maunoury z Laboratorium Anatomii Patologicznej Szpitala Świętej Anny w Paryżu.

WYNIKI

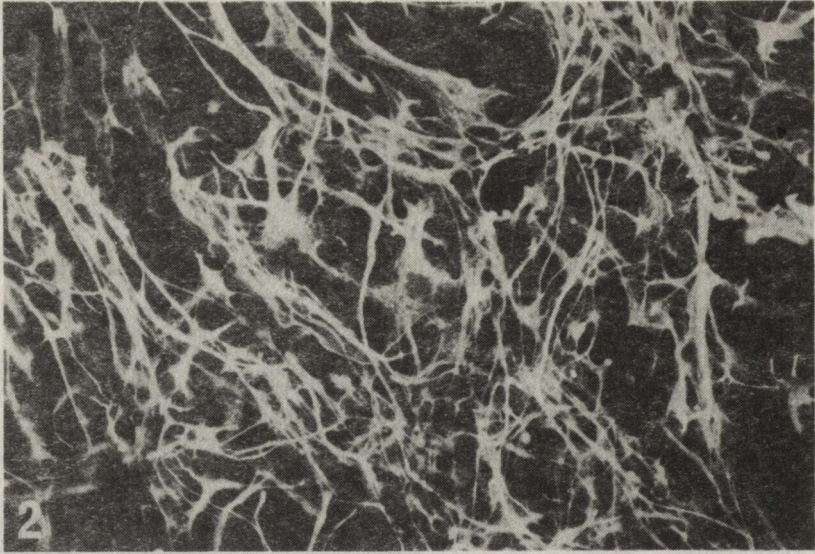
W większości komórek hodowli mózdzku we wszystkich badanych okresach wzrostu (1–5 tygodni) stwierdzano dodatnią reakcję z obiema stosowanymi surowicami przeciwko GFAP, a odczyn wykazywał dużą intensywność (ryc. 1). Zwraçała uwagę znaczna różnorodność kształtów astrocytów, w zależności od „strefy” hodowli, odległości od eksplantatu, a także od tego czy komórki rosły w dużych skupieniach, czy były oddalone od siebie i występowały



Ryc. 1. Hodowla 3-tyg. Odczyn ABC z surowicą przeciwko GFAP z mózgu jagnięcia, 1:1000. Widoczna grupa komórek o różnej intensywności świecenia. W centrum widoczny duży astrocyt z charakterystyczną włóknistą strukturą cytoplazmy. Pow. 500 ×

Fig. 1. Three-week culture. Antiserum against GFAP from lamb brain diluted 1:1000. Group of cells with fluorescence of different intensity. Great astrocyte with characteristic fibrillary pattern of cytoplasm is visible in the center. × 500

pojedynczo. Astrocyty w dużych skupieniach miały liczne, cienkie, bardzo intensywnie barwiące się wypustki i małe perykariony (ryc. 2), komórki leżące pojedynczo w strefie wzrostu miały wypustki krótkie i szerokie, a w odczynie na GFAP wyraźny był charakterystyczny, włóknisty obraz cytoplazmy (ryc. 3), co było szczególnie wyraźnie widoczne w hodowlach starszych (ryc. 4). Obserwowano ponadto pewne różnice intensywności świecenia w zależności od użytej surowicy: surowica przeciwko GFAP z mózgu jagnięcia, otrzymana w laboratorium dr Delpécha, szczególnie intensywnie reagowała z antygenem w wypustkach astrocytów (ryc. 2), podczas gdy w reakcjach z surowicą z firmy



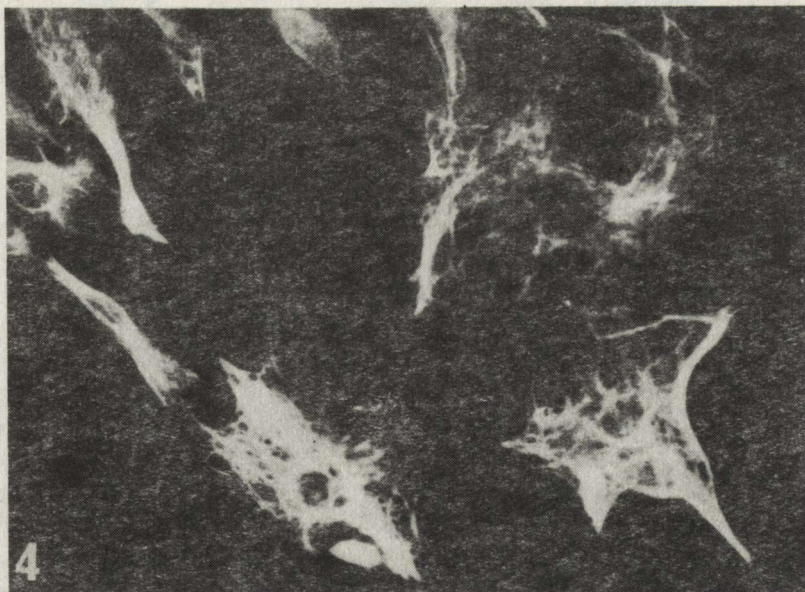
Ryc. 2. Hodowla 3-tyg. Surowica przeciwko GFAP z mózgu jagnięcia, 1:1000. Fragment hodowli z silnie wyrażoną fluorescencją wypustek astrocytarnych. Pow. 250 ×

Fig. 2. Three-week culture. Anti GFAP antiserum as in Fig. 1. Culture fragment with strongly fluorescent astrocytic processes. × 250



Ryc. 3. Hodowla 3-tyg. Surowica przeciwko GFAP (Dako), 1:1000. „Reaktywne” astrocyty leżące w strefie wzrostu. Pow. 1200 ×

Fig. 3. Three-week culture. Anti GFAP antiserum (Dako) diluted 1:1000. “Reactive” astrocytes in the growth zone. × 1200



Ryc. 4. Hodowla 4-tyg. Surowica przeciwko GFAP (Dako), 1:500. Epitelioidalne, „płaskie” astrocyty w strefie wzrostu, z wyraźnie zaznaczoną włóknistą strukturą cytoplazmy. Pow. 1200 ×
Fig. 4. Four-week culture. Anti GFAP antiserum (Dako) diluted 1:500. Epithelioid “flat” astrocytes in the growth zone with clearly visible fibrillary structure of cytoplasm. × 1200



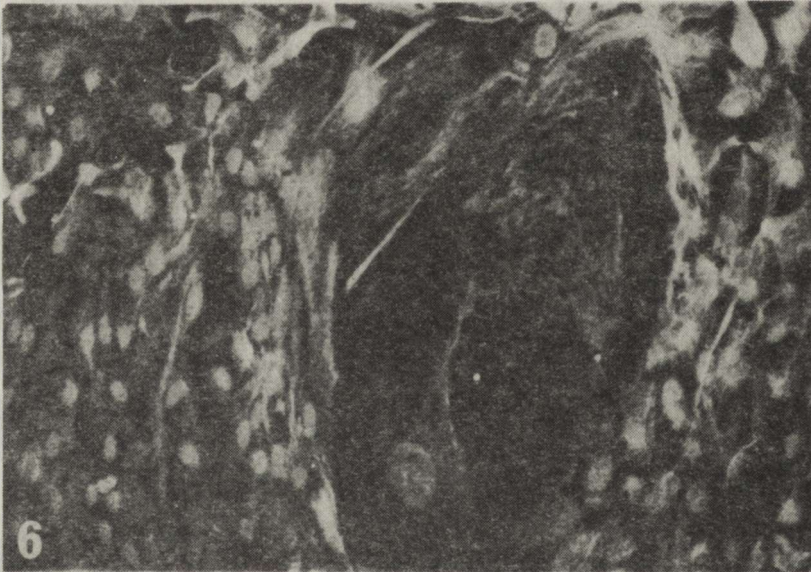
Ryc. 5. Hodowla 3-tyg. Surowica przeciwko wimentynie, 1:2000. Grupa komórek z bardzo silną fluorescencją pęczków filamentów pośrednich; zwraca uwagę inny charakter odczynu niż w przypadku GFAP. Pow. 900 ×

Fig. 5. Three-week culture. Anti vimentin antiserum diluted 1:2000. Group of cells with very strong fluorescence of bundles of intermediate filaments; note different pattern of fluorescence in comparison with GFAP. × 900

Dako, nawet w miejscach bardzo gęstego wzrostu komórek nie obserwowano tak intensywnego świecenia cienkich wypustek.

Znaczna liczba komórek w hodowlach, w różnych okresach wzrostu *in vitro*, w odczynie z surowicą przeciwko wimentynie wykazywała występowanie filamentów pośrednich zawierających ten marker, w postaci włóknistych struktur w cytoplazmie (ryc. 5). Wimentyna, jak wiadomo, nie jest swoistym markerem komórek układu nerwowego i bez użycia metody podwójnego barwienia nie można rozstrzygnąć, jakiego typu są dodatnie komórki (astrocyty? fibroblasty?), niemniej zważywszy na znaczną ich liczbę we wszystkich hodowlach można przyjąć, że wimentyna występuje w hodowanych astrocytach, które stanowią przeważającą populację w hodowlach tego typu. Różnorodność dodatnich komórek jest wyraźnie widoczna na rycinie 6, gdzie za pomocą podwójnej ekspozycji tego samego pola uwidoczniono także jądra komórkowe zabarwione barwnikiem Hoechst.

Reakcja z surowicą przeciwko białku S-100 była znacznie słabiej wyrażona. W hodowlach 1- i 2-tygodniowych obserwowano pojedyncze pozytywne komórki ze słabym odczynem w cytoplazmie. W hodowlach 3-tygodniowych i starszych, odczyn o umiarkowanym natężeniu i homogennym lub ziarnistym charakterze występował w perykarionach części komórek glejowych i w niektórych wypustkach (ryc. 7).



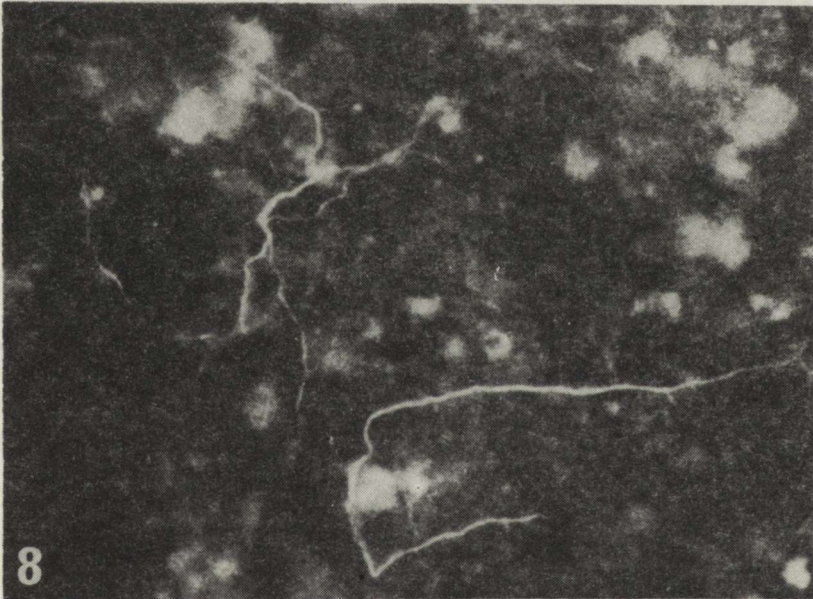
Ryc. 6. Hodowla 3-tyg. Surowica przeciwko wimentynie, 1:2000. Podwójna ekspozycja tego samego pola przy zmianie filtrów pozwala na uwidocznienie włóknistej struktury odczynu na wimentynie i dodatnich jąder komórkowych po zabarwieniu barwnikiem Hoechst. Zwraca uwagę zróżnicowane nasilenie fluorescencji w różnych komórkach. Pow. 400 ×

Fig. 6. Three-week culture. Anti vimentin antiserum diluted 1:2000. Double exposition of the same field reveals fibrillary structure of vimentin fluorescence and cellular nuclei positive after Hoechst staining. Note different intensity of fluorescence. × 400



Ryc. 7. Hodowla 3-tyg. Surowica przeciwno białku S-100, 1:2000. W niektórych komórkach glejowych homogenna lub ziarnista fluorescencja o różnym nasileniu. Pow. 500 ×

Fig. 7. Three-week culture. Anti S-100 protein antiserum diluted 1:2000. Homogeneous or granular fluorescence of different intensity visible in some cells. × 500

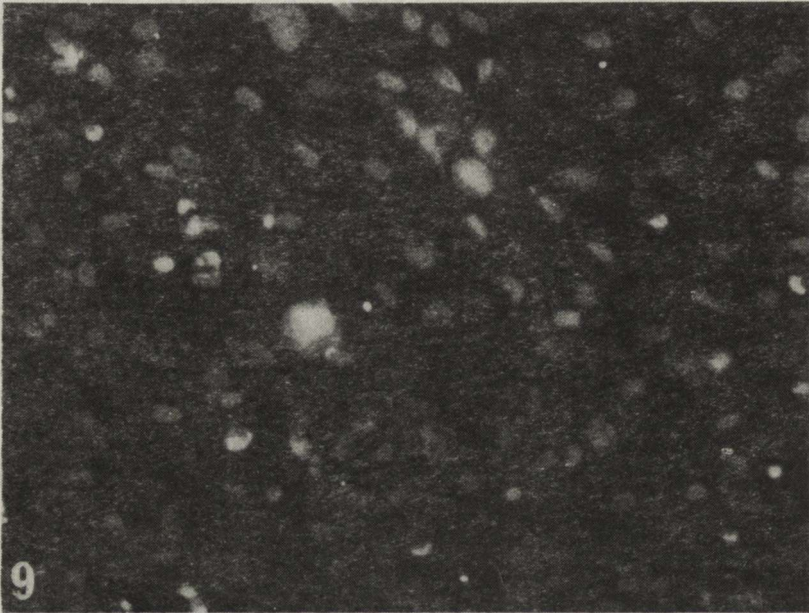


Ryc. 8. Hodowla 2-tyg. Monoklonalne przeciwciała przeciwno neurofilamentom. Wyraźnie widoczna pozytywna reakcja w wypustkach neuronów leżących w eksplantacie. W celu lepszego uwidocznienia fluorescencji neurocytów negatyw nadmiernie naświetlono. Pow. 700 ×

Fig. 8. Two-week culture. Monoclonal antibodies against neurofilaments. Fluorescence in the neuronal processes lying in the explant. Photogram was overexposed for better visualization of fluorescence in neurocytes. × 700

Nie obserwowano świecenia w strefie wzrostu hodowli przy zastosowaniu przeciwciał monoklonalnych przeciwko neurofilamentom. Reakcję pozytywną obserwowano w wypustkach neuronów leżących w eksplantatach młodszych, 1- i 2-tygodniowych hodowli (ryc. 8). Po tym okresie świecenia wypustek nie obserwowano; perykariony neuronów były negatywne przez cały czas wzrostu hodowli.

Wszystkie odczyny kontrolne były ujemne. Jedną z kontroli, gdzie odczyn wykonywano z pominięciem surowicy odpornościowej, przedstawia rycina 9. Przy podwójnej ekspozycji tego samego pola nie obserwuje się fluorescencji w żadnych elementach komórkowych, z wyjątkiem jąder zabarwionych barwnikiem Hoechstą.



Ryc. 9. Hodowla 3-tyg. Kontrola. Inkubacja bez surowicy odpornościowej. Podwójna ekspozycja tego samego pola, widoczne jedynie jądra komórkowe. Pow. 500 ×

Fig. 9. Three-week culture, control. Incubation without immune serum. Double exposition of the same field for visualization of cellular nuclei. × 500

OMÓWIENIE

W większości komórek w organotypowej hodowli mózdzku noworodka szczura stwierdzono dodatnią reakcję immunohistochemiczną z przeciwciałami przeciwko GFAP. Fluorescencja zlokalizowana była w cytoplazmie perykarionów i wypustek astrocytów, wykazując zazwyczaj typową włóknistą strukturę. W miarę dojrzewania hodowli następował wzrost intensywności fluorescencji połączony z pojawianiem się bardziej zróżnicowanych morfologicznie komórek. Obserwowano ponadto różnice w intensywności reakcji pomiędzy po-

szczególnymi komórkami i „strefami” hodowli: wiele astrocytów leżących w strefie wzrostu wykazywało morfologiczne cechy astrocytów reaktywnych. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów, wykazujące, że astrocyty *in vitro*, tak, jak i *in situ* zawierają w cytoplazmie liczne filamenty pośrednie barwiące się dodatnio w reakcji z surowicami anti-GFAP. Wykazano to w hodowlach zakładanych z eksplantatów (Antanitus i wsp. 1975), a także w jednowarstwowych dysocjowanych (Manthorpe i wsp. 1979; Fedoroff i wsp. 1983, 1984). Goldman i Chiu (1984a,b) stwierdzili, że astrocyty o kształtach gwiaździstych zawierają więcej GFAP niż astrocyty „płaskie”, epitelioidalne, co zostało potwierdzone także w niniejszej pracy.

We wszystkich hodowlach obserwowano intensywną fluorescencję w reakcji z surowicą przeciwko wimentynie. Antygen ten, nie będąc swoistym markerem układu nerwowego, występuje w komórkach zawierających filamenty pośrednie. W astrocytach jego obecność stwierdzano zarówno w tkance (Mareš i wsp. 1988), jak i w hodowli (Chiu i wsp. 1981; Schnitzer i wsp. 1981; Yen, Fields 1981). Dane dotyczące poziomu tego markera w astrocytach są często sprzeczne: Ciesielski-Treska i wsp. (1984) stwierdzili, że poziom wimentyny pozostaje bez zmian, natomiast Goldman i Chiu (1984b) uważają, że poziom tego markera wzrasta jednocześnie z zawartością w komórce GFAP. Szczególnie silny odczyn fluorescencyjny, świadczący o znacznej zawartości tego markera związanego z cytoskeletonem w niektórych komórkach hodowanych *in vitro*, jest najprawdopodobniej związany z adaptacją komórek do warunków hodowli. Paetau (1988) za pomocą podwójnej metody immunofluorescencji pośredniej stwierdził, że w pierwotnych hodowlach glejowych od 20 do 70% komórek zawiera zarówno GFAP, jak i wimentynę i uważa, że współwystępowanie obu antygenów jest powszechne w hodowanych astrocytach.

We wszystkich badanych okresach wzrostu hodowli obserwowano słabą fluorescencję w reakcji z surowicą przeciwko białku S-100, a większość komórek nie wykazywała świecenia. Obecność białka S-100 wykazano w obu typach komórek glejowych, jakkolwiek niektórzy autorzy reprezentują pogląd, że jest to antygen astrocytarny i występuje w astrocytach GFAP-dodatnich (Kim, 1985). Obrazy uzyskane w reakcjach z surowicą anti-GFAP świadczą o przewodzie astrocytów w organotypowych hodowlach mózdku, w których jednak stwierdzony poziom białka S-100 nie jest wysoki. Wiadomo, że zawartość tego antygeny w komórkach glejowych w układzie nerwowym różnych zwierząt i człowieka wykazuje znaczne wahania. Jego poziom ulega także zmianom (znacznie większym niż GFAP) w zależności od stadium rozwojowego komórki i od warunków hodowli *in vitro*. Stosunkowo wysoka zawartość surowicy w stosowanym przez nas medium odżywczym może hamować ekspresję tego antygeny (Gysin i wsp. 1980).

W badanych hodowlach nie stwierdzono dodatniego odczynu immunocytochemicznego z przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko neurofilamentom w strefie wzrostu hodowli. W eksplantatach dodatni odczyn był widoczny

w postaci dość silnej fluorescencji wypustek neuronów w młodszych, 1- i 2-tygodniowych hodowlach; nie obserwowano świecenia perykarionów. W tego typu hodowlach neurony w strefie wzrostu są obserwowane bardzo rzadko, jest możliwe, że w takich warunkach hodowli neurony nie przeżywają dłużej niż dwa tygodnie. Z drugiej strony wiadomo (Pelc i wsp. 1986), że obraz barwienia się ciał komórkowych i wypustek różnych neuronów mózdzku jest bardzo zmienny i najprawdopodobniej, podobnie jak to jest w przypadku neuronoswoistej enolazy, także i przeciwciała przeciwko neurofilamentom reagują tylko z określoną subpopulacją wypustek neuronalnych. Szczególnie dotyczy to przeciwciał monoklonalnych, które wiążą się na perykarionach i wypustkach w sposób wybiórczy, zależny od gatunku zwierzęcia, okolicy mózgu i charakterystyki przeciwciał.

W podsumowaniu należy podkreślić, że zastosowanie kilku surowic przeciwko różnym markerom komórkowym, w czułym teście, jakim jest metoda kompleksu awidyna-biotyna, umożliwi znacznie bardziej swoistą i znacznie bardziej prawidłową charakterystykę komórek z różnych okolic mózgu w hodowlach *in vitro*.

IMMUNOCYTOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF ORGANOTYPIC CEREBELLUM CULTURE BY MEANS OF AVIDIN-BIOTIN-COMPLEX METHOD

Summary

The occurrence and cellular localization of some CNS antigenic markers were studied in organotypic cultures of newborn rat cerebellum grown for up to 5 weeks. The avidin-biotin-complex method was employed using polyclonal immune sera against glial fibrillary acidic protein (GFAP), S-100 protein and vimentin, and monoclonal antibodies against neurofilaments.

In all cultures GFAP was selectively localized in astrocytes, both in perikarya and in cellular processes. The difference in immunoreactivity between particular cells and culture "zones", and considerable morphological polymorphism of the astrocytes were noted. In majority of cells the immunostaining for vimentin was very intensive, whereas reaction with antiserum against S-100 protein was weak or negative. Neurofilament antigen was localized only in neuronal processes lying in explants of the younger — one- to two-week cultures.

PIŚMIENNICTWO

1. Antanitus D.S., Choi B.H., Lapham L. W.: Immunofluorescence staining of astrocytes *in vitro* using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res*, 1975, 89, 363–367.
2. Chiu D.C., Norton W.T., Fields K.L.: The cytoskeleton of primary astrocytes in culture contains actin, glial fibrillary acidic protein and the fibroblast-type filament protein, vimentin. *J Neurochem*, 1981, 37, 147–155.
3. Ciesielski-Treska J., Ulrich G., Mensch C., Aunis D.: Electrophoretic pattern and distribution of cytoskeletal proteins in flat epithelioid and stellate process-bearing astrocytes in primary culture. *Neurochem Int*, 1984, 6, 533–543.
4. Fedoroff S., Withe R., Subrahmayan L., Kalnins V.I.: Astrocyte cell lineage. II. Mouse fibrous

- astrocytes and reactive astrocytes in cultures have vimentin and GFAP-containing intermediate filaments. *Dev Brain Res*, 1983, 7, 303–315.
5. Fedoroff S., Neal J., Opas M., Kalnins V.I.: Astrocyte cell lineage. III. The morphology of differentiating mouse astrocytes in colony culture. *J Neurocytol*, 1984, 13, 1–20.
 6. Goldman J.E., Chiu F.C.: Growth kinetics, cell shape, and the cytoskeleton of primary astrocyte culture. *J Neurochem*, 1984a, 42, 175–184.
 7. Goldman J.E., Chiu F.C.: Dibutyl-cyclic AMP causes intermediate filament accumulation and actin reorganization in astrocytes. *Brain Res*, 1984b, 306, 85–95.
 8. Gysin R., Moore B.W., Proffitt R.T., Deuel T.F., Caldwell K., Glaser L.: Regulation of the synthesis of S-100 protein in rat glial cells. *J Biol Chem*, 1980, 255, 1515–1520.
 9. Hsu S. M., Raine L., Fanger H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 1981, 29, 577–580.
 10. Kim S.U.: Antigen expression by glial cells grown in culture. *J Neuroimmunol*, 1985, 8, 255–282.
 11. Kraśnicka Z., Mossakowski M.J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropatol Pol*, 1965, 3, 397–408.
 12. Manthorpe M., Adler R., Varon S.: Development, reactivity and GFA immunofluorescence of astroglia-containing monolayer cultures from rat cerebrum. *J Neurocytol*, 1979, 8, 605–621.
 13. Mareš V., Viklický V., Gerštein L.M., Dráber P., Ciesielski-Treska J.: Immunocytochemistry and heterogeneity of rat brain vimentin. *Histochemistry*, 1988, 88, 575–581.
 14. Osborn M., Ludwig-Festl M., Weber K., Bignami A., Dahl D., Bayreuther K.: Expression of glial and vimentin type intermediate filaments in cultures derived from human glial material. *Differentiation* 1981, 19, 161–167.
 15. Paetau A., Virtanen I., Stenman S., Kurki P., Linder E., Vaheri A., Westermark B., Dahl D., Haltia M.: Glial fibrillary acidic protein and intermediate filaments in human glioma cells. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1979, 47, 71–74.
 16. Paetau A.: Glial fibrillary acidic protein, vimentin and fibronectin in primary cultures of human glioma and fetal brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1988, 75, 448–455.
 17. Pelc S., Fondu P., Gompel C.: Immunohistochemical distribution of glial fibrillary acidic protein, neurofilament polypeptides and neuronal specific enolase in the human cerebellum. *J Neurol Sci*, 1986, 73, 289–297.
 18. Schnitzer J., Franke W.W., Schachner M.: Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol*, 1981, 90, 435–447.
 19. Yen S.H., Fields K.L.: Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *J Cell Biol*, 1981, 88, 115–126.

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

KRYSTYNA RENKAWEK, JERZY W. ŁAZAREWICZ

PROTECTIVE EFFECT OF THE CALCIUM ENTRY BLOCKER, NIMODIPINE ON CEREBELLAR ORGANOTYPIC CULTURES SUBMITTED TO ANOXIA

Departments of Neuropathology and Neurochemistry, Medical Research Centre, Polish Academy
of Sciences, Warszawa

The tissue culture model of anoxia which eliminates systemic or vascular factors in brain damage is very useful in pathomorphological studies of cell injury (Renkawek et al. 1986). The possible implication of massive cellular calcium overloading in the pathogenesis of brain cell lesion during ischemic anoxia has been described (Łazarewicz et al. 1978; Siesjö, Wieloch 1985), although there exist opinions that this effect could be an unspecific epiphenomenon (Hossmann et al. 1985). The present study shows that cerebellar cultures exposed to anoxia in nimodipine-containing medium are protected by the calcium blocker, indicating an involvement of calcium in anoxia-evoked brain cell damage.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures were prepared from newborn Wistar rat cerebella. The cultures were grown in Carrel flasks in standard medium consisting of: 70% Earle's solution (with 0.20 g/l of CaCl_2 , 30% human serum and 600 mg% glucose. On the seventh day the cultures were exposed to 30-min anoxia in specially adapted Carrel flasks for permanent nitrogen flow, in standard medium or in medium with nimodipine (Bayer, A.G.). Nimodipine (10^{-3} M stock solution in 96% ethanol) prepared and processed in darkness was diluted in a nutrient medium to a final concentration of 10^{-7} M immediately before experiments with anoxia. The cultures growing in standard conditions served as control for both experimental groups subjected to anoxia.

The cultures from both experimental groups were appropriately fixed for light microscopic and electron microscopic studies 30 min, 24 and 72 hours after anoxia. For light microscopy cultures were stained by routine histological methods including H-E and toluidine blue. For electron microscopy, the

cultures were fixed in cold 2% glutaraldehyde for 1/2 h. The tissues were then rinsed in cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h and postfixed for 1 h in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer, pH 7.2. After dehydration, the cultures were embedded in Epon 812, cut on an ultramicrotome, counter-stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a JEM 100B electron microscope.

RESULTS

Under the light microscope, the cultures examined 30 min after anoxia showed distinct morphological changes of the glial cells as compared with the control. In the outgrowth zone surrounding the explant astrocytes appeared swollen, their processes shortened and fragmented. Numerous enlarged, poorly stained glial nuclei were present. In the majority of cultures surviving up to 72 h following anoxia morphological abnormalities were still pronounced (Fig. 1). Glial cells were often deprived of the processes, numerous vacuoles appeared in their cytoplasm. Cells with abundant cytoplasm were seen.

In the cultures containing nimodipine in the medium studied 30 min after anoxia, the nature and intensity of cellular alterations were essentially similar to the anoxia-induced changes described above. After 72 h in cultures containing still nimodipine in the medium less pronounced structural abnormalities were seen as compared with their anoxia-treated counterparts (Fig. 1a). Fragmentation of cellular processes and degeneration of perikaryal cytoplasm were much less common and, if present, less intensive.

Electron microscopic study revealed after 30-min anoxia severe damage of the glial cells, while neurons were only slightly affected. Glial cells, mostly astrocytes, showed considerable swelling of the cytoplasm and reduction of the organelles leading to a watery appearance of the majority of cells. A later feature of astrocytic damage, although occasionally seen also in early stages after anoxia, was disruption of the mitochondrial cristae, accumulation of lipid droplets, large vacuoles or lamellar residual bodies. In cultures after 72 h following anoxia distinct pathological changes were also found in neurons. Granular neurons and Purkinje cells showed a decreased number of rough endoplasmic reticulum channels, reduction in number of ribosomes or organelles destruction (Fig. 2).

In cultures kept in the medium with nimodipine, observed 30 min after anoxia, the structural changes were not as intensive as after anoxia in standard nutrient medium, but still present in the majority of the astrocytes. On the third day after anoxia in the cultures remaining in nimodipine-containing medium the above described abnormalities were absent (Fig. 2a). All types of neurons including Purkinje cells were unchanged. In some cultures only a few glial cells showed a diminished number of organelles, presence of vacuoles or residual bodies. Nevertheless, most glial cells exhibited well preserved mitochondria, Golgi apparatus, gliofilaments or gliotubules.

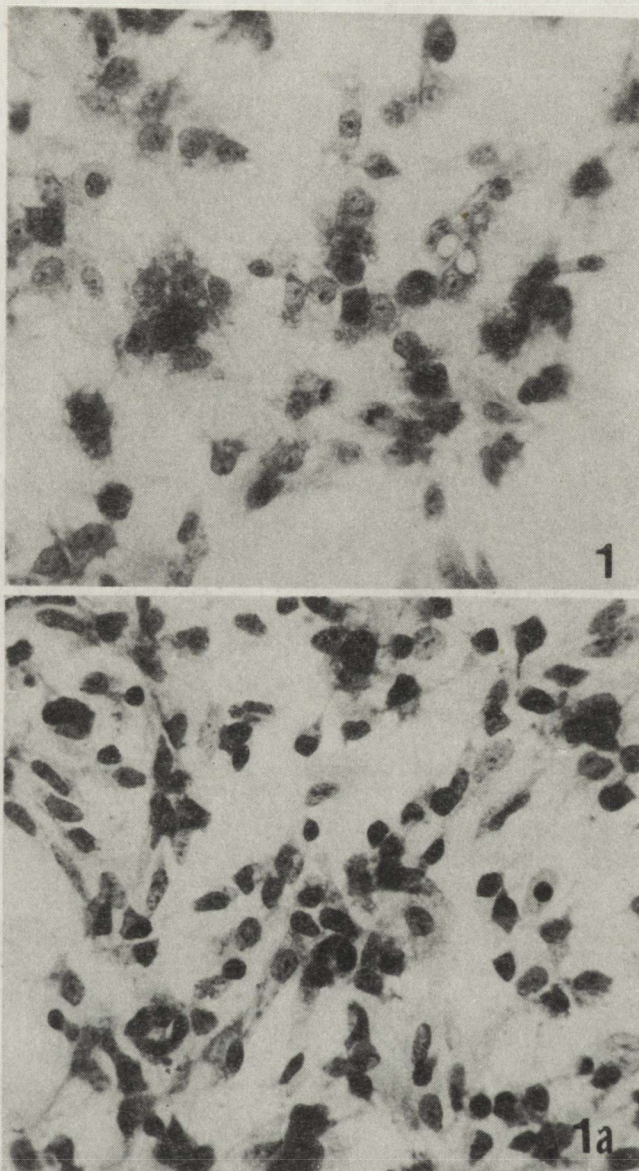


Fig. 1. Seven-day-old culture of rat cerebellum. Three days after anoxia. Swollen astrocytes with shortened processes and vacuoles. H-E. $\times 400$. *a.* The culture after anoxia kept 72 h in a medium containing nimodipine. Glial cells with normal morphological appearance. H-E. $\times 350$

Ryc. 1. Siedmiodniowa hodowla mózdzku szczura. Trzy dni po niedotlenieniu. Obrzmiałe astrocyty z krótkimi wypustkami i wakuolami. H-E. Pow. $400\times$. *a.* Hodowla 72 godz. po anoksji w medium zawierającym nimodipinę. Komórki glejowe wykazują prawidłowy obraz morfologiczny. H-E. Pow. $350\times$





Fig. 2. Three days after anoxia. Both astrocyte (A) and neuron (N) showing damage of the cytoplasmic organelles; vacuoles and residual bodies are present in the cytoplasm. $\times 8\ 000$. *a.* The culture 72 h after anoxia kept in nimodipine-containing medium. All types of cells are unchanged: astrocyte (A), Purkinje cells (P) and granular neuron (GR). $\times 6\ 000$

Ryc. 2. Trzy dni po niedotlenieniu. Zarówno w cytoplazmie astrocytu (A), jak i neuronu (N) obecne są uszkodzenia organelli i wakuole oraz ciała gęste. Pow. $8\ 000\times$. *a.* Hodowla po 72 godz. w medium zawierającym nimodipinę. Niezmienione komórki: astrocyty (A), komórki Purkinjego (P) i neurony ziarniste (GR). Pow. $6\ 000\times$

DISCUSSION

The protective properties of various calcium entry blockers against anoxic-ischemic disturbances in the brain were investigated on many experimental models (for review see Giesvold, Steen 1985). The beneficial effect of compounds inhibiting voltage-sensitive calcium channels (VSCCs) was almost exclusively related to improvement of cerebral blood flow, whereas their direct effect on the brain cells has not been established (Giesvold, Steen 1985). The cerebellar organotypic culture submitted to anoxia, which was used as a model in our study permitted to ascertain a direct beneficial effect of nimodipine, independently of any vascular factors. Although the protective effect of nimodipine on the morphological cell structure was obvious, the possible mechanism and the role of Ca^{2+} blockers in anoxia is not completely elucidated. Particularly, the specificity of the nimodipine calcium blockage, the period of action in reversible anoxia or the cell response as well as the type of cells which are targets of nimodipine protection seem to be important in that respect.

Although the inhibition of calcium channels in the brain by dihydropyridine derivatives is known to be limited to only a certain subclass of the VSCCs — L-channels (Miller 1987), nevertheless the involvement of these particular channels in the anoxic-ischemic calcium entry to brain cells is more probable than of other subtypes of the VSCCs (Choi 1988). The significance of direct inhibition by nimodipine of calcium channels which are responsible for anoxic/ischemic Ca^{2+} influx to brain cells was put in question by recent results from our laboratories which demonstrated a key role of nimodipine-insensitive ionic channels coupled to NMDA-specific glutamate receptors in that process and a very slight effectiveness of nimodipine applied directly to the hippocampus (Pluta et al. 1988, 1989; Salińska et al. 1989). Systemic nimodipine administration was much more effective, thus confirming the importance of the vascular factor as a nimodipine site of action (Łazarewicz et al. 1989).

The specificity of Ca entry blockers, when administered in higher doses, has also been questioned, as they may inhibit Na^+ channels as well (Miller, Freedman 1984) and interfere with the calmodulin signal-transducing system (Thayer, Fairhurst 1983). In our studies nimodipine was used in a submicromolar range (10^{-7} M), where the unspecific inhibition of Na^+ channels by dihydropyridine calcium blockers seems to be improbable. This conclusion may be supported by the low effectiveness of nimodipine in protection against early postanoxic damage, which is known to have an osmotic, Na^+ -dependent mechanism (Choi 1988). The participation of possible inhibition by nimodipine of calmodulin cannot be, however, excluded. Therefore, nimodipine in our experiments may exert its effects by inhibition of Ca^{2+} channels, and, consequently, by diminution of anoxia-evoked Ca influx into the brain cells and/or by inhibition of Ca^{2+} -dependent, calmodulin-mediated intracellular

processes. In both cases nimodipine action would be directed to the pathogenic effects of calcium.

As mentioned above, the much smaller effect of Ca^{2+} blockers on the cell structure, observed immediately after anoxia, as compared with the pronounced effect after 3 days, most probably reflects two distinct phases of anoxic cell injury (Choi, 1988): early osmotic damage, dependent on the influx of monovalent ions and H_2O and further, a calcium-related irreversible insult. It is difficult to assess to what extent the protective effect of nimodipine may be attributed to the blockage of known secondary post-anoxic calcium accumulation in the brain tissue (Yanagihara, McCall 1982; Hossmann et al. 1985) and/or to inhibition of calcium-related intracellular mechanisms leading to brain cell injury.

One of the important observations in our experiments was the relatively sensitive, primary reaction of the astroglia to anoxic insult. The high susceptibility of the astrocytes to nimodipine indicates the existence of VSCCs in these cells as has been suggested in isolated and cultured astrocytes (Łazarewicz et al. 1977; MacVicar 1984) and the sensitivity of these channels to nimodipine, recently observed by others (Waltz et al. 1989). These data agree with the opinions that astrocytes may actively participate in the regulation of extracellular calcium concentration in the brain (Łazarewicz et al. 1977) and that the depolarization-dependent influx of calcium to astroglia may under anoxic conditions constitute a compensatory mechanism which reduces injurious calcium overload of neurons (Waltz et al. 1989).

Summarizing our results we have concluded that nimodipine prevents cell destruction induced by anoxia *in vitro*, thus indicating the primary role of calcium in the mechanism of cell damage.

OCHRONNY EFEKT DZIAŁANIA INHIBITORA KANAŁÓW WAPNIA – NIMODIPINY NA KOMÓRKI MÓZDŻKU W HODOWLI

Streszczenie

Hodowle organotypowe mózdzku szczura zostały poddane 30 min niedotlenieniu i do części hodowli podano nimodipinę w stężeniu 10^{-7} M. Niedotlenienie było powodem powstawania obrzmienia astrocytów i zmian zwyrodnieniowych komórek nerwowych. Uszkodzenia morfologiczne były znacznie mniejsze po 72 godz. po niedotlenieniu w hodowlach, które otrzymały nimodipinę. Dyskutowana jest rola wapnia w mechanizmie uszkodzenia komórek.

REFERENCES

1. Choi D.W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 1988, 11, 465–469.
2. Giesvold S.E., Steen P.A.: Drug therapy in brain ischemia. *Br J Anaesth*, 1985, 57, 96–109.
3. Hossmann K.-A., Grosse Ophoff B., Schmidt-Kastner R., Oschlies U.: Mitochondrial calcium

- sequestration in cortical and hippocampal neurons after prolonged ischemia of the cat brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, 68, 230–238.
4. Łazarewicz J.W., Kanje M., Sellstrom A., Hamberger A.: Calcium fluxes in cultured and bulk-isolated neuronal and glial cells. *J Neurochem*, 1977, 29, 495–502.
 5. Łazarewicz J.W., Majewska M.D., Wróblewski J.T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. In: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Eds.: M.J. Mossakowski, I.B. Zelman, H. Kroh. *Pol. Med. Publ., Warszawa*, 1978, pp. 79–86.
 6. Łazarewicz J.W., Pluta R., Salińska E., Puka M.: Beneficial effect of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke*, 1989, 20, 70–77.
 7. MacVicar B.A.: Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 1984, 226, 1345–1347.
 8. Miller R. J., Freedman S. M.: Minireview: Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels? *Life Sci*, 1984, 34, 1205–1221.
 9. Miller R.J.: Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*, 1987, 235, 46–52.
 10. Pluta R., Salińska E., Puka M., Stafiej A., Łazarewicz J.W.: Early changes in extracellular amino acid and calcium concentrations in rabbit hippocampus following complete 15-min cerebral ischemia. *Resuscitation*, 1988, 16, 193–210.
 11. Pluta R., Salińska E., Puka M., Łazarewicz J. W.: Differential effects of ischemic and intrahippocampal application of nimodipine in complete 15-min cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1989, 9, (Suppl 1), 177.
 12. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M.J.: The effect of prostacyclin on the morphological and enzymatic properties of cerebellar cultures exposed to anoxia. *Acta Neurol Scand*, 1986, 73, 111–118.
 13. Salińska E., Pluta R., Łazarewicz J.W.: Participation of NMDA receptors in ischemic changes of calcium homeostasis in rabbit brain. *Biomed Biochim Acta*, 1989, 40, S170-S173.
 14. Siesjö B. K., Wieloch T.: Cerebral metabolism in ischemia: neurochemical basis for therapy. *Br J Anaesth*, 1985, 57, 47–62.
 15. Thayer S.A., Fairhurst A.S.: The interaction of dihydropyridine calcium channel blockers with calmodulin and calmodulin inhibitors. *Mol Pharmacol*, 1983, 24, 6–9.
 16. Waltz L., Bender A.S., Woodbury D.M., White H.S.: Potassium-stimulated calcium uptake in astrocytes and its potent inhibition by nimodipine. 1989, submitted for publication.
 17. Yanagihara T., McCall J.T.: Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci*, 1982, 30, 1921–1925.

Authors' address: Departments of Neuropathology and Neurochemistry, Medical Research Centre, PASci, 3 Dworkowa Str, 00–784 Warszawa, Poland.

KRYSTYNA RENKAWEK, JERZY W. ŁAZAREWICZ

NIMODIPINE APPLIED IMMEDIATELY AFTER ANOXIA
PROTECTS CEREBELLAR CELLS IN CULTURE
AGAINST INJURY

Departments of Neuropathology and Neurochemistry, Medical Research Centre, PASci,
Warszawa

Excessive influx of calcium ions into the brain cells during hypoxia or ischemia has been considered as a pathogenetic factor of cell injury (Łazarewicz et al. 1978; Siesjö, Wieloch 1985; Siesjö 1986). This hypothesis has been supported by experimental results showing beneficial effects of the calcium entry blocker — nimodipine preventing postanoxic cell injury (Beathmann, Jansen 1986; Fujisawa et al. 1986; Mabe et al. 1986; Mossakowski, Gadamski 1987), although some of the results are negative (Barnett et al. 1986; Vibulsresth et al. 1987). It was recently demonstrated in our laboratories that systemic application of nimodipine was much more effective in the prevention of ischemia-evoked calcium redistribution from the extracellular compartment to rabbit hippocampal neurons than local administration directly to the hippocampus (Pluta et al. 1988, Łazarewicz et al. 1989, Pluta et al. 1989), which may suggest a predominantly vascular site of nimodipine action.

The results obtained *in vivo* represent a complex effect consisting of the influence of nimodipine on both the parenchyma (Borgers 1985) and the brain circulation, due to its known vasodilatory effects (Steen et al. 1983; Kazda, Mayer 1985). The tissue culture model of anoxia used in the present study allows to eliminate systemic or vascular factors in the brain damage and permits to examine the direct cell response to anoxia or to evaluate the preventing properties of some substances in experimental brain anoxia. Our previous experiments on tissue culture submitted to anoxia in the presence of nimodipine showed the cytoprotective effect of that calcium entry blocker, lasting for 72 h after anoxia (Renkawek, Łazarewicz 1989).

The present experiments carried out on the same model designed to test, whether the cytoprotective effect of nimodipine is restricted only to the anoxic

period or is present also in the later period following anoxia, when reoxygenation of the tissue takes place. Our results suggest that the cytoprotective effect of nimodipine concerns the early postischemic period.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures of rat cerebellum were prepared and submitted to anoxia according to the procedure described in our previous paper (Renkawek, Łazarewicz 1989). The cultures grown in standard medium and conditions were exposed on the seventh day *in vitro* to 30-min anoxia in specially adapted Carrel flasks (Renkawek et al. 1986) in standard medium or in a medium containing nimodipine in a final concentration of 10^{-7} M. Nimodipine was added to the medium at the end of anoxia or 24 h afterwards. The cultures were taken for light and electron microscopy immediately after anoxia ("0" time) or 24 and 72 h after the experiment. The experimental material was prepared in the same routine way as previously (Renkawek, Łazarewicz 1989).

RESULTS

Under the light microscope, the cultures exposed to anoxia in standard conditions showed swelling of the glial cells, loss of their processes and vacuolization of the cytoplasm. These changes were much less pronounced or in the majority of cultures completely absent when nimodipine was added to their nutrient medium immediately after anoxia.

The first ultrastructural changes were noticeable in the fixed cultures as early as "0" time of survival, that is the end of thirty-minute anoxia. At that time most astrocytes were swollen and their cytoplasm was deprived of organelles. Twenty four hours after anoxia glial changes consisted in microvacuolization, swelling of mitochondria or degeneration of other cytoplasmic organelles. The neurons were less affected in the earliest stage of observation. Neuronal alterations were seen 24 h after anoxia. They appeared as formation of vacuoles, swelling of mitochondria, distention of endoplasmatic reticulum channels and Golgi cisternae and disintegration of ribosomal rosettes. Some of the glial cells nad neurons showed early chromatin clumping and finally cell necrosis. Similar morphological changes were found in the cultures surviving 72 h after anoxia (Fig. 1), although the intensity of cell damage was less pronounced and greatly varied in particular cells.

There was a marked contrast in morphological appearance between control cultures submitted to anoxia and those studied after nimodipine application to the culture medium after anoxia. In cultures kept in the medium containing nimodipine added immediately after anoxia, the cells were not affected. All types of neurons including Purkinje cells were unchanged (Fig. 2). The majority of glial cells preserved their normal morphological structure (Fig. 3).

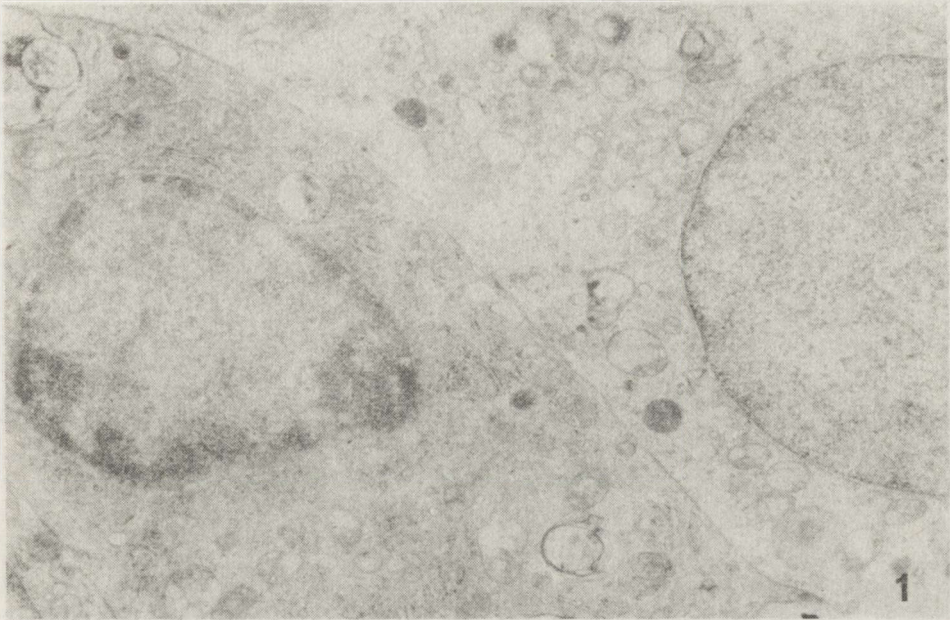


Fig. 1. Cerebellar culture, 72 h after anoxia. Swelling and degeneration of the astrocyte. $\times 11\,500$
Ryc. 1. Hodowla mózdzku, 72 godz. po niedotlenieniu. Obrzmienie i zmiany zwyrodnieniowe astrocytu. Pow. $11\,500\times$

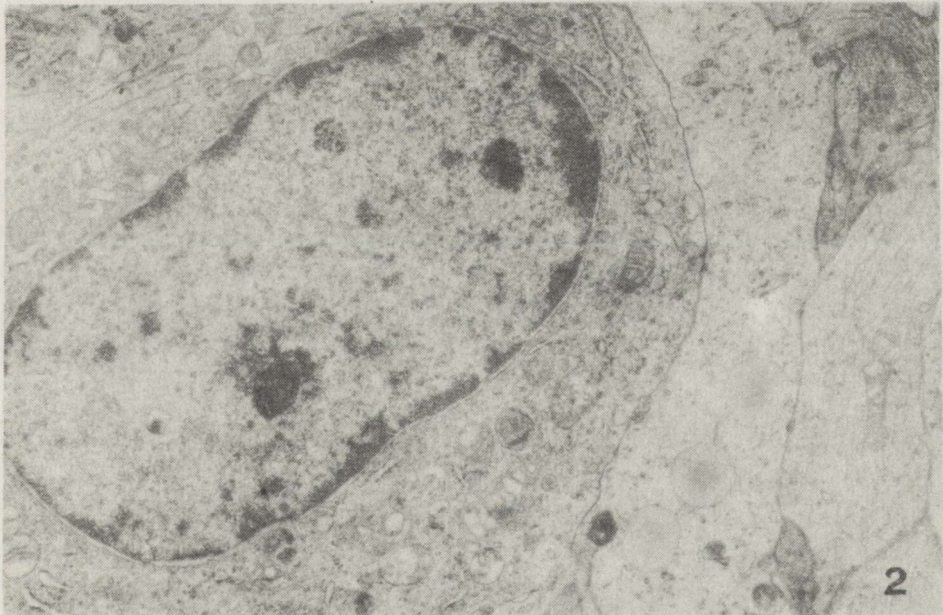


Fig. 2. Culture containing nimodipine added to the medium immediately after anoxia and observed 72 h later. Unchanged neuron. $\times 11\,500$
Ryc. 2. Hodowla zawierająca nimodipinę dodaną do medium bezpośrednio po niedotlenieniu. Prawidłowa ultrastruktura neuronu. Pow. $11\,500\times$

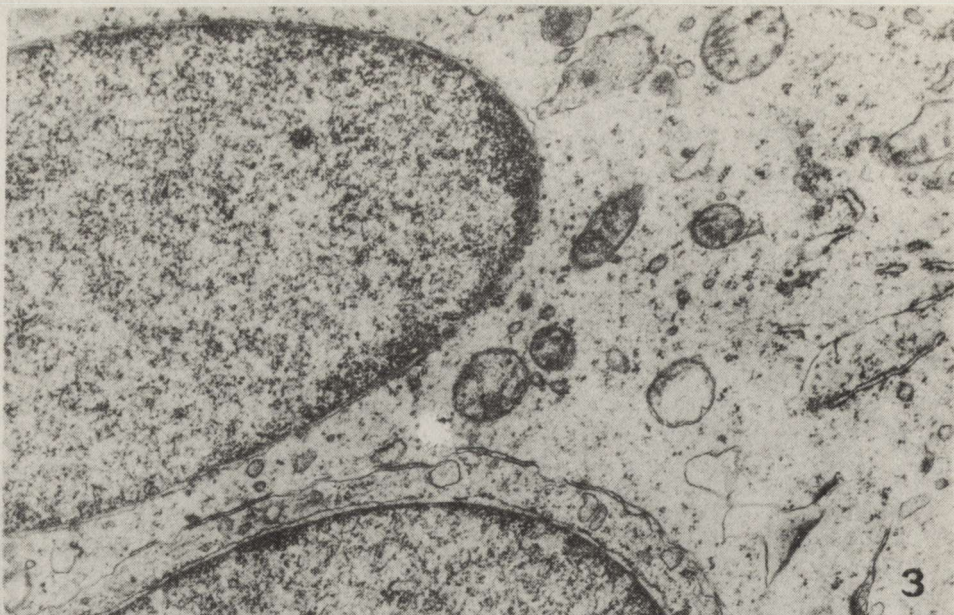


Fig. 3. Culture containing nimodipine added to the nutrient medium immediately after anoxia and observed 72 h later. Two normally-looking astrocytes filled with organelles and gliofilaments. $\times 11\,500$

Ryc. 3. Hodowla zawierająca nimodipinę podaną bezpośrednio po niedotlenieniu i badana po upływie 72 godz. Prawidłowe astrocyty zawierające w cytoplazmie liczne organelle i gliofilamenty. Pow. 11 500 \times

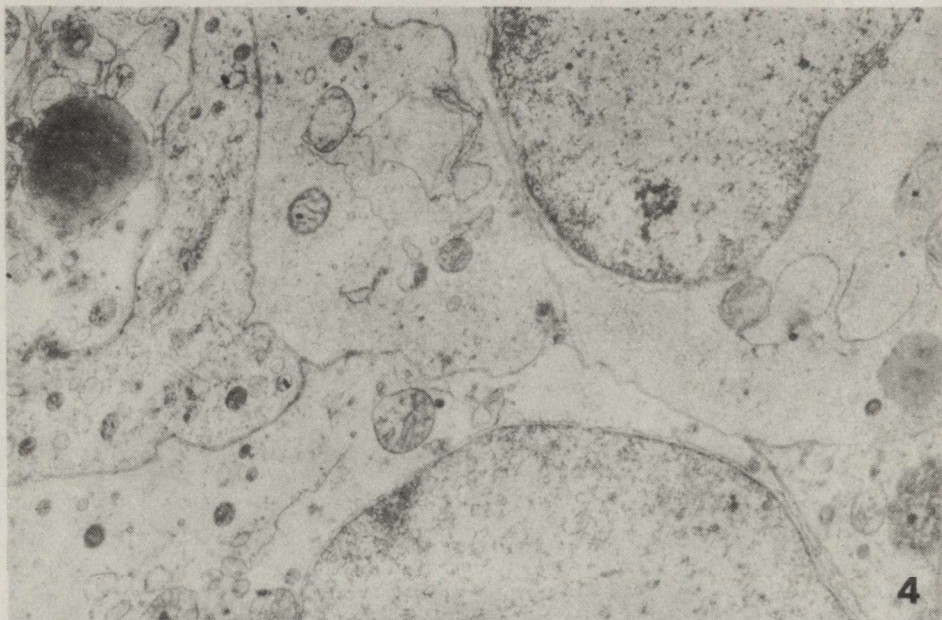


Fig. 4. Culture containing nimodipine added 24 h after anoxia, observed 72 h after anoxia. Severe ultrastructural abnormality of glia. $\times 11\,500$

Ryc. 4. Hodowla zawierająca w środowisku nimodipinę podaną w 24 godz. po niedotlenieniu, badana w 72 godz. po anoksji. Ciężkie uszkodzenia ultrastruktury neurogleju. Pow. 11 500 \times

This protective action in cultures treated with nimodipine 24 h after anoxia was not visible (Fig. 4). These cultures developed similar morphological changes to those exposed to anoxia without nimodipine in the medium.

DISCUSSION

A broad spectrum of cellular changes was noted in the cultures of cerebellum subjected to anoxia. The cell damage was characterized by two distinct pathological processes: selective glial swelling and glial and neuronal degeneration and necrosis. Electron-microscopic examination revealed no discernible differences between cell damage in the cultures after anoxia and in those exposed to anoxia with nimodipine added to the medium 24 h after anoxia. These results are in great contrast with those for the group of cultures treated with nimodipine immediately after anoxia. The latter cultures showed no morphological alterations during the survival time and 72 h after anoxia the neurons and glial cells were found virtually intact.

The mechanism by which nimodipine prevents cell damage in cultures subjected to anoxia is not completely elucidated. The findings of our previous investigations (Renkawek, Łazarewicz 1989) and present results indicate that cultures treated with nimodipine-supplemented media before anoxia and after anoxia suffer no substantial cell damage. The beneficial effect of the calcium entry blocker confirmed the opinion that cell damage in cerebellar cultures can be aggravated by calcium influx into these cells. In fact, cell destruction has been related to excessive accumulation of calcium ions in brain cells (Siesjö 1986). An elevated cytosolic free calcium concentration in the cortical cells during anoxia has been recently detected *in vivo* with the quin2 fluorescent Ca^{2+} -chelate probe (Uematsu et al. 1988). Later administration of the calcium entry blocker (after 24 h), when the cells already suffer from calcium overload has no effect on damaged cell membranes.

In spite of the relatively low concentration of nimodipine used in this experimental model *in vitro*, its cytoprotective mechanism should be considered not only as a specific inhibition of L-type voltage-sensitive calcium channels (VSCCs), which consequently resulted in protection against massive calcium overload (Carvahlo et al. 1986; Miller 1987), but also as unspecific inhibition of intracellular calcium-dependent signalling, particularly of the calmodulin system (Thayer, Fairhurst 1983). The protection concerns neurons but also astrocytes possessing voltage-sensitive calcium channels as well (MacVicar 1984), which are susceptible to inhibition by dihydropyridines (Waltz et al. 1989).

It was found in our study (Renkawek, Łazarewicz 1989) that cellular alterations observed immediately after anoxia were not prevented by nimodipine present in the medium during the anoxic period and the nimodipine protection was seen only after 3 days. This finding was in agreement with the recently suggested discrimination between the early, osmotic phase of cell

injury and the delayed, calcium dependent damage (Choi 1988). Prevention of delayed neuronal death in the gerbil hippocampus by systemic application of a calcium blocker after 5-min ischemia was recently reported by Mossakowski and Gadamski (1987) and by Izumiyama and Kogure (1988), however, in their *in vivo* studies it is difficult to discriminate between vascular and parenchymal sites of action. Here we found that benefit may be obtained by administering nimodipine to cell cultures even after anoxia.

Our results concerning time sequences of the nimodipine damage-preventing action may suggest that the beneficial effect of this drug is related not to the inhibition of calcium entry to the cells during anoxia, but rather to the interference with further calcium-related injurious phenomena. This conclusion agrees with other observations that *in vivo* calcium entry blockers do not prevent efficiently calcium influx into the brain cells during hypoxia and ischemia (Peters 1986; Pluta et al. 1989). Moreover, a class of calcium channels in the brain, regulated by excitatory amino acid receptors which seem to be mainly involved in ischemic/anoxic calcium influx into neurons (Meldrum et al. 1985; Choi 1988; Salińska et al. 1989), are insensitive to dihydropyridine inhibitors of VSCCs (Riveros, Orrego 1986; Łazarewicz et al. 1987). Therefore, most important for cell survival seems to be prevention of calcium-dependent intracellular events which may lead to cell injury, e.g. inhibition by nimodipine of the calmodulin system (Thayer, Fairhurst 1983). The other possible target of nimodipine action may be also a delayed secondary influx of calcium after anoxia, a phenomenon comparable with that observed after ischemia (Yanagihara, McCall 1982; Hossmann et al. 1985). That effect is probably connected with dysfunction of neurons induced by the anoxic episode, especially in the critical period up to 24 h after anoxia. The mechanism of this secondary influx into the cells and its sensitivity to calcium antagonists is unknown. It can be speculated that it is not an accompanying epiphenomenon, a symptom of irreversible cell damage, but may be an important pathogenic factor in cell injury, and possible blockade of this fatal calcium entry would prevent cell damage.

The present results may have practical implications, because they point to the possibility of nimodipine application not only for preventing anoxic lesions, but also in the postanoxic period, in therapy after the hypoxic episode.

ZAPOBIEGANIE ZMIANOM STRUKTURALNYM W HODOWLI MÓZDŻKU PRZEZ NIMODIPINĘ PODANĄ BEZPOŚREDNIO PO ANOKSJI

Streszczenie

Przeprowadzono obserwacje w mikroskopie elektronowym hodowli mózdku poddanych 30 min niedotlenieniu, z których część zawierała w środowisku odżywczym nimodipinę. Nieprawidłowości morfologiczne wywołane niedotlenieniem polegały na znacznym obrzmieniu astrocytów i zmianach zwyrodnieniowych komórek nerwowych. Niedotlenienie nie wywoływało zmian strukturalnych w hodowlach, do których medium nimodipina została podana bezpośrednio po 30

min. anoksji. Efekt ochronny nimodipiny był nieobecny w hodowlach poddanych niedotlenieniu, do których bloker kanałów wapniowych podany został w 24 godz. po anoksji. Wyniki badań wskazują na istotną rolę wapnia w patogenezie uszkodzeń komórkowych elementów tkanki nerwowej w warunkach niedotlenienia.

REFERENCES

1. Beathmann A., Jansen M.: Possible role of calcium entry blockers in brain protection. *Eur Neurol*, 1986, 25, suppl. 1, 102–114.
2. Barnett G. G., Bose B., Little J. R., Jones S. C., Friel H. T.: Effects of nimodipine on acute focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 884–890.
3. Borgers M.: Morphological assessment of tissue protection. In: Calcium entry blockers and tissue protection. Eds.: T. Godfraind, P. M. Vanhoutte, S. Govoni, R. Paoletti., Raven Press, New York, 1985, pp. 173–181.
4. Carvahlo C. A. M., Coutinho O. P., Carvalho A. P.: Effects of Ca^{2+} channel blockers on Ca^{2+} translocation across synaptosomal membranes. *J Neurochem*, 1986, 47, 1774–1784.
5. Choi D. W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 1988, 11, 465–469.
6. Fujisawa A., Matsumoto M., Matsuyama T., Ueda H., Wanaka A., Yoneda S., Kimura K., Kamada T.: The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 748–752.
7. Hossmann K.-A., Grosse Ophoff B., Schmidt-Kastner R., Oschlies U.: Mitochondrial calcium sequestration in cortical and hippocampal neurons after prolonged ischemia of the cat brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, 68, 230–238.
8. Izumiyama K., Kogure K.: Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by ion channel blockers. *Stroke*, 1988, 19, 1003–1007.
9. Kazda S., Mayer D.: Postischemic impaired reperfusion and tissue damage: consequences of a calcium-dependent vasospasm? In: Calcium entry blockers and tissue protection. Eds.: T. Godfraind, P. M. Vanhoutte, S. Govoni, R. Paoletti. Raven Press, New York, 1985, pp. 129–138.
10. Lazarewicz J. W., Lehmann A., Hamberger A.: Effects of Ca^{2+} entry blockers on kainate-induced changes in extracellular amino acids and Ca^{2+} *in vivo*. *J Neurosci Res*, 1987, 18, 341–344.
11. Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. In: Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension. Eds.: M. J. Mossakowski, I.B. Zelman, H. Kroh. *Pol. Med. Publ.*, Warszawa, 1978, pp. 79–86.
12. Łazarewicz J. W., Pluta R., Salińska E., Puka M.: Beneficial effect of nimodipine on metabolic and functional disturbances in rabbit hippocampus following complete cerebral ischemia. *Stroke*, 1989, 20, 70–77.
13. Mabe H., Nagai H., Takagi T., Amemura S., Ohno M.: Effect of nimodipine on cerebral functional and metabolic recovery following ischemia in the rat brain. *Stroke*, 1986, 17, 501–505.
14. MacVicar B. A.: Voltage-dependent calcium channels in glial cells. *Science*, 1984, 226, 1345–1347.
15. Meldrum B., Evans M., Griffiths T., Simon R.: Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and of calcium entry. *Br J Anaesth*, 1985, 57, 44–46.
16. Miller R. J.: Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*, 1987, 235, 46–52.
17. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Influence of calcium entry channel blocker on the ischemic changes in sector CA_1 pyramidal neurons of Ammon's horn in Mongolian gerbil (Polish text). *Neuropathol Pol*, 1987, 25, 425–450.

18. Peters T.: Calcium in physiological and pathological cell function. *Eur Neurol*, 1986, 25, suppl. 1, 27–44.
19. Pluta R., Salińska E., Puka M., Łazarewicz J. W.: Differential effects of systemic and intrahippocampal application of nimodipine in complete 15-min cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1989, 9 (Suppl. 1), 177.
20. Pluta R., Salińska E., Puka M., Stafiej A. and Łazarewicz J. W.: Early changes in extracellular amino acid and calcium concentrations in rabbit hippocampus following complete 15-min cerebral ischemia. *Resuscitation*, 1988, 16, 193–210.
21. Renkawek K., Herbaczyńska-Cedro K., Mossakowski M. J.: The effect of prostacyclin on the morphological and enzymatic properties of CNS cultures exposed to anoxia. *Acta Neurol Scand*, 1986, 73, 111–118.
22. Renkawek K., Łazarewicz J. W.: Protective effect of the calcium entry blocker, nimodipine on cerebellar organotypic cultures submitted to anoxia. *Neuropatol Pol*, 1989, 27.
23. Riveros N., Orrego F.: N-methylaspartate-activated calcium channels in rat brain cortex slices. Effect of calcium channel blockers and of inhibitory and depressant substances. *Neuroscience*, 1986, 17, 541–546.
24. Salińska E., Pluta R., Łazarewicz J. W.: Participation of NMDA receptors in ischemic changes of calcium homeostasis in rabbit brain. *Biomed Biochim Acta*, 1989, 40, S170-S173.
25. Siesjö B. K.: Calcium and ischemic brain damage. *Eur Neurol*, 1986, 25, suppl. 1, 45–56.
26. Siesjö B. K., Wieloch T.: Cerebral metabolism in ischemia: neurochemical basis for therapy. *Br J Anaesth*, 1985, 57, 47–62.
27. Steen P. A., Newberg L.A., Milde J. H., Michenfelder J. D.: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurological recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1983, 3, 38–43.
28. Thayer S. A., Fairhurst A. S.: The interaction of dihydropyridine calcium channel blockers with calmodulin and calmodulin inhibitors. *Mol Pharmacol*, 1983, 24, 6–9.
29. Uematsu D., Greenberg J. H., Reivich M., Kobayashi S., Karp A.: *In vivo* fluorometric measurement of changes in cytosolic free calcium from the cat cortex during anoxia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1988, 8, 367–374.
30. Vibulsresth S., Dietrich W. D., Busto R., Ginsberg M. D.: Failure of nimodipine to prevent ischemic neuronal damage in rats. *Stroke*, 1987, 18, 210–216.
31. Waltz L., Bender A. S., Woodbury D. M., White H.S.: Potassium-stimulated calcium uptake in astrocytes and its potent inhibition by nimodipine. 1989, submitted for publication.
32. Yanagihara T., McCall J. T.: Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci*, 1982, 30, 1921–1925.

Authors' address: Departments of Neuropathology and Neurochemistry, Medical Research Centre, PAsci, 3 Dworkowa Str, 00–784 Warszawa, Poland.

BARBARA GAJKOWSKA, ROMAN GADAMSKI, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

WPLYW KRÓTKOTRWAŁEGO NIEDOKRWIENIA
NA ULTRASTRUKTURĘ ZAKRĘTU HIPOKAMPA
U CHOMIKÓW MONGOLSKICH
CZĘŚĆ II. OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY SYNAPS
WE WCZESNYM OKRESIE PONIEDOKRWIENNYM

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

Analiza zmian ultrastrukturalnych odcinka CA₁ rogu Amona u chomika mongolskiego po przebytych incydencie niedokrwiennym była przedmiotem wielu wcześniejszych badań (Kirino 1982; Kirino, Sano 1984; Kirino i wsp. 1985, Suzuki i wsp. 1985; Mossakowski i wsp. 1986, 1989). W badaniach tych wykazano, że w modelu doświadczalnego niedokrwienia mózgu, mieszczącego się w granicach odwracalności zmian tkankowych, wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych odcinka CA₁ jest procesem rozwijającym się wolno i ujawniającym się po upływie 3–5 dni. Zanik neuronów określony nazwą opóźnionej śmierci komórki (delayed neuronal death) poprzedzony jest ich wzmożoną aktywnością bioelektryczną, przypadającą na pierwszą dobę po niedokrwieniu (Suzuki i wsp. 1983). Zjawisko to wiąże się zazwyczaj z ekscytotoksycznym działaniem aminokwasowych neuroprzekaźników. Spostrzeżenia te sugerować mogą istotną rolę synaps w regulacji poniedokrwiennych procesów patologicznych.

Zmiany ultrastrukturalne obserwowane we wcześniejszych badaniach własnych (Mossakowski i wsp. 1989) skłoniły nas do podjęcia szczegółowej analizy obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps we wszystkich kolejnych warstwach odcinka CA₁ (*stratum oriens, pyramidale, radiale, lacunosum-moleculare* i *moleculare*) wytwarzanych przez zakończenia aksonalne o zróżnicowanym pochodzeniu i charakteryzujących się obecnością różnych substancji neuroprzekaźnikowych (Gajkowska i wsp. 1988). Przedmiotem przedstawionej obecnie części pracy jest ultrastruktura synaps we wczesnym okresie poniedokrwiennym obejmującym fazę hiperaktywności bioelektrycznej komórek piramidowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na 10 3-miesięcznych chomikach mongolskich, u których w narkozie wziewnej (2% narkotan w układzie otwartym w mieszaninie gazowej składającej się z 70% azotu i 30% tlenu) wywołano niedokrwienie przodomózgowia przez zaciśnięcie tętnic szyjnych wspólnych przy użyciu klipsów Heifetzą na okres 7,5 min. Po zabiegu zwierzęta pozostawiano w warunkach hodowlanych na okres 12 (I grupa doświadczalna) lub 24 godziny (II grupa doświadczalna). Po tym czasie wykonywano im w narkozie eterowej przezsercową perfuzję aldehydem glutarowym.

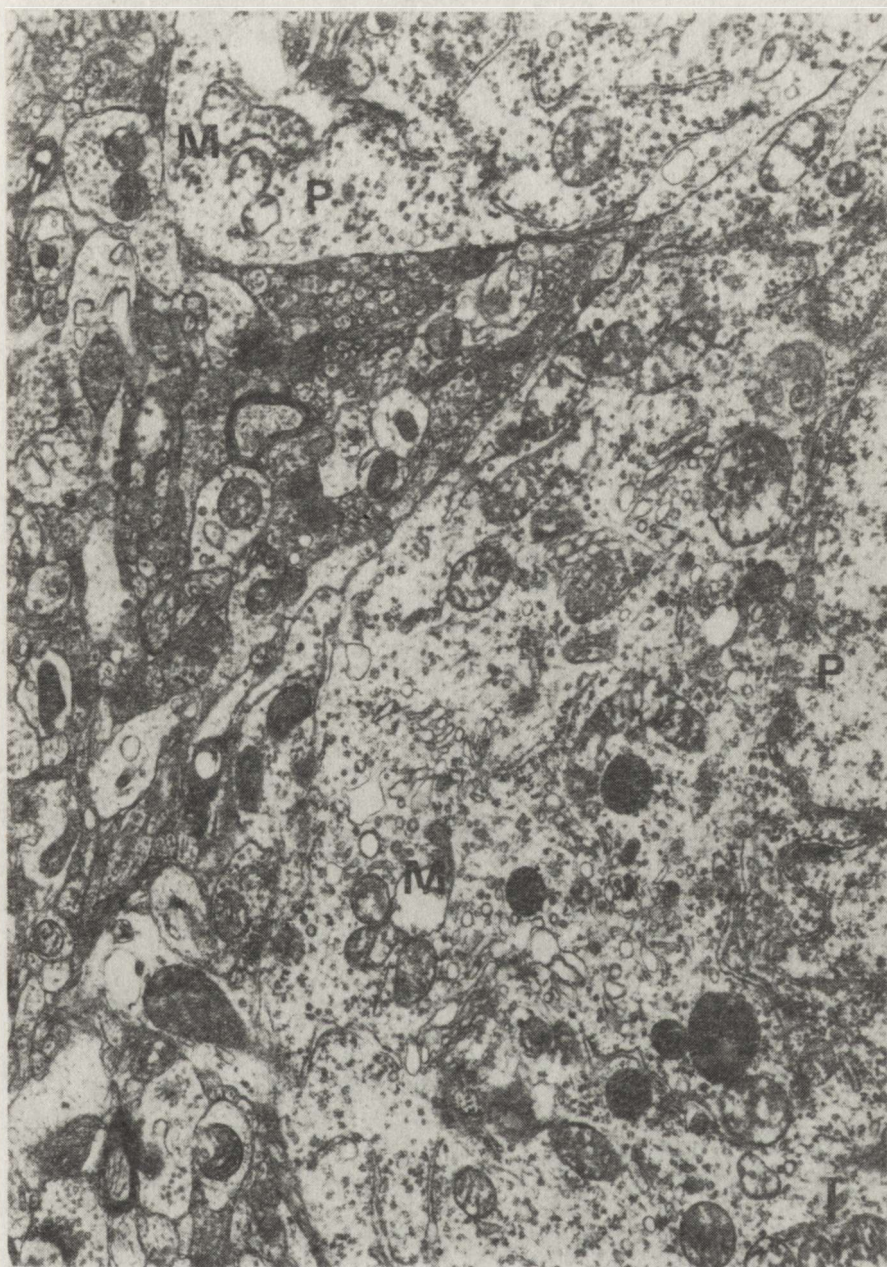
Materiał kontrolny stanowiło 5 zdrowych 3-miesięcznych chomików mongolskich, u których w sposób identyczny jak u zwierząt doświadczalnych wykonywano przezsercową perfuzję aldehydem glutarowym. Sposób pobierania i przeprowadzania materiału biologicznego do badań w mikroskopie elektronowym został dokładnie opisany w poprzedniej pracy (Gajkowska i wsp. 1988).

WYNIKI

I Grupa doświadczalna (12 godzin po niedokrwieniu)

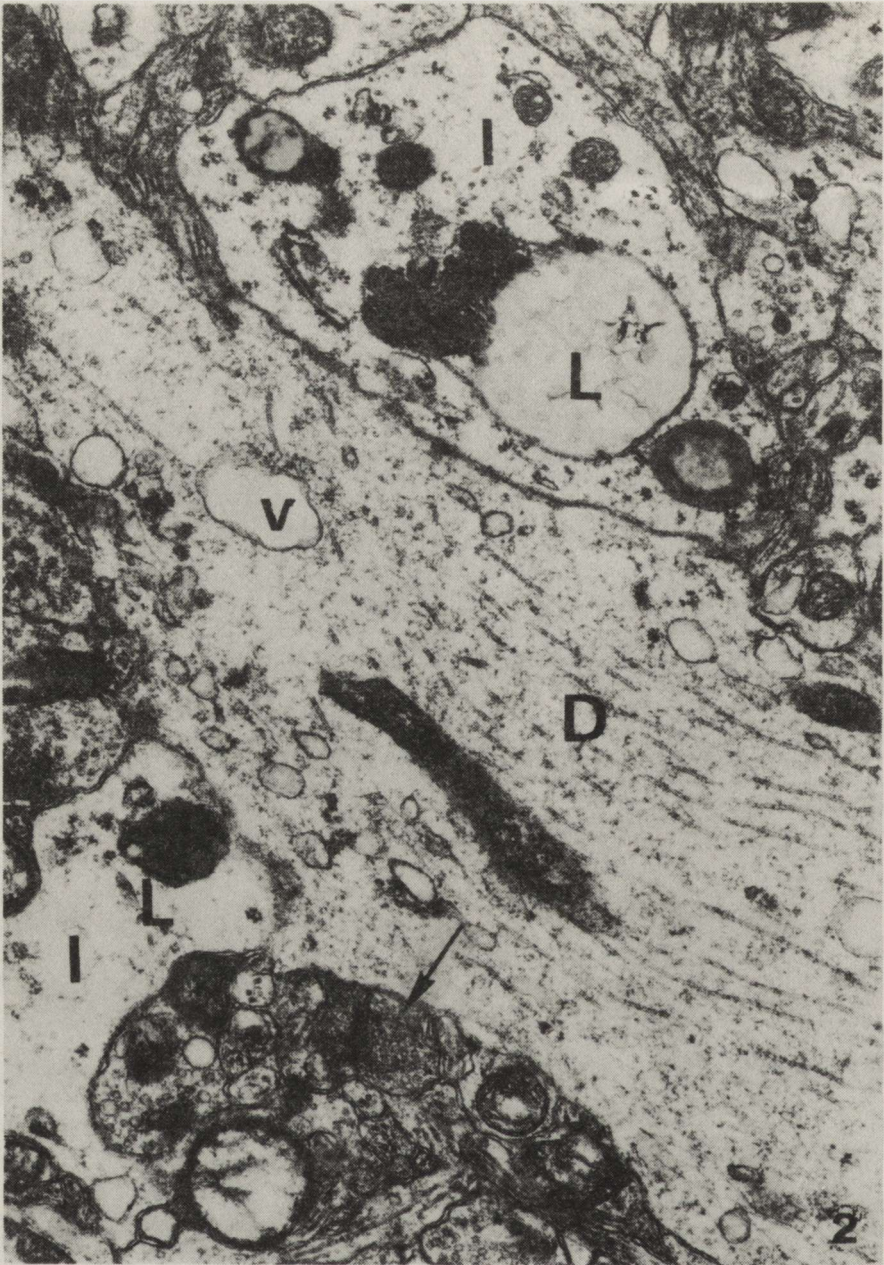
1. *Stratum pyramidale*. Niektóre neurony piramidowe wykazują tu nieznaczne zmiany w obrazie mikroskopowo-elektronowym. Mają one niewielkie nasilenie i dotyczą pojedynczych mitochondriów wykazujących cechy obrzmienia. W perykarialnej cytoplazmie neuronów i ich dendrytach spotyka się także pojedyncze, elektronowo-przeziernie wakuole oraz liczne lizosomy (ryc. 1, 2 i 3). Zawarte w tej warstwie interneurony stosunkowo często są obrzmiałe. Cechy obrzmienia wykazuje zarówno cytoplazma komórek, jak również poszczególne mitochondria. Poza tym w interneuronach stwierdza się zwiększenie ilości włóknistych elementów cytoskeletonu oraz obecność polimorficznych lizosomów (ryc. 4). Synapsy o typie symetrycznym, znajdujące się na powierzchni neuronów piramidowych i interneuronów oraz na ich dendrytach, nie wykazują zmian w obrazie ultrastrukturalnym. Natomiast w neuropilu, w okolicy neuronów piramidowych, niektóre kolbki presynaptyczne charakteryzują się obrzmieniem aksoplazmy oraz niewielką ilością pęcherzyków synaptycznych. Wiele odcinków postsynaptycznych wykazuje również cechy obrzmienia. W licznych dendrytach obserwuje się elektronowo-przezierną cytoplazmę podstawową oraz wakuole (ryc. 3 i 5). W neuropilu tej warstwy, zwłaszcza w okolicach przynaczyniowych, spotyka się astrocyty z obrzmiałą cytoplazmą perykarialną i wypustkową (ryc. 5).

2. *Stratum oriens*. W warstwie tej składającej się z aksonów oraz dendrytów podstawnych neuronów piramidowych i zakończeń komórek ziarnistych, jak również z wypustek interneuronów i ich zakończeń położonych na dendrytach neuronów piramidowych, obserwuje się stosunkowo niewielkie zmiany ultrastrukturalne dotyczące nielicznych kolbek presynaptycznych. Polegają one na rozrzedzeniu aksoplazmy, zmniejszeniu ilości pęcherzyków synaptycznych oraz



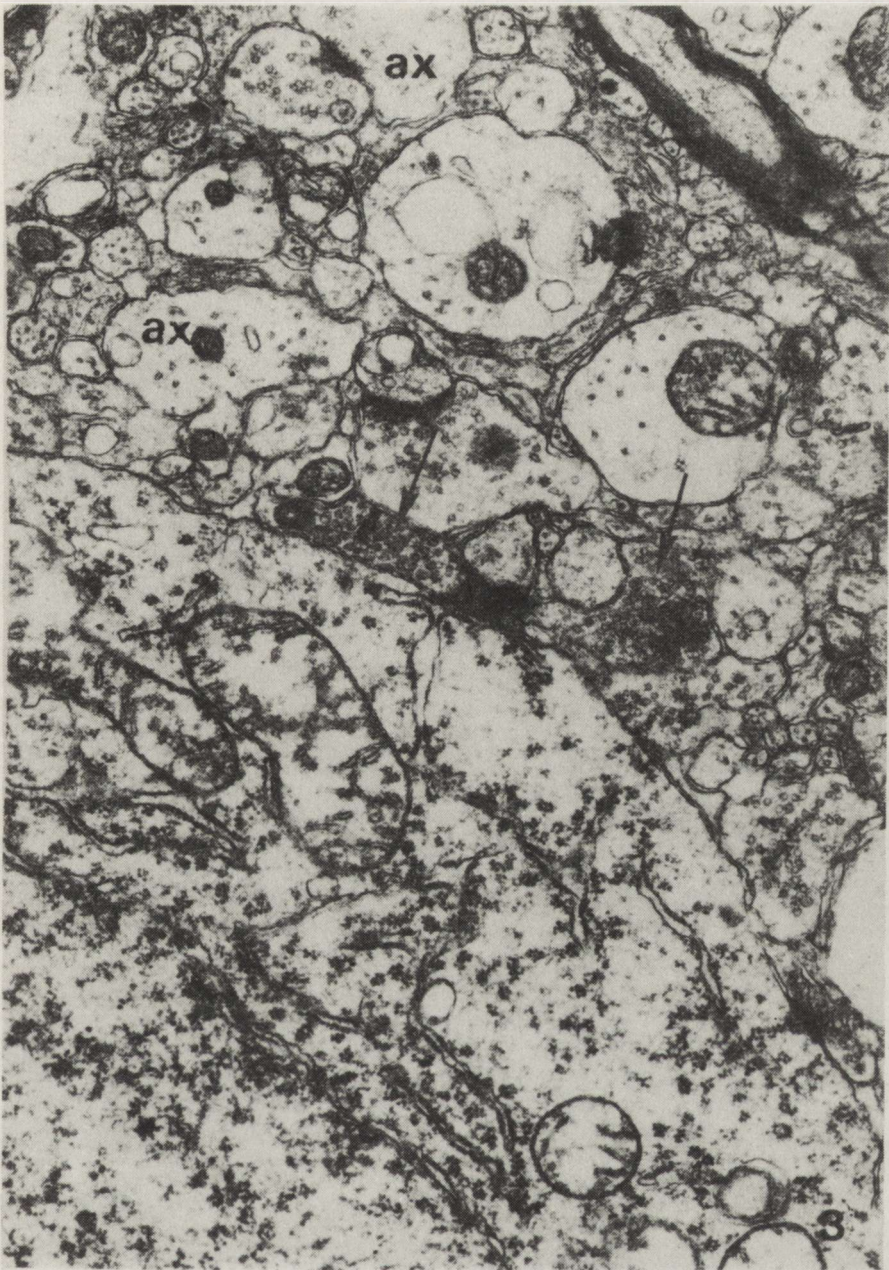
Ryc. 1. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragmenty dwóch komórek piramidowych (P) pokrytych gęsto synapsami o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym. W cytoplazmie komórek niektóre mitochondria (M) obrzmiały, oraz liczne lizosomy. Pow. 15 000 ×

Fig. 1. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragments of two pyramidal neurons (P) densely covered with unchanged synapses. In the cytoplasm some swollen mitochondria (M) and numerous lysosomes. × 15 000



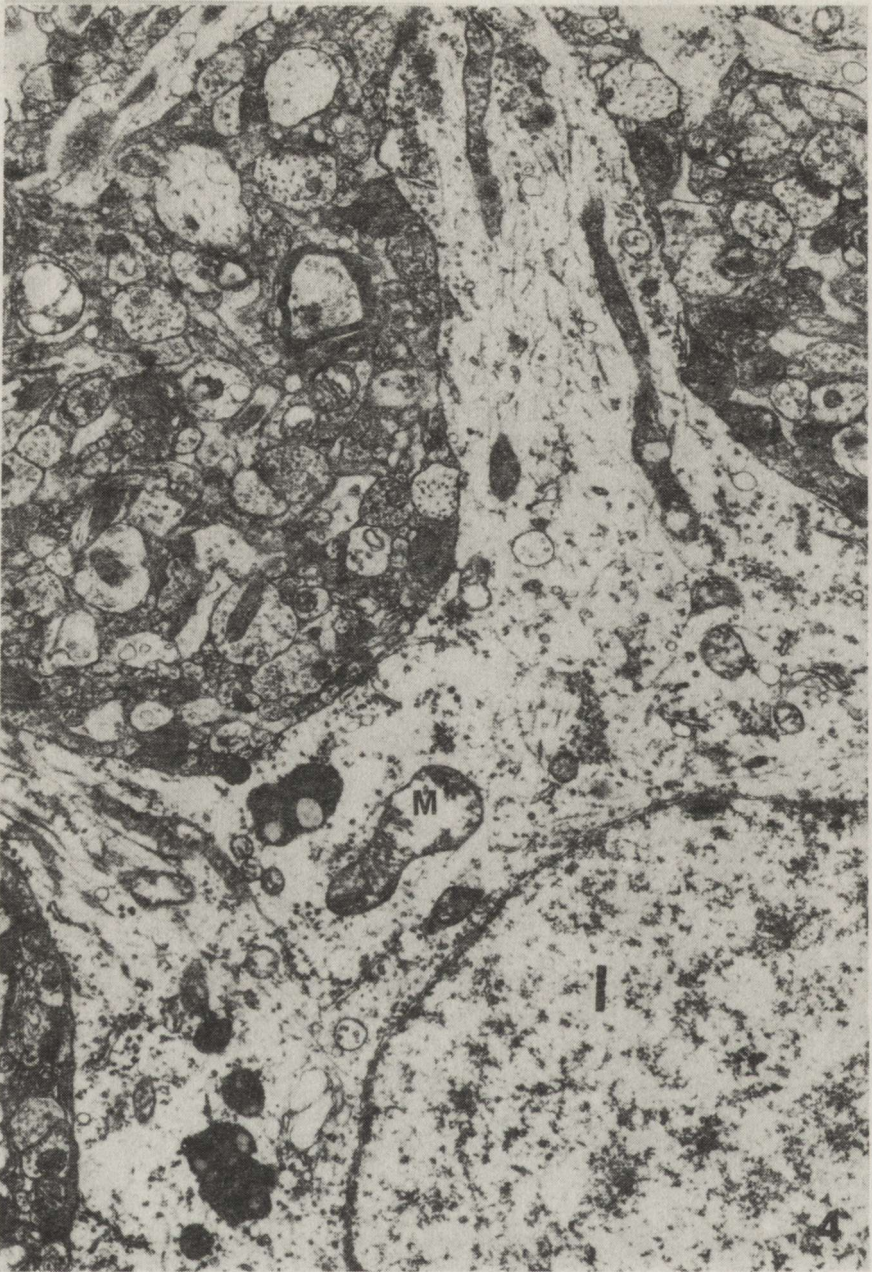
Ryc. 2. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment dendrytu komórki piramidowej (D). W cytoplazmie liczne neurotubule i neurofilamenty oraz elektronowo-przeziernie wakuole (V). Obecne są obrzmiałe wypustki interneuronów (I) zawierające polimorficzne lizosomy (L). Synapsy zawarte w otaczającym neuropilu wykazują prawidłowy obraz ultrastrukturalny (strzałka). Pow. 29 000 ×

Fig. 2. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragment of dendrite of pyramidal neuron (D). In cytoplasm numerous neurotubules, filaments and electron-lucent vacuoles (V). Note swollen processes of interneurons (I), containing polymorphic lysosomes (L). Unchanged synapses are present in neuropil (arrow). × 29 000



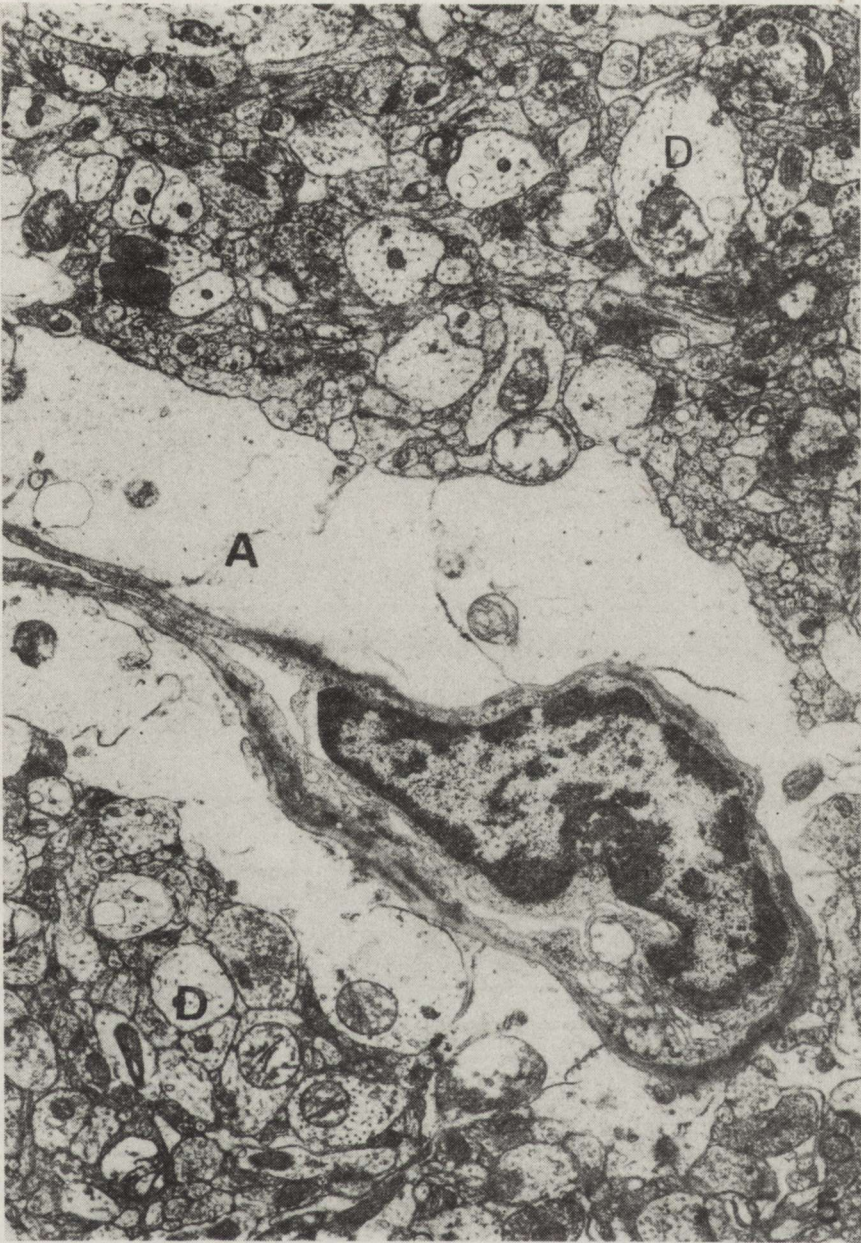
Ryc. 3. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment neuronu piramidowego. W cytoplazmie obecne obrzmiałe mitochondria. Synapsy o typie symetrycznym pokrywające neuron (strzałki) wykazują prawidłową ultrastrukturę. W neuropilu niektóre synapsy typu asymetrycznego (ax) wykazują obrzmiałe odcinki pre- i postsynaptyczne. Pow. 29 000 ×

Fig. 3. I experimental group. *Stratum pyramidale*. In the cytoplasm of pyramidal neuron swollen mitochondria are present. Unchanged symmetric synapses cover pyramidal neuron body (arrows). In neuropil some asymmetric synapses (ax) are swollen in both pre- and postsynaptic areas. × 29 000



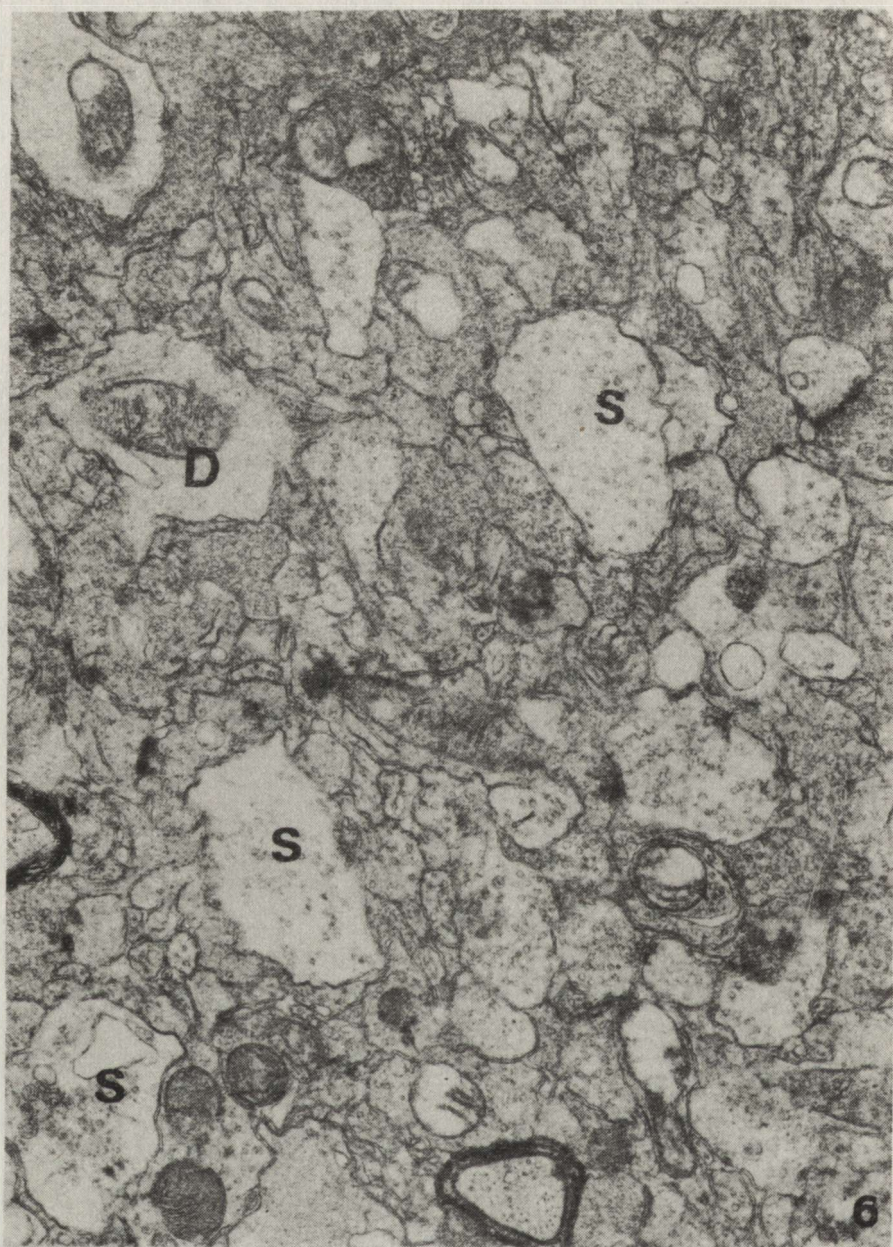
Ryc. 4. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Obrzmiały interneuron z wypustkami (I). W cytoplazmie widoczne obrzmiałe mitochondria (M), polimorficzne lizosomy i włókniste elementy cytoskeletonu. Synapsy znajdujące się na perykarionie interneuronu oraz w neuropilu wykazują prawidłową ultrastrukturę. Pow. 12 500 ×

Fig. 4. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Swollen interneuron with processes (I). Swollen mitochondria (M), polymorphic lysosomes and abundant cytoskeleton elements are present in the cytoplasm. Synapses on interneuron body and in neuropil show normal ultrastructure. × 12 500



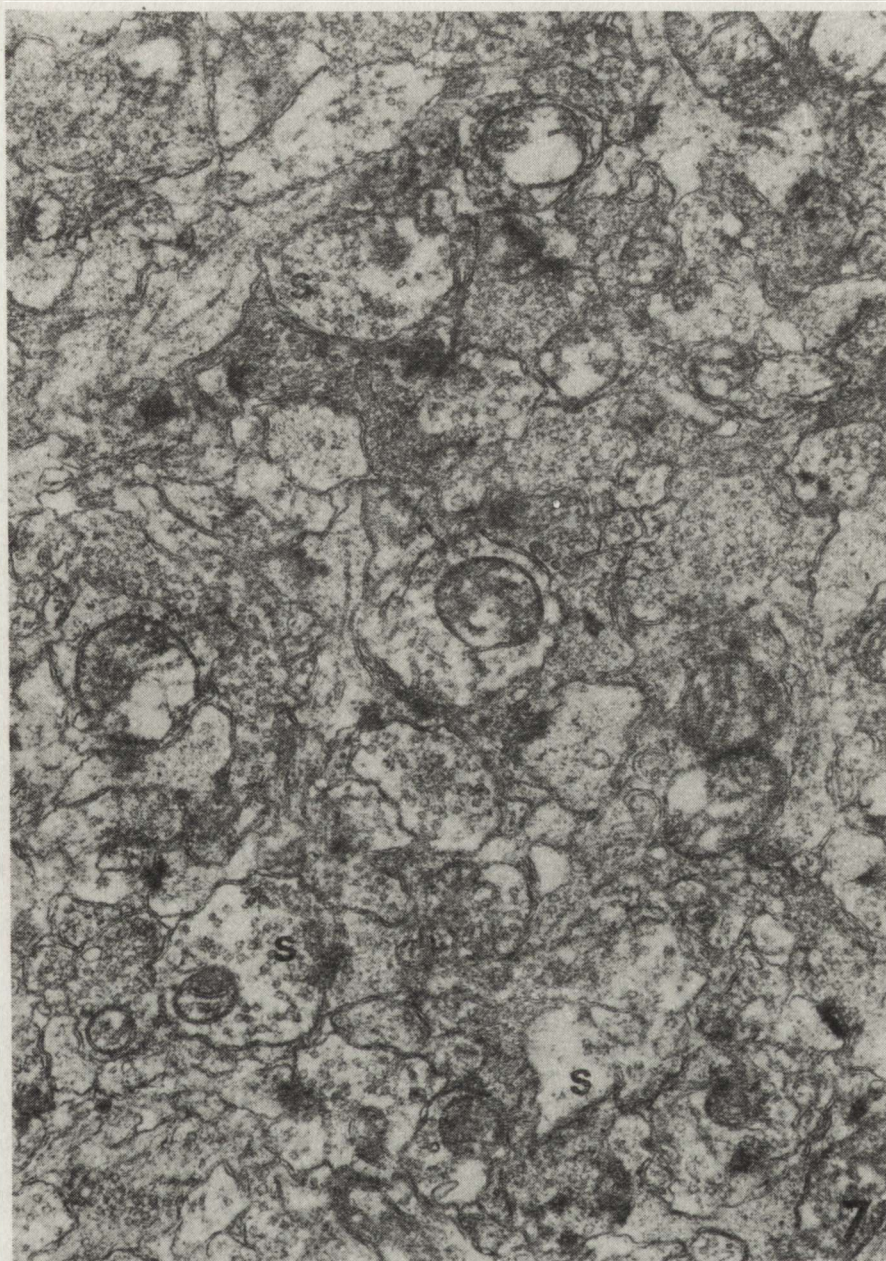
Ryc. 5. I grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Obrzmiałe wypustki astrocytarne (A) zaciskające światło naczyń. W neuropilu widoczne obrzmiałe dendryty (D). Synapsy o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym. Pow. 12 500 ×

Fig. 5. I experimental group. *Stratum pyramidale*. Swollen astrocytic processes (A) are present in perivascular area. Swollen dendrites (D) are visible in neuropil. Synapses with normal ultrastructure. × 12 500



Ryc. 6. I grupa doświadczalna. *Stratum oriens*. Niektóre kolbki presynaptyczne obrzmiałe (S) z niewielką ilością pęcherzyków synaptycznych i elektronowo-pustymi wakuolami. Pojedyncze obrzmiałe dendryty (D). Pow. 22 500 ×

Fig. 6. I experimental group. *Stratum oriens*. Some swollen presynaptic boutons containing small number of synaptic vesicles and electron-lucent vacuoles (S). Some swollen dendrites (D) are visible. × 22 500



Ryc. 7. I grupa doświadczalna. *Stratum oriens*. Widoczne różnego stopnia obrzmienie pojedynczych kolbek presynaptycznych (S) położonych wśród synaps o niezmięnionej ultrastrukturze.
Pow. 29 000 ×

Fig. 7. I experimental group. *Stratum oriens*. Some presynaptic boutons with varying degree of swelling (S) are visible between normal synapses. × 29 000

pojawianiu się elektronowo-przeziernych wakuoli (ryc. 6 i 7). Większość występujących połączeń synaptycznych nie wykazuje jednak zmian ultrastrukturalnych. Poza tym obserwuje się podobnie jak w *stratum pyramidale* znaczne obrzmienie okółonaczeniowych wypustek astrocytów.

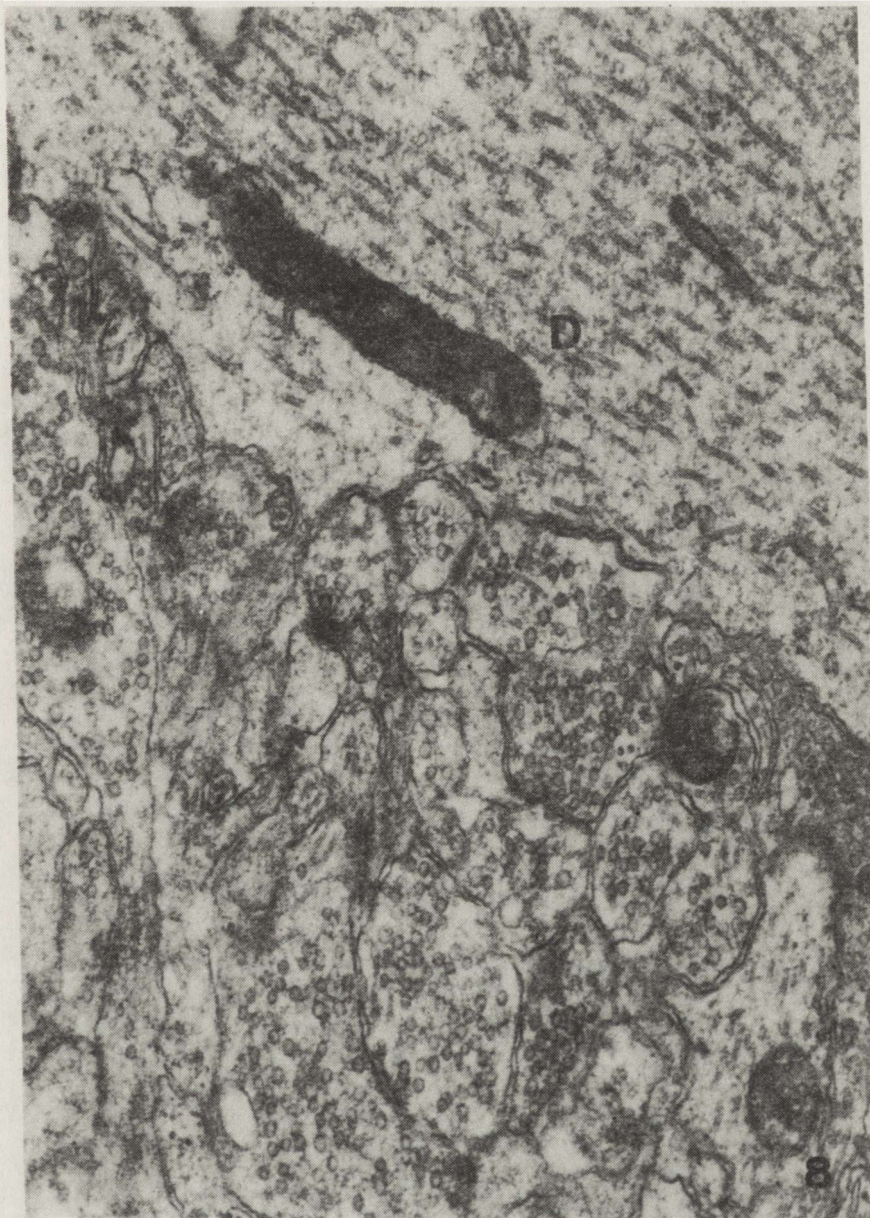
3. *Stratum radiale*. Warstwa ta, zbudowana ze szczytowych dendrytów neuronów piramidowych, zawiera także nieliczne zakończenia synaptyczne należące do kolaterali Schaffera, interneuronów oraz włókien pochodzących z zakrętu zębatego. Wszystkie obserwowane w tej warstwie synapsy wykazują niezmienną ultrastrukturę zarówno w odcinkach pre-, jak postsynaptycznych (ryc. 8). Niekiedy tylko w poszczególnych synapsach obserwuje się obecność pojedynczych, obrzmiatych mitochondriów (ryc. 9).

4. *Stratum lacunosum-moleculare*. W warstwie tej na dendrytach wierzchołkowych neuronów piramidowych obecne są zakończenia włókien spoidłowych, kolaterali Schaffera oraz interneuronów. Interneurony tworzą również pomiędzy sobą synapsy „en passant”. Większość obserwowanych synaps w odcinku presynaptycznym zarówno na dendrytach, jak również w neuropilu, wykazuje znaczne obrzmienie. Aksoplazma ich jest jasna, ilość pęcherzyków synaptycznych występujących przeważnie w skupieniach jest mniejsza; pojedyncze mitochondria są obrzmiate. Dotyczy to zarówno synaps typu symetrycznego, jak i asymetrycznego. Zachowany jest jednak ścisły kontakt pomiędzy odcinkiem pre- i postsynaptycznym (ryc. 10). W warstwie tej spotyka się także obrzmiate, okółonaczeniowe wypustki astrocytarne.

5. *Stratum moleculare*. Oprócz wyżej podanych struktur morfologicznych wchodzących w skład *stratum lacunosum-moleculare* znajdują się tu dodatkowo zakończenia włókien nerwowych pochodzących z kory entorynalnej. Obrazy ultrastrukturalne synaps nie różnią się od opisanych powyżej. Oprócz synaps o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej, wiele synaps wykazuje cechy znacznego obrzmienia (ryc. 11).

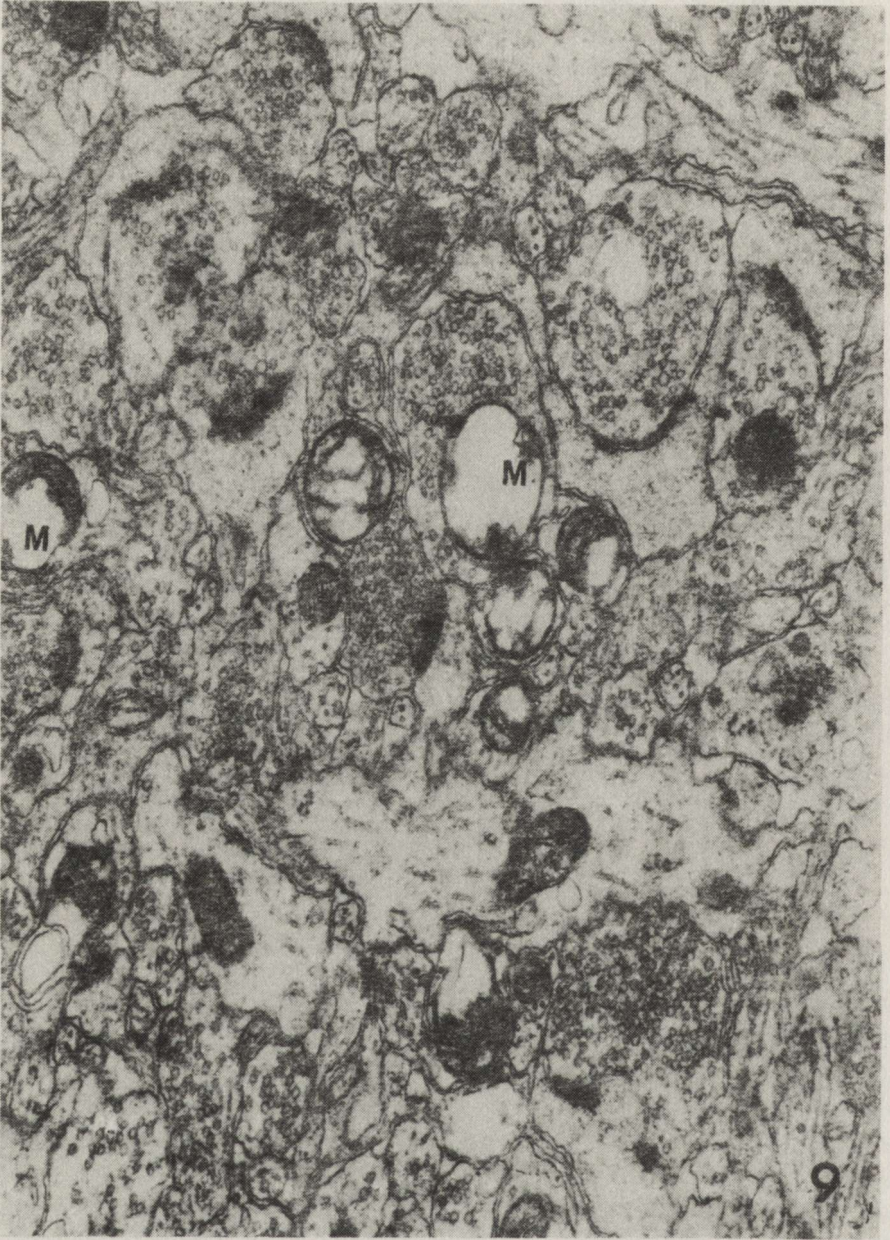
II Grupa doświadczalna (24 godz. po niedokrwieniu)

1. *Stratum pyramidale*. Pojedyncze neurony piramidowe wykazują w tym okresie cechy morfologiczne sugerujące ich wzmożoną aktywność. Cechuje je obecność obfitej siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i dobrze rozwiniętego kompleksu Golgiego oraz liczne mitochondria, lizosomy i polirybosomy. Obficie występują również włókniste elementy cytoskeletonu. Na perykariach komórek oprócz ultrastrukturalnie niezmiennych synaps, występują również synapsy o przejaśnionej aksoplazmie (ryc. 12). Stosunkowo liczne neurony piramidowe wykazują jednakże zaawansowane nieprawidłowości obrazu mikroskopowo-elektronowego. Występują one przede wszystkim w obszarze cytoplazmy. Obserwuje się tu dezintegrację siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i polirybosomów. Pojawiają się także małe skupiska elektronowo-gęstego nieobłonionego, ziarnistego materiału identyfikowanego ze złogami wapnia. Mitochondria w tak zmienionych neuronach mają na ogół prawidłową budowę, niektóre tylko wykazują cechy obrzmienia (ryc. 13). Synapsy



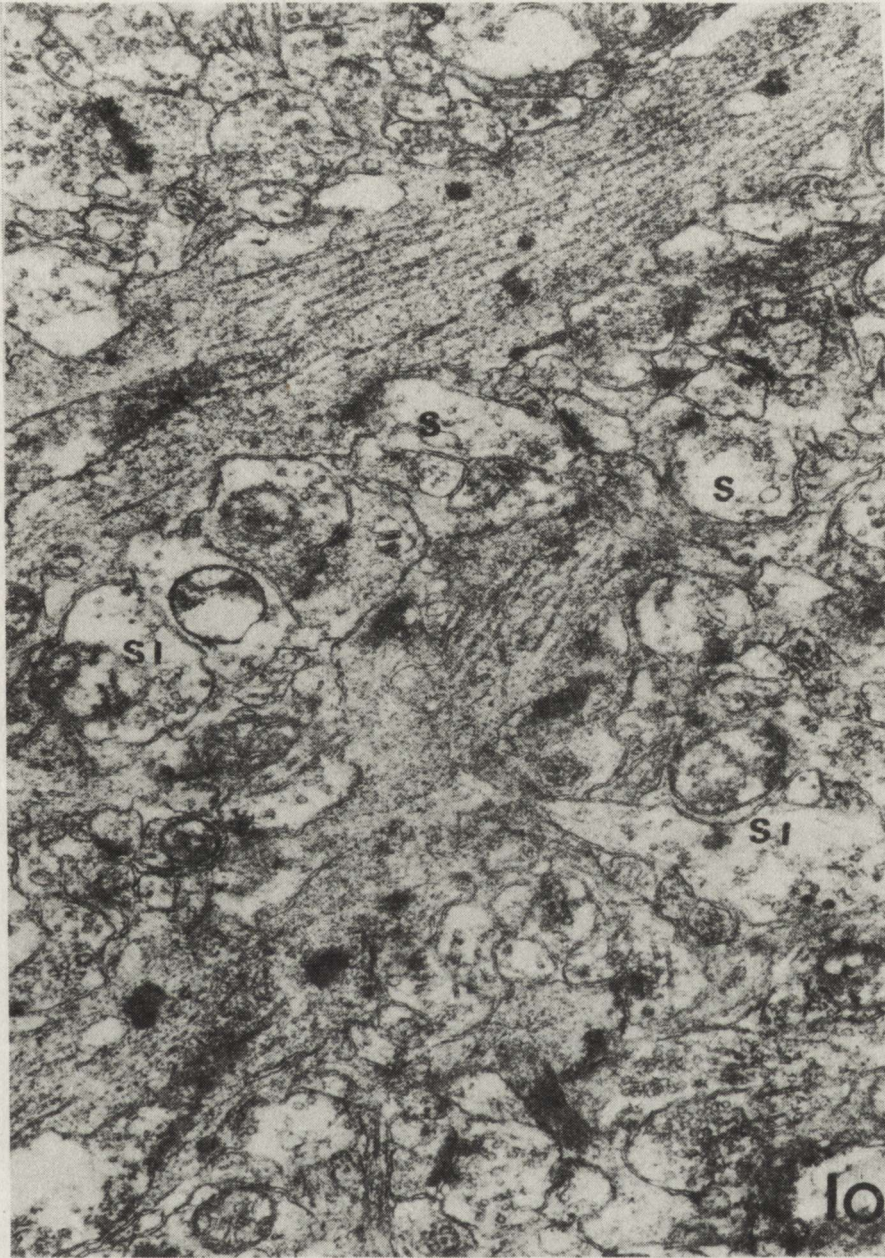
Ryc. 8. I grupa doświadczalna. *Stratum radiale*. Fragment dendrytu szczytowego (D) neuronu piramidowego o prawidłowej budowie oraz neuropil składający się z synaps ultrastrukturalnie niezmiennych. Pow. 45 000 ×

Fig. 8. I experimental group. *Stratum radiale*. Fragment of apical dendrite (D) of pyramidal neuron revealing entirely normal ultrastructure. Unchanged synapses are present in neuropil. × 45 000



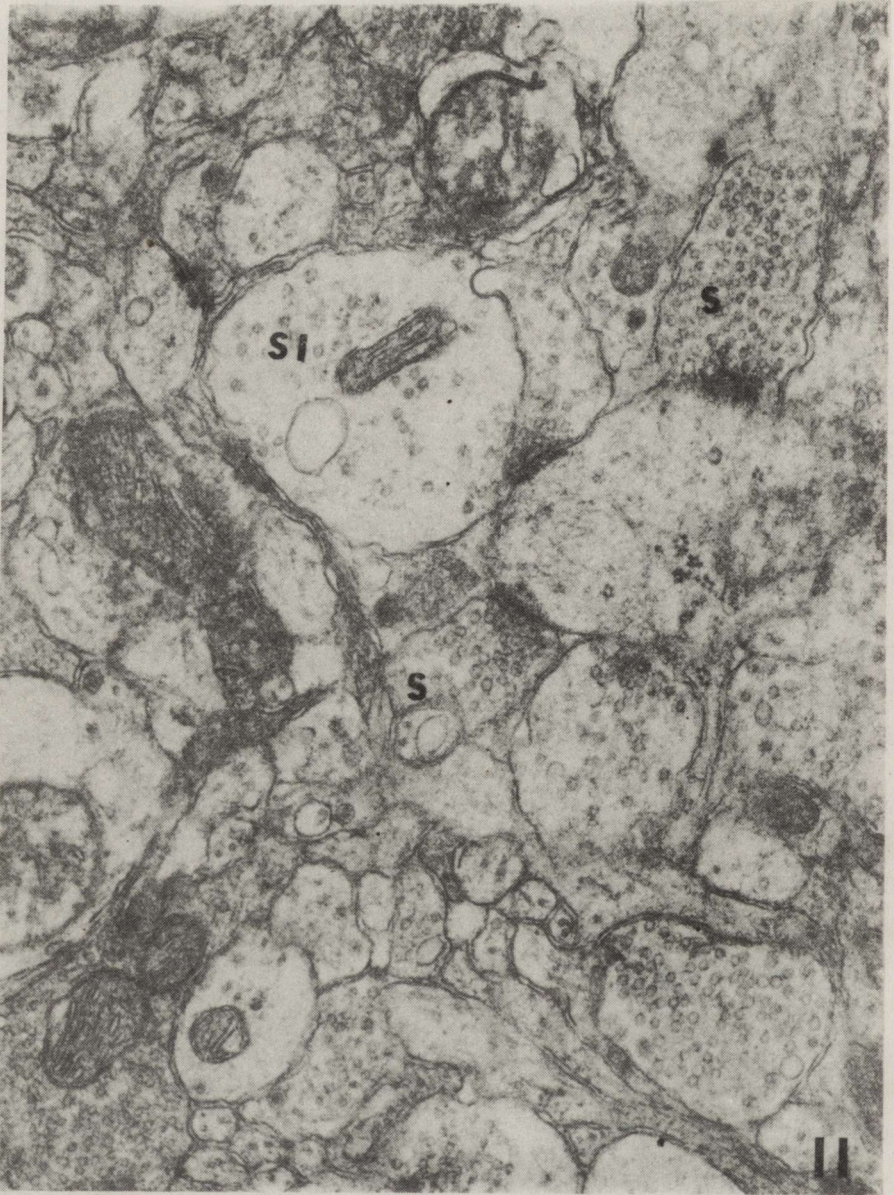
Ryc. 9. I grupa doświadczalna. *Stratum radiale*. W neuropilu widoczne synapsy z obrzmiałymi pojedynczymi mitochondriami (M). Pow. 37 500 ×

Fig. 9. I experimental group. *Stratum radiale*. Synapses occasionally containing swollen mitochondria (M) are visible in neuropil. ×37 500



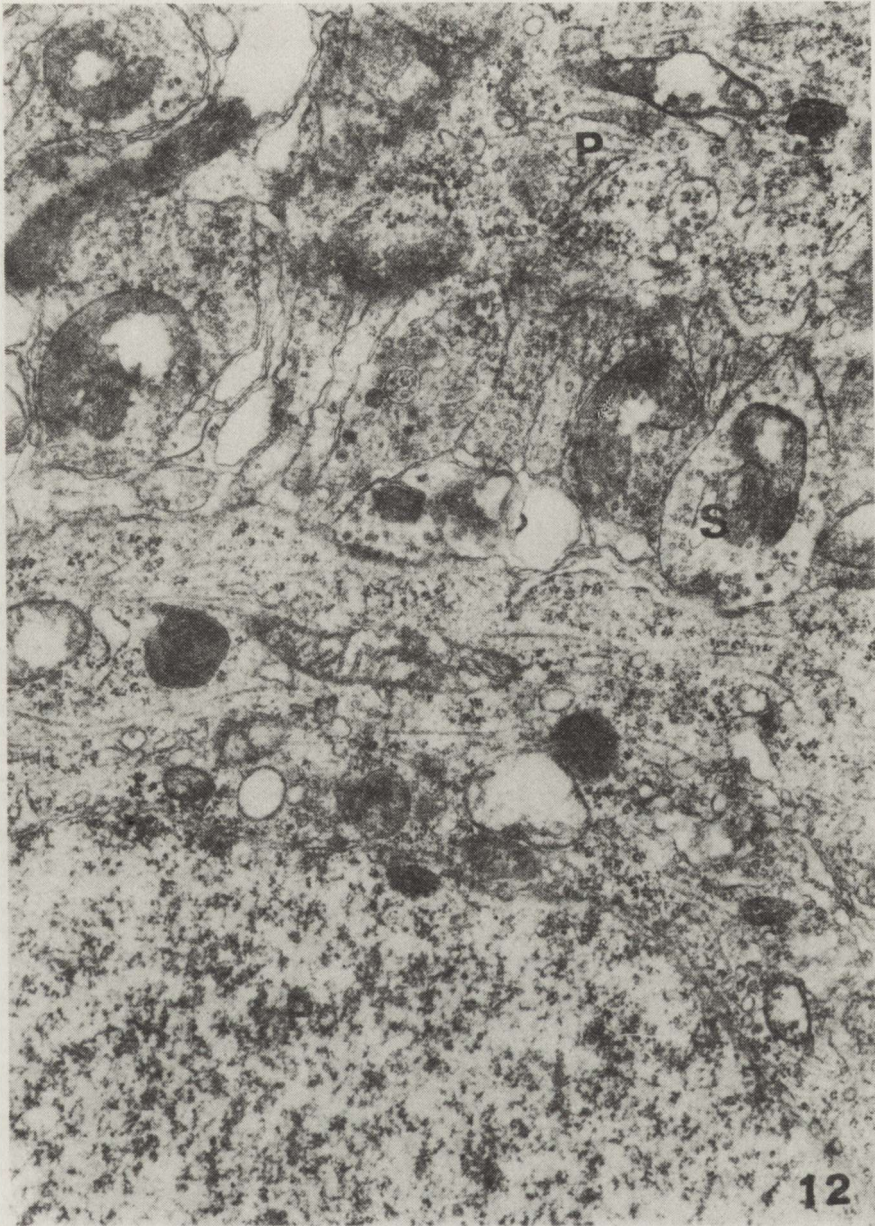
Ryc. 10. I grupa doświadczalna. *Stratum lacunosum-moleculare*. Widoczne połączenia akso-dendrytyczne (S) oraz akso-aksonalne (SI). Niektóre wykazują obrzmienie w częściach presynaptycznych. Pow. 36 000 ×

Fig. 10. I experimental group. *Stratum lacunosum-moleculare*. Axo-dendritic (S) and axo-axonal (SI) synapses are visible. Some of them show swelling in presynaptic areas. × 36 000



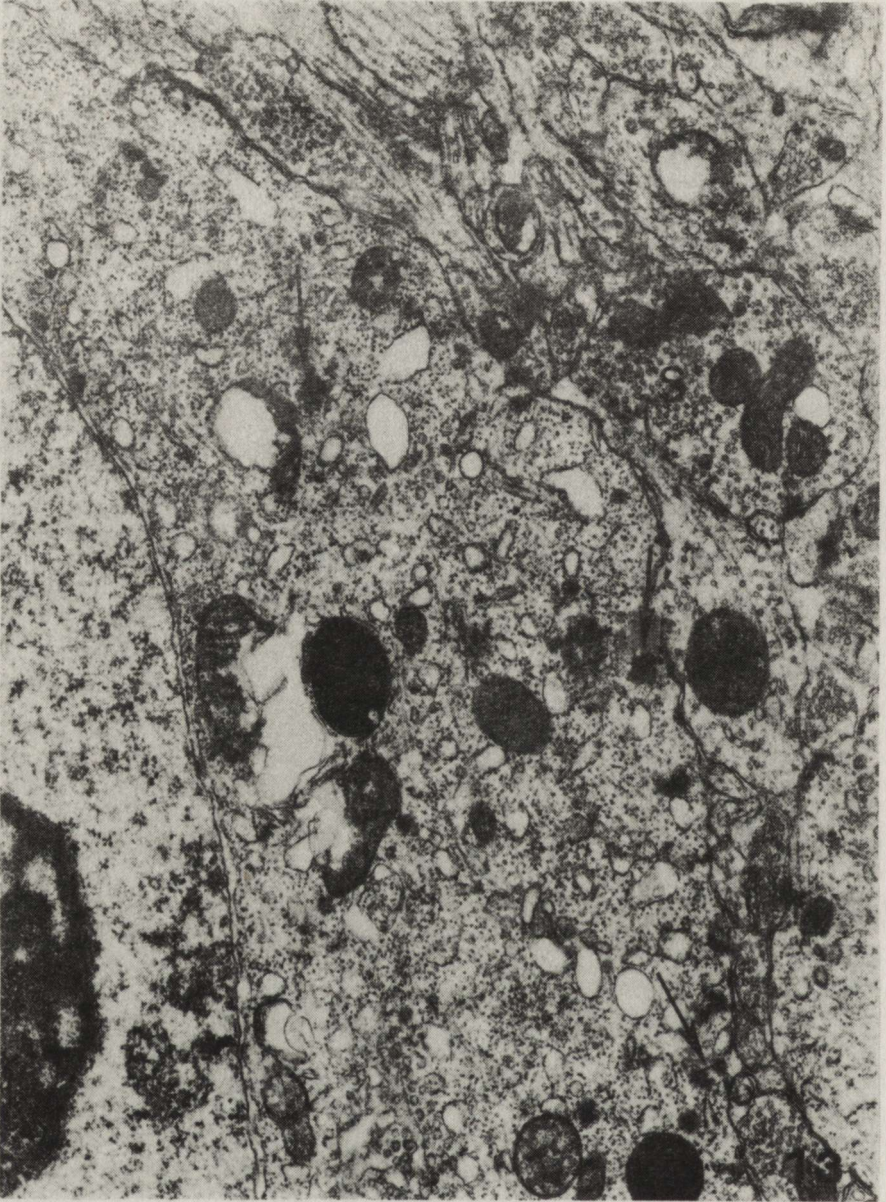
Ryc. 11. I grupa doświadczalna. *Stratum moleculare*. W neuropilu widoczne są asymetryczne synapsy akso-dendrytyczne o prawidłowej w większości ultrastrukturze (S) lub obrzmiałe w części presynaptycznej (S_1). Pow. 52 500 \times

Fig. 11. I experimental group. *Stratum moleculare*. Asymmetric axo-dendritic synapses with predominantly normal ultrastructure (S) and some swollen in presynaptic parts (S_1) are visible in neuropil. $\times 52\ 500$



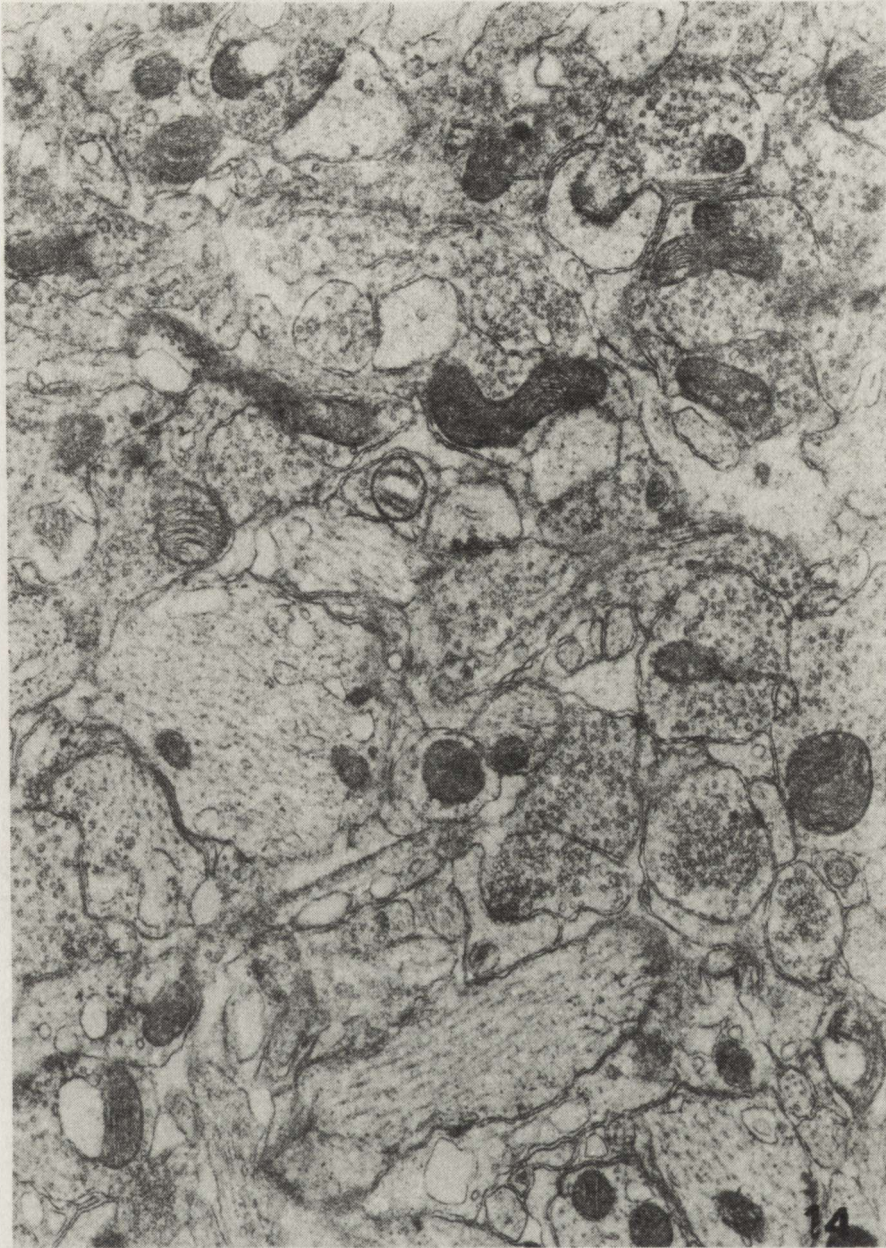
Ryc. 12. II grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragmenty dwóch neuronów piramidowych (P). Pomiędzy nimi zawarte są synapsy ze zróżnicowaną zawartością pęcherzyków (S). Pow. 25 000 ×

Fig. 12. II experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragments of two pyramidal neurons (P) with synapses located between them. Note varying content of synaptic vesicles (S). ×25 000



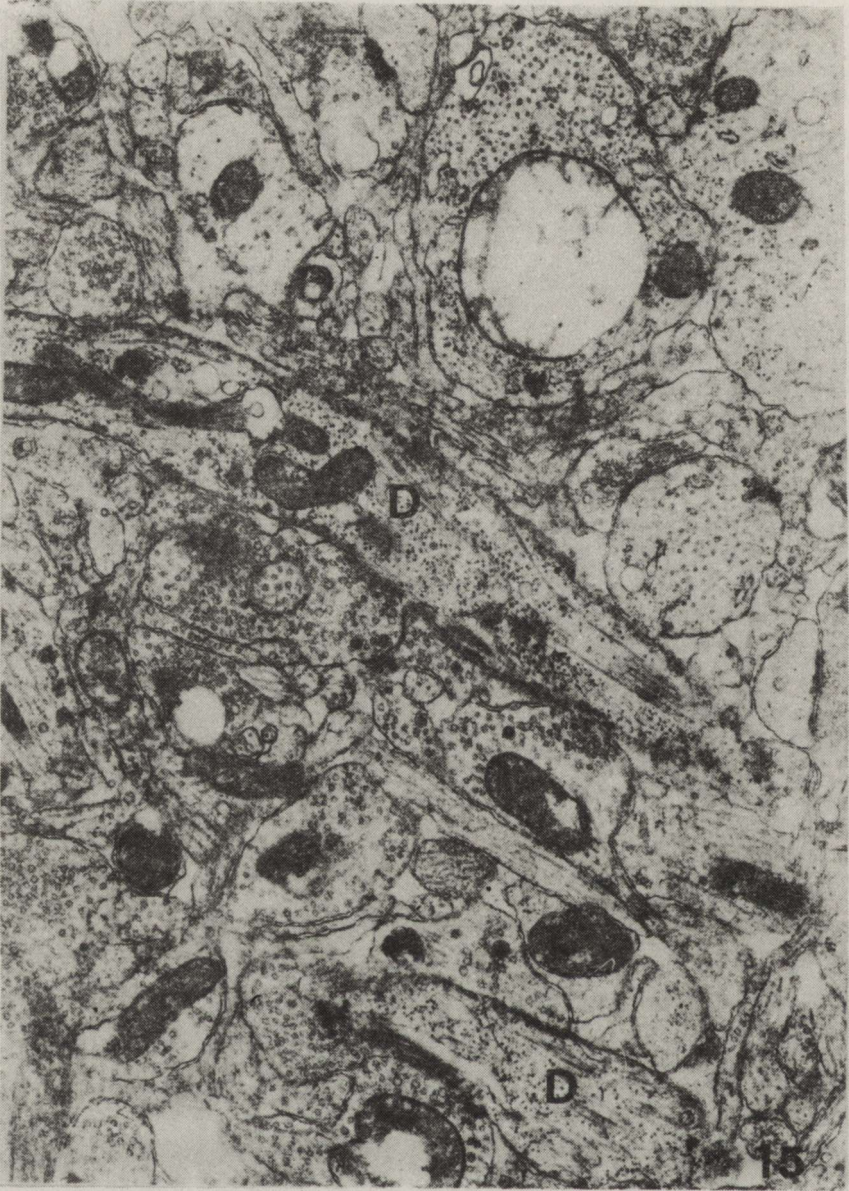
Ryc. 13. II grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment zmienionego neuronu piramidowego. W cytoplazmie widoczna dezintegracja siateczki śródplazmatycznej ziarnistej i polirybosomów. Strzałki pokazują skupienia materiału elektronowo-gęstego. Synapsy (S) o prawidłowej ultrastrukturze. Pow. 25 000 ×

Fig. 13. II experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragment of altered pyramidal neuron. Disintegration of granular endoplasmic reticulum and polyribosomes. Arrows point to aggregation of electron dense material. Synapses (S) with normal ultrastructure. × 25 000



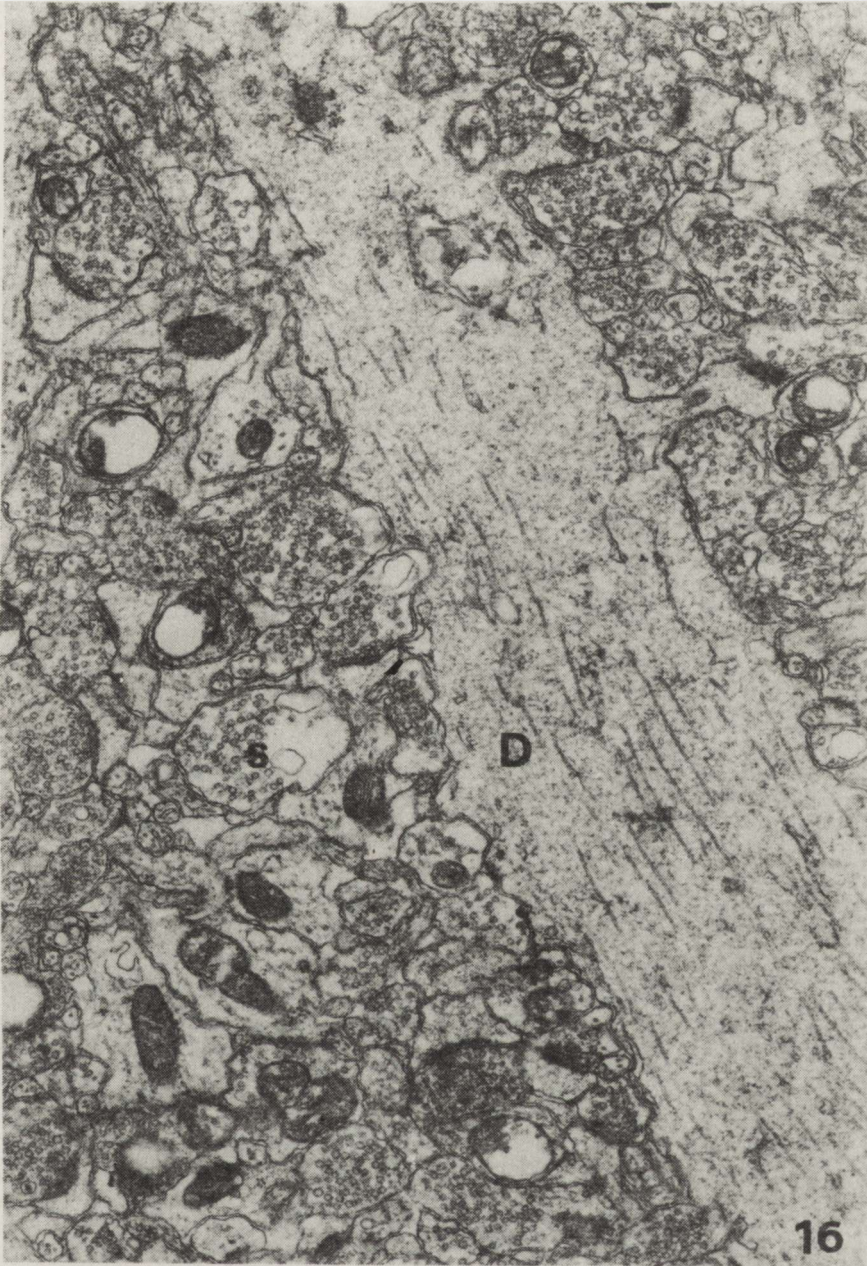
Ryc. 14. II grupa doświadczalna. *Stratum pyramidale*. Fragment neuropilu o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym połączeń akso-dendrytycznych i pozostałych elementów tkankowych. Pow. 25 000 ×

Fig. 14. II experimental group. *Stratum pyramidale*. Fragment of neuropil exhibiting normal ultrastructure of both axo-dendritic synapses as well as other tissue elements. × 25 000



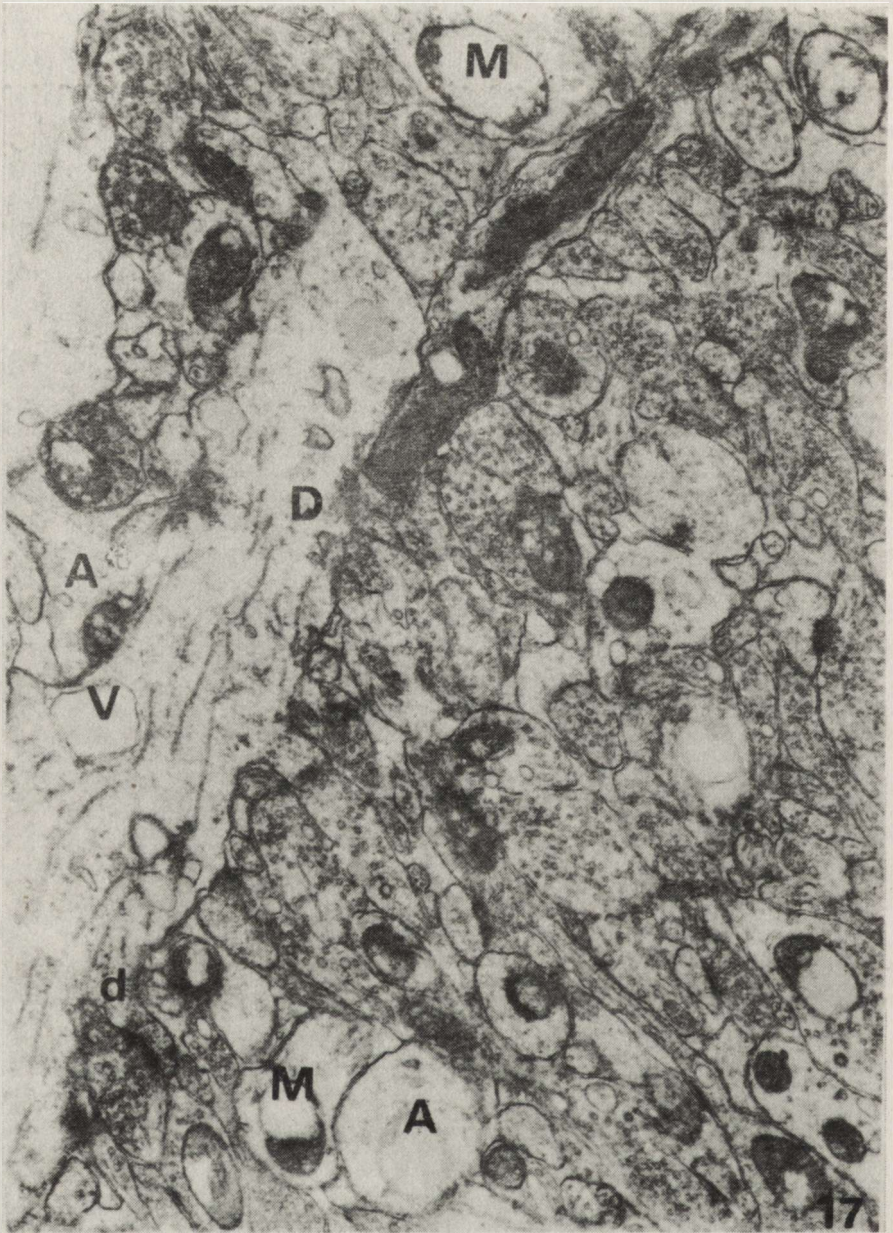
Ryc. 15. II grupa doświadczalna. *Stratum oriens*. Na podłużnych i poprzecznych przekrojach dendrytów podstawnych neuronów piramidowych (D) widoczne są obrzmiałe mitochondria oraz liczne rybosomy. Synapsy wykazują prawidłową ultrastrukturę. Pow. 25 000 ×

Fig. 15. II experimental group. *Stratum oriens*. Longitudinal and transverse profiles of basic dendrites (D) of pyramidal neurons exhibiting swollen mitochondria and abundant ribosomes. Synapses unchanged. × 25 000.



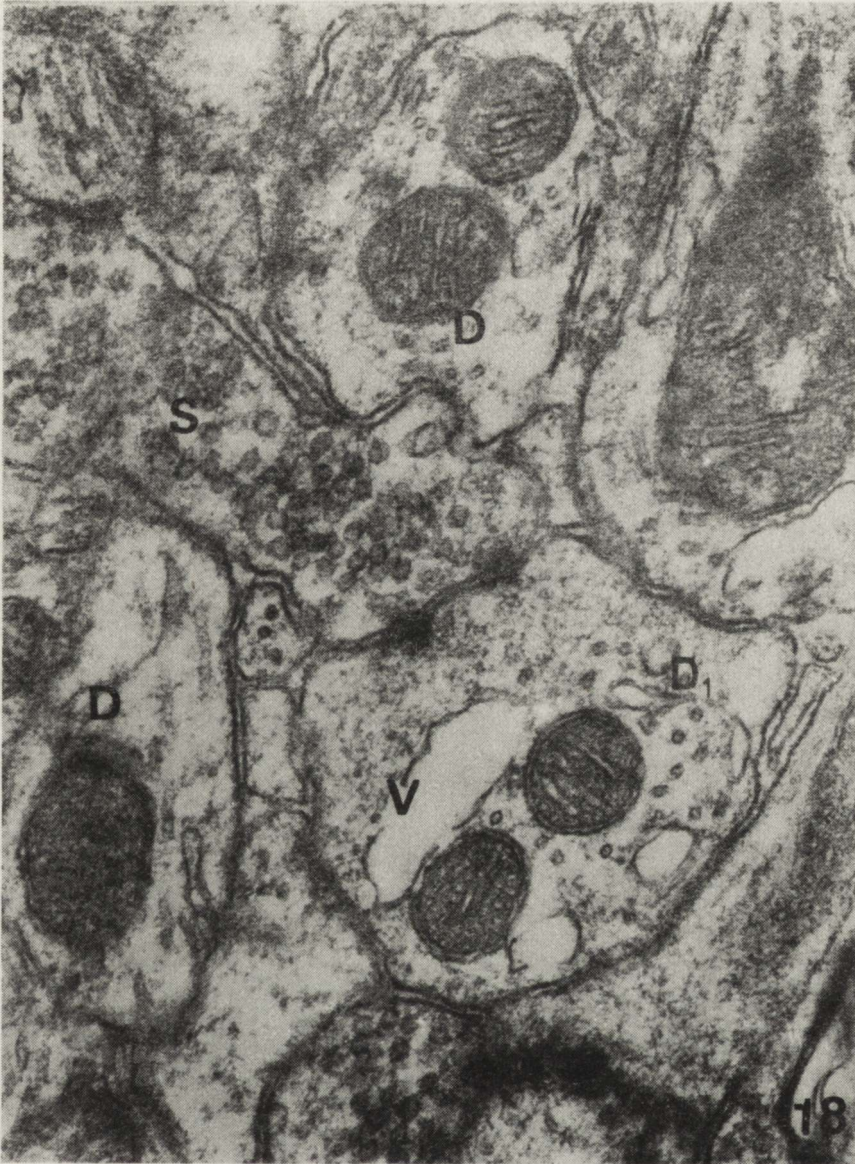
Ryc. 16. II grupa doświadczalna. *Stratum radiale*. Dendryt szczytowy neuronu piramidowego (D). Synapsy w neuropilu w większości wykazują prawidłową ultrastrukturę. Niektóre z nich (S) wykazują cechy obrzmienia. Pow. 25 000 ×

Fig. 16. II experimental group. *Stratum radiale*. Apical dendrite (D) of pyramidal neuron. Majority of synapses on dendrite are normal. Occasional synapses in neuropil exhibiting considerable swelling (S). × 25 000



Ryc. 17. II grupa doświadczalna. *Stratum lacunosum-moleculare*. W neuropilu widoczne są obrzmiałe wypustki astrocytów (A) oraz obrzmiałe dendryty (D). W ich cytoplazmie występują elektronowo-przeźierne wakuole (V) bądź obrzmiałe mitochondria (M). Na kolcach dendrytycznych (d) oraz w neuropilu obecne są niezmiennione kolbki presynaptyczne. Pow. 25 000 ×

Fig. 17. II experimental group. *Stratum lacunosum-moleculare*. Swollen astrocytic processes (A) and dendrites (D) are visible in neuropil. Electron-lucent vacuoles (V) and swollen mitochondria (M) are present in their cytoplasm. Unchanged axo-spinal synapses (d) are present in neuropil. × 25 000



Ryc. 18. II grupa doświadczalna. *Stratum moleculare*. Widoczne dwa przekroje poprzeczne dendrytów o prawidłowej ultrastrukturze (D) oraz jeden zmieniony (D₁) z przejaśnioną cytoplazmą zawierającą wakuole (V). Wchodzące z nim w kontakt kolbki synaptyczne (S) nie wykazują nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Pow. 75 000 ×

Fig. 18. II experimental group. *Stratum moleculare*. Two transverse profiles of dendrites (D) with normal ultrastructure and one (D₁), exhibiting electron-lucent cytoplasm. Some vacuoles (V) are visible. Note ultrastructurally unchanged synapses (S). × 75 000

obecne w tej warstwie w większości zachowują prawidłowy obraz ultrastrukturalny. Przeważnie zawierają one dużą ilość pęcherzyków synaptycznych (ryc. 14). Interneurony w tym okresie nie wykazują nieprawidłowości ultrastrukturalnych.

2. *Stratum oriens*. Wiele zawartych w tej warstwie dendrytów podstawnych neuronów piramidowych charakteryzuje się nagromadzeniem dużych, obrzmiałych mitochondriów, znaczną ilością luźno leżących pojedynczych rybosomów oraz obecnością figur mielinowych. Większość synaps tej warstwy wykazuje prawidłową ultrastrukturę. Część z nich odznacza się zwiększoną ilością pęcherzyków synaptycznych (ryc. 15).

3. *Stratum radiale*. W większości obserwowanych w tej warstwie synaps jedyną spotykaną nieprawidłowością jest obecność obrzmiałych mitochondriów oraz zmienna ilość pęcherzyków synaptycznych (ryc. 16). Poza tym synapsy wykazują prawidłowy obraz ultrastrukturalny.

4. *Stratum lacunosum-moleculare*. Oprócz dendrytów o prawidłowym obrazie ultrastrukturalnym obecne są tu stosunkowo liczne obrzmiałe dendryty o elektronowo-przeziernym cytoplazmie z licznymi wakuolami. Charakteryzują je przy tym dobrze zachowane elementy cytoskeletonu.

Niektóre z widocznych w nich mitochondriów wykazują cechy obrzmienia. Charakterystyczne dla tej okolicy liczne niesymetryczne synapsy aksonalno-kolcowe wykazują prawidłową ultrastrukturę, nawet w tych przypadkach, gdy kolce związane są z nieprawidłowymi dendrytami. Podobnie, pozostałe kontakty synaptyczne widoczne w tej warstwie nie wykazują mikroskopowo-elektronowych nieprawidłowości. Zwraca uwagę natomiast obecność obrzmiałych wypustek astrocytarnych (ryc. 17).

5. *Stratum moleculare*. W warstwie tej, podobnie jak w poprzedniej, wśród dendrytów o prawidłowej budowie spotyka się dendryty wykazujące cechy obrzmienia. Charakteryzują się one przejaśnioną cytoplazmą oraz występowaniem elektronowo-przeziernych wakuoli, a także obecnością znacznie obrzmiałych mitochondriów. Kolbki presynaptyczne spotykane w tej warstwie nawet wówczas gdy wytwarzają kontakty ze zmienionymi dendrytami nie wykazują nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Niekiedy tylko zawierają pojedyncze, nieco obrzmiałe mitochondria (ryc. 18).

OMÓWIENIE

Obserwacje mikroskopowo-elektronowe pozwoliły na stwierdzenie, że krótkotrwałe 7,5 minutowe pełne niedokrwienie przodomózgowia u chomików mongolskich powoduje pojawienie się nieprawidłowości ultrastrukturalnych we wszystkich warstwach kory sektora CA₁ zakrętu hipokampa we wczesnym okresie poniedokrwinnym. W zależności jednak od czasu dokonywanych obserwacji po przeprowadzeniu doświadczenia można prześledzić różnice charakteru i nasilenia pojawiających się odchyień od stanu prawidłowego.

W najwcześniejszym okresie obserwacji, to jest w 12 godz. po niedokrwie-

niu, neurony piramidowe wykazywały minimalne zmiany, wyrażające się w niektórych spośród nich zwiększeniem liczebności lizosomów, a niekiedy również obecnością elektronowo przeziernych wakuoli, zarówno w ich cytoplazmie perykaryalnej, jak i w dendrytach. Natomiast znaczna część interneuronów widocznych w warstwie piramidowej wykazywała cechy obrzmienia o zróżnicowanym nasileniu. Większość synaps w poszczególnych warstwach odcinka CA₁ nie wykazywała istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Dotyczyło to zwłaszcza warstwy komórek piramidowych oraz *stratum oriens* i *pyramidale*. Jednakże i w nich spotykało się nieliczne zarówno symetryczne, jak i niesymetryczne synapsy z cechami obrzmienia, zawierające nieregularne skupienia pęcherzyków o zmniejszonej liczebności oraz obrzmiałe mitochondria. W *stratum lacunosum-moleculare* natomiast, a w mniejszym stopniu w warstwie drobinowej, większość synaps znajdujących się na dendrytach szczytowych komórek piramidowych wykazywała znacznego stopnia obrzmienie kolbek presynaptycznych z zaburzonym rozkładem i liczebnością pęcherzyków synaptycznych. Cechą znamioną wszystkich warstw sektora CA₁ w tym okresie poniedokrwinnym było obrzmienie cytoplazmy astrocytów, a zwłaszcza ich wypustek okołonaczyniowych.

Po upływie 24 godz. od niedokrwienia większość synaps we wszystkich warstwach odcinka CA₁ wykazywała prawidłowy obraz ultrastrukturalny. Dotyczyło to w szczególności kolbek presynaptycznych, obficie wypełnionych pęcherzykami synaptycznymi. Sporadycznie jedynie spotykano nieznacznie obrzmiałe kolbki presynaptyczne, a nieco częściej kolbki zawierające pojedyncze obrzmiałe mitochondria.

Wyraźne zmiany natomiast dotyczyły stosunkowo licznych piramidowych komórek nerwowych. Były one dwojakiego rodzaju. Część neuronów charakteryzowała się dezintegracją ziarnistej siateczki śródplazmatycznej i polirybosomów oraz odkładaniem się drobnoziarnistych złogów nieobłonionego, elektronowo gęstego materiału, identyfikowanego z wapniem. Obok tak zmienionych komórek piramidowych, występowały neurony z wyraźnymi cechami hiperaktywności z obfitą siateczką śródplazmatyczną ziarnistą, dobrze rozwiniętym kompleksem Golgiego i licznymi układami polirybosomów. Niekiedy w perykarionach i dendrytach tych neuronów obecne były pojedyncze elektronowo-przeziernie wakuole. Opisane zmiany spostrzegano również w dendrytach podstawnych komórek piramidowych, zawartych w *stratum oriens*, jak i w ich dendrytach szczytowych rozgałęziających się w pozostałych warstwach kory.

W przeciwieństwie do wcześniejszego okresu obserwacji, komórki nerwowe sektora CA₁, identyfikowane jako interneurony nie wykazywały żadnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Obrzmienie okołonaczyniowych wypustek astrogleju charakteryzowało znaczne zróżnicowanie nasilenia.

Mechanizm zjawiska określonego nazwą opóźnionej śmierci neuronów, występującego wybiórczo w odcinku CA₁ zakrętu hipokampa, nie jest wyjaśniony. Przypuszcza się, że nieodwracalne uszkodzenie komórek piramidowych

tego obszaru stanowi nie tyle następstwo niedokrwienia tkanki, ile efekt ekscytotoksycznego działania aminokwasowych neurotransmiterów, wyzwolonego przez incydent niedokrwienno (Olney 1978; Pulsinelli 1985; Suzuki i wsp. 1985; Mossakowski i wsp. 1986). Związana z tym czynnościowa hiperaktywność neuronów występująca we wczesnym okresie po niedokrwieniu stanowi czynnik sprzyjający dkomórkowemu napływowi jonów wapnia (Harris i wsp. 1981; Simon i wsp. 1984), prowadzącemu do zaburzenia przemian metabolicznych kończących się śmiercią komórki (Siesjö 1981). Na ewentualny udział jonów wapnia w patomechanizmie tego typu uszkodzeń komórek piramidowych sektora CA₁ wskazują również korzystne wyniki z zastosowaniem czynników blokujących błonowe kanały wapniowe (Mossakowski, Gadamski 1987).

Przyjęcie koncepcji udziału ekscytotoksycznych neuromediatorów aminokwasowych w mechanizmie wybiórczych uszkodzeń neuronów piramidowych sektora CA₁ zwraca uwagę na charakter i stan ich aparatu synaptycznego. Jest faktem znanym iż neurony sektora CA₁ hipokampa otrzymują bogatą inerwację glutaminergiczną, pochodzącą między innymi z kolaterali Schaffera rozpoczynających się w komórkach piramidowych sektora CA₃ (Olney 1978; Wieraszko 1983). Stwierdzono ponadto, że wiele synaps w odcinku CA₁ hipokampa zawiera liczne neuropeptydy takie jak wazoaktywny polipeptyd jelitowy (VIP), cholecystokinina (CCK), substancja P, somatotensyna oraz metionina-enkefalina. Wszystkie te synapsy wywierają działanie pobudzające na neurony piramidowe (Kelly, Dodd 1981; Roberts i wsp. 1984; Harris i wsp. 1985; Nunzi i wsp. 1985). Oprócz synaps o charakterze pobudzającym na powierzchni neuronów piramidowych znajdują się synaptyczne zakończenia hamujące, pochodzące przede wszystkim od komórek koszyczkowych (Andersen i wsp. 1963). Istnieje również wiele danych wskazujących, że interneurony rozsiiane z różną liczebnością we wszystkich warstwach odcinka CA₁ hipokampa, w których wykazano obfitą zawartość kwasu gamma-aminomasłowego (GABA), spełniają nadrzędną hamującą kontrolę nad populacją (a przynajmniej znaczną jej częścią) komórek piramidowych (Ribak i wsp. 1978; Frotscher i wsp. 1984).

Z obserwacji naszych wynika, iż większość synaps w odcinku CA₁ hipokampa we wczesnym okresie po niedokrwieniu, nie wykazuje istotnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Na uwagę zasługuje jednakże fakt, iż stosunkowo mało nasilone w ogólnym obrazie zmiany dotyczyły w największej mierze *stratum lacunosum-moleculare* oraz *stratum moleculare*. Są to te warstwy kory odcinka CA₁, w których znajduje się największe zagęszczenie glutaminergicznych zakończeń synaptycznych kolaterali Schaffera (Andersen i wsp. 1966). Na podstawie naszych badań nie można wiązać obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps z ich stanem czynnościowym. Stwierdzone obrzmienia kolbek synaptycznych, zmiany liczebności i rozmieszczenia pęcherzyków mogą bowiem w równej mierze odzwierciedlać zmiany czynności neurotransmisyjnych, jak i zaburzenia przepuszczalności błon zakończeń aksonalnych, stano-

wiące następstwo niedokrwienia. Za taką interpretacją mogłyby przemawiać współistniejące niekiedy nieprawidłowości w obrazie mitochondriów. Zmiany przepuszczalności błon w synapsach w przypadkach niedokrwienia mózgu opisywano w korze odcinka CA₁ u szczurów przy zastosowaniu peroksydazy chrzanowej (Diemer, Ekström von Lubitz 1983). Dotyczyły one jednak głównie błon postsynaptycznych, a tylko w nieznacznym stopniu kolbek presynaptycznych i odnosiły się do wcześniejszych niż w naszych badaniach okresów po niedokrwieniu.

W spostrzeżeniach naszych odnoszących się do obrazu synaps odnotować trzeba również ewolucję zmian w okresie między 12 i 24 godz. po niedokrwieniu. W okresie wcześniejszym opisane nieprawidłowości w *stratum lacunosum-moleculare*, a po części również w warstwie drobinowej ograniczały się przede wszystkim do kolbek presynaptycznych, a znacznie mniej dotyczyły części postsynaptycznych. Obraz zakończeń presynaptycznych ulegał niemal całkowitej normalizacji w 24 godzinie okresu postischemicznego. W tym czasie natomiast w obu wspomnianych warstwach pojawiły się zmiany w obrazie rozgałęzień szczytowych dendrytów komórek piramidowych. Wzorzec zmian przypominał tu nieprawidłowości opisywane w następstwie działania pobudzającego swoistych neurotoksyn, typu kwasu chinolinowego (Schwarcz i wsp. 1983).

Odrębnego omówienia wymaga zachowanie się interneuronów sektora CA₁ w badanym materiale. Obserwacje prowadzone w 12 godz. po niedokrwieniu wykazywały obecność znacznie obrzmiałych interneuronów. Ich obraz mikroskopowo-elektronowy ulegał normalizacji po upływie dalszych 12 godz. Można przypuszczać, że stwierdzone we wczesnym okresie poniedokrwieniowym zmiany towarzyszyły zaburzeniom funkcji interneuronów, wyrażającym się ich okresową niewydolnością, prowadzącą w konsekwencji do upośledzenia hamującej inervacji neuronów piramidowych.

Obraz ultrastrukturalny interneuronów i jego ewolucja sugeruje odwracalność stwierdzonych nieprawidłowości. Wczesne zmiany interneuronów (obrzemie cytoplazmy, mitochondriów oraz synaps w odcinkach presynaptycznych) są typowe dla niedokrwieniowego uszkodzenia komórek nerwowych. Być może odzwierciedlają one zaburzenia czynnościowe, stanowiące wynik działania „czynników cytotoksycznych” towarzyszących niedokrwieniu np. zaburzeń elektrolitowych. Z badań Shigeno i wsp. (1986) wiadomo, iż istotnym czynnikiem patogenetycznym wczesnego cytotoksycznego, odwracalnego obrzęku mózgu w niedokrwieniu, związanego przede wszystkim z masywnym obrzaniem astrocytów, są zaburzenia homeostazy jonowej. Pogląd ten potwierdza Choi (1988), który wskazuje na jonowy mechanizm wczesnych uszkodzeń komórkowych po niedotlenieniu.

Podsumowując nasze spostrzeżenia można wysunąć przypuszczenie, iż nieodwracalne uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA₁ w następstwie krótkotrwałego niedokrwienia, poprzedzone ich wstępną, przejściową hiperaktywnością zainicjowane jest zachwianiem równowagi między ich pobu-

dzającą i hamującą inercją. Stanowi ono z jednej strony efekt ekscytotoksycznego działania aminokwasowych neurotransmiterów, z drugiej zaś czynnościowej niewydolności GABA-ergicznego interneuronów. Taki właśnie mechanizm opóźnionej śmierci neuronów był brany pod uwagę przez szereg autorów, między innymi przez Suzuki i wsp. (1985), w świetle znanej wrażliwości neuronów GABA-ergicznego na niedokrwienie (Sloper i wsp. 1980). Został on jednakże odrzucony na podstawie biochemicznych spostrzeżeń Francisa i Pulsinelli (1982) oraz ultrastrukturalnych obserwacji Johansena i wsp. (1983), wskazujących na stosunkowo znaczną oporność interneuronów odcinka CA₁ hipokampa szczura na niedokrwienie. Podobnie w naszych wcześniejszych badaniach stwierdziliśmy niezmienny obraz mikroskopowo-elektronowy interneuronów odcinka CA₁ u chomików mongolskich, kontrastujący z postępującą dezintegracją komórek piramidowych (Mossakowski i wsp. 1989). Należy jednakże uwzględnić w tym miejscu fazę okresu poischemicznego, w której prowadzono obserwacje. Nasze obecne badania wykazały zmianę obrazu interneuronów w 12 godz. po niedokrwieniu. W tym samym czasie procesu patologicznego Arai i Yasumoto (cyt. za Suzuki i wsp. 1985) stwierdzili znaczny spadek zawartości GABA w odcinku CA₁. Badania Francisa i Pulsinelli (1982) oraz Johansena i wsp. (1983), a także nasze własne (Mossakowski i wsp. 1989) prowadzone były po upływie 24 godz. od niedokrwienia kiedy, jak wynika z naszych obecnych obserwacji, dochodzi do całkowitej ultrastrukturalnej normalizacji interneuronów.

INFLUENCE OF SHORT-TERM ISCHEMIA ON THE ULTRASTRUCTURE
OF HIPPOCAMPAL GYRUS IN MONGOLIAN GERBILS.
Part II. ELECTRON MICROSCOPE PICTURE OF SYNAPSES
IN EARLY POSTISCHEMIC PERIOD

Summary

Ultrastructure of synaptic contacts, located in all cortical layers (*stratum oriens, pyramidale, radiale, lacunosum-moleculare* and *moleculare*) of CA₁ hippocampal sector were studied in Mongolian gerbils, subjected to 7.5 min forebrain ischemia, resulting from bilateral ligation of common carotid arteries. Two experimental groups were used. Group I included animals with 12 h postischemic survival, group II consisted of those which survived 24 h after ischemic insult.

CA₁ sector in animals from group I was characterized by cytoplasmic and mitochondrial swelling of hippocampal interneurons (both perikarya and cell processes and their endings) localized in *stratum pyramidale*. Additional abnormality consisted in remarkable swelling with vesicular disorganization of presynaptic bags situated mostly in *stratum lacunosum-moleculare* and to lesser degree in *stratum moleculare*. There was considerable swelling of astrocytic perikarya and processes, mostly perivascular ones in all Ammon's horn cortical layers. Pyramidal neurons and all other tissue elements remained ultrastructurally unchanged.

In experimental group II ultrastructural abnormalities concerned CA₁ pyramidal neurons which showed either electron microscopic evidences of cell metabolic activation or features of early phase of the delayed neuronal death. On the contrary electron microscope picture of hippocampal interneurons was totally normalized. So was ultrastructure of great majority of presynaptic nerve

endings visible in all cortical layers. However, great proportion of postsynaptic structures localized in *stratum lacunosum-moleculare* and partially in *stratum moleculare* revealed considerable swelling. This electron microscope picture was similar to that described as axon-sparing lesions resulting from the action of excitotoxic substances.

The authors conclude that the phenomenon known under the name of delayed neuronal death of CA₁ pyramidal cells may be initiated by imbalance between their excitatory and inhibitory innervation resulting from an early reversible insufficiency of GABA-ergic interneurons and excitatory action of glutamergic synapses originating from Schaffer's collaterals.

PIŚMIENNICTWO

1. Andersen A., Blackstad B., Lomo T.: Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp Brain Res*, 1966, 1, 236–248.
2. Andersen A., Eccles J. C., Löyning V.: Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature*, 1963, 198, 540–542.
3. Arai H., Yasumoto T.: – cytowane za Suzuki i wsp. poz.30.
4. Choi D. W.: Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 1988, 11, 456–469.
5. Diemer N. H., Ekström von Lubitz D. K. J.: Cerebral ischemia in the rat: increased permeability of postsynaptic membranes to horseradish peroxidase in the early postischemic period. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1983, 9, 403–414.
6. Francis A., Pulsinelli W. A.: Response of GABA-ergic and cholinergic neurons to transient cerebral ischemia. *Brain Res*, 1982, 243, 271–278.
7. Frotscher M., Lerenth Cs., Lubbers K., Oertel W. H.: Commissural afferents innervate glutamate decarboxylase immunoreactive non-pyramidal neurons in the guinea pig hippocampus. *Neurosci Lett*, 1984, 46, 137–143.
8. Gajkowska B., Gadamski R., Wawrzyniak E.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część I. Ultrastrukturalna charakterystyka odcinka CA₁ rogu Amona ze szczególnym uwzględnieniem obrazu połączeń synaptycznych. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 455–476.
9. Harris K. M., Marshall, P. E., Landis D. M. D.: Ultrastructural study of cholecystokinin-immunoreactive cells and processes in area CA₁ of the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 1985, 233, 147–158.
10. Harris R. J., Symon L., Branston N. M., Bayhan M.: Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1, 203–209.
11. Johansen F. F., Jørgensen M. B., Diemer N. H.: Resistance of hippocampal CA₁ interneurons to 20 min transient cerebral ischemia in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 61, 135–140.
12. Kelly J. S., Dodd J.: Cholecystokinin and gastrin as transmitters in mammalian central nervous system. W: *Neurosecretion and brain peptides*. Red.: J. B. Mortin, S. Reichlin, K.L. Bick, Raven Press, New York, 1981, 133–144.
13. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982, 239, 57–69.
14. Kirino T., Sano K.: Selective vulnerability in the gerbil hippocampus following transient ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 62, 201–208.
15. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia – reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 39–58.
16. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ blokowania błonowych kanałów wejścia wapnia na rozwój niedokrwienych uszkodzeń neuronów sektora CA₁ rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 439–450.
17. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Lesions of CA₁ sector neurons in short-lasting cerebral ischemia in Mongolian gerbils. XIX Danube Symposium of Neurological Sciences. Heidelberg. 10–12 October 1986. Abstracts 47.

18. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure of neurons from the CA₁ sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbil. *Neuropatol Pol*, 1989, 27, 39–53.
19. Nunzi M. G., Gorio A., Milan F., Freud T. F., Somogyi P., Smith A. D.: Cholecystokinin-immunoreactive cells from symmetrical synaptic contacts with pyramidal and nonpyramidal neurons in the hippocampus. *J Comp Neurol*, 1985, 237, 485–489.
20. Olney J. W.: Neurotoxicity of excitatory amino acids. W: Kainic acid as a tool in neurobiology. Red.: E. G. McGeer, J. W. Olney, P. L. McGeer, Raven Press, New York, 1978, 37–70.
21. Pulsinelli W. A.: Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Brain Res*, 1985, 63, 29–37.
22. Ribak C. E., Vaughn J. E., Saito K.: Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res*, 1978, 140, 315–332.
23. Roberts G. W., Woodhams P. L., Polak J. M., Crow T. J.: Distribution of neuropeptides in the limbic system of the rat: the hippocampus. *Neuroscience*, 1984, 11, 35–77.
24. Schwarcz R., Whetsell W. D., Mangano R. M.: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316–318.
25. Shigeno T., Hanamura T., Mima T., Kaneko M., Asano T., Tahakura K.: Mechanism of ischemic brain edema: Aspects from brain capillary and glial function for ion transport. W: Brain microcirculation. Erwin Riesch Symposium. Berlin, September 2–5, 1986. Abstr.
26. Siesjö B. K.: Cell damage in the brain. A speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1, 155–185.
27. Simon R. P., Griffiths T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia. An electron microscopy study in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1984, 4, 350–361.
28. Sloper J. J., Johanson P., Powell T. P. S.: Selective degeneration of interneurons in the motor cortex of infant monkeys following controlled hypoxia a possible cause of epilepsy. *Brain Res*, 1980, 198, 204–209.
29. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba V., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 59–68.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Li C. L., Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA₁ sector of hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60, 217–222.
31. Wieraszko A.: Biochemiczne przejawy plastyczności synaps ze szczególnym uwzględnieniem roli kwasu glutaminowego jako domniemanego neurotransmitera niektórych szlaków hipokampalnych. Praca habilitacyjna. Biblioteka Instytutu Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa, 193, ss. 4–12.

Adres autorów: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego; Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00–784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.

BARBARA GAJKOWSKA, ANNA ZARĘBA-KOWALSKA

WPLYW ISCHEMII NA ULTRASTRUKTURĘ UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO SZCZURA

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

Niedokrwienie OUN, w zależności od jego intensywności i czasu trwania, może prowadzić do odwracalnych zmian patomorfologicznych, lecz również do rozpadu neuronów w wybiórczo wrażliwych obszarach mózgu (Hossmann, Hossmann 1973; Kirino 1982; Suzuki i wsp. 1983, 1985; Pulsinelli 1985; Hossmann i wsp. 1986; Mossakowski i wsp. 1989). Uprzednio przeprowadzone badania ultrastrukturalne układu podwzgórzowo-przysadkowego po incydencie niedokrwinnym, wykazały jego wrażliwość i reakcję na 2,5 min oraz 5 min całkowite niedokrwienie (Gajkowska 1987; Gajkowska, Zaręba-Kowalska 1988). Obserwacje morfologiczne neuronów jądra nadwzrokowego (SO) i jądra przykomorowego (PV) oraz włókien płata nerwowego przysadki przeprowadzono wówczas bezpośrednio po przywróceniu krążenia krwi, po 3 godz., 3 i 7 dniach od wykonania zabiegu. Bezpośrednio po niedokrwieniu stwierdzono zróżnicowaną reakcję neuronów SO i PV na niedokrwienie i niewielką liczbę neuronów ulegających nieodwracalnemu uszkodzeniu. Natomiast u zwierząt z dłuższym czasem przeżycia po recyrkulacji krwi (po 3 godz., w 3 i 7 dniu) badania wykazały niewielkie różnice w obrazach ultrastrukturalnych neuronów SO i PV w porównaniu z kontrolą, co może świadczyć o czynnościowym charakterze zmian. To samo dotyczyło budowy ultrastrukturalnej płata nerwowego przysadki. We wszystkich okresach obserwacji dostrzegano zmiany ultrastrukturalne elementów glejowych oraz synaps znajdujących się w pobliżu neuronów SO i PV, mające tendencję do nasilania się w miarę upływu czasu po przebytym niedokrwieniu. Dlatego też celowe wydawały się badania układu podwzgórzowo-przysadkowego zwierząt po jeszcze dłuższym okresie ich przeżycia po niedokrwieniu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzone na 10 dojrzałych szczurach szczepu Wistar, samicach o masie ciała około 180 g. Zastosowano taki sam model doświadczalny jak uprzednio opisany w naszej pracy (Gajkowska, Zaręba-Kowalska 1988). Czas zatrzymania akcji serca wynosił 5 min. Zastosowany model doświadczalny został dokładnie scharakteryzowany pod względem fizjopatologicznym przez Korpacheva i wsp. (1982) i Mossakowskiego i wsp. (1986).

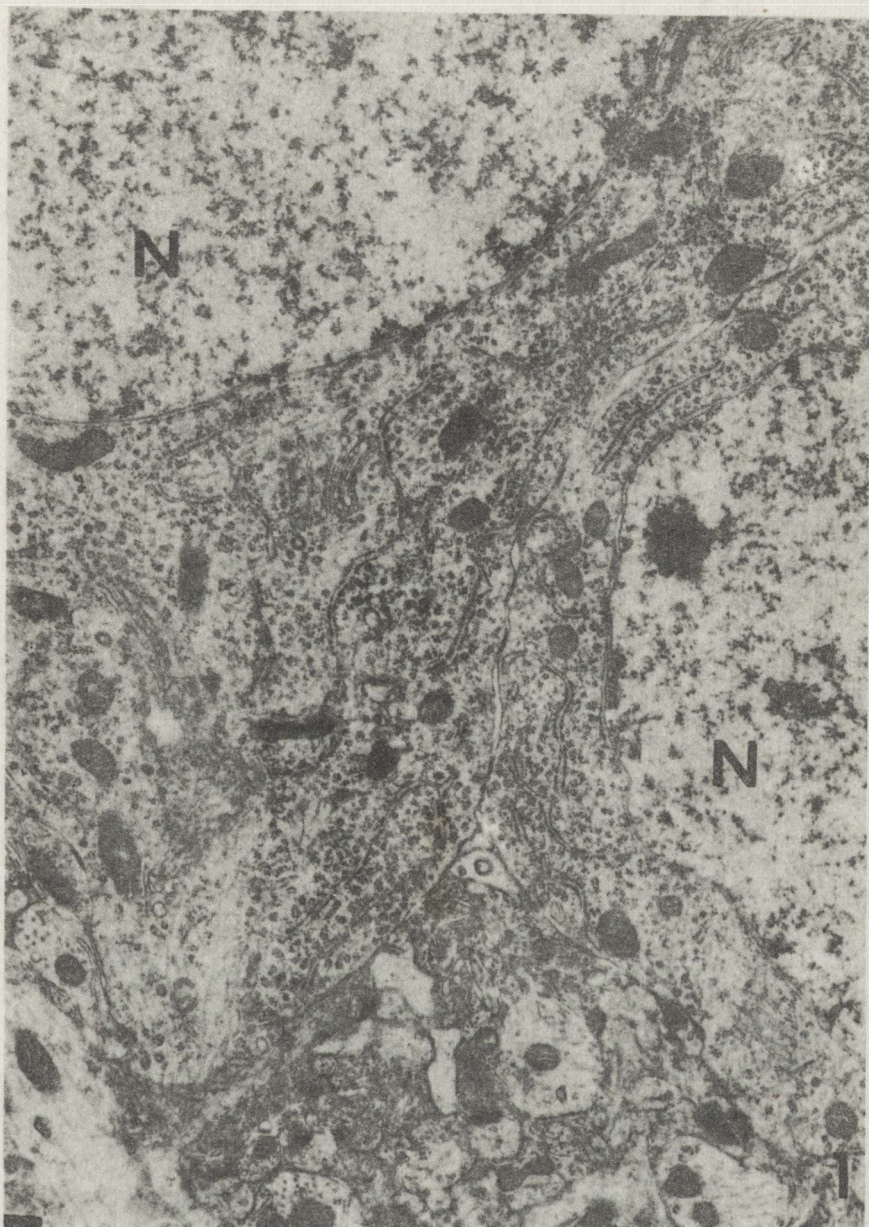
Zwierzęta uśmiercano w grupach po 4 szczury, po 2 tygodniach i po 1 miesiącu od doświadczenia, wykonując przezsercową perfuzję utrwalaczem Karnovskiego. Kontrolę stanowiły 2 szczury, nie poddane żadnym zabiegom. Pobrane fragmenty podwzgórza zawierające SO i PV oraz płat nerwowy przysadki utrwalono przez imersję w utrwalaczu Karnovskiego przez 1 godz. w temperaturze pokojowej oraz 1 godz. w temperaturze 4°C. Następnie materiał utrwalano 1% czterotlenkiem osmu, odwadniano w alkoholu etylowym i zatapiano w Eponie. Ultracienkie skrawki kontrastowano wodnym nasyconym roztworem octanu uranylu i cytrynianu ołowiu. Preparaty oglądano i zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 1200 EX.

WYNIKI

Zwierzęta doświadczalne: 2 tygodnie i 1 miesiąc po 5-minutowej ischemii.
Jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe

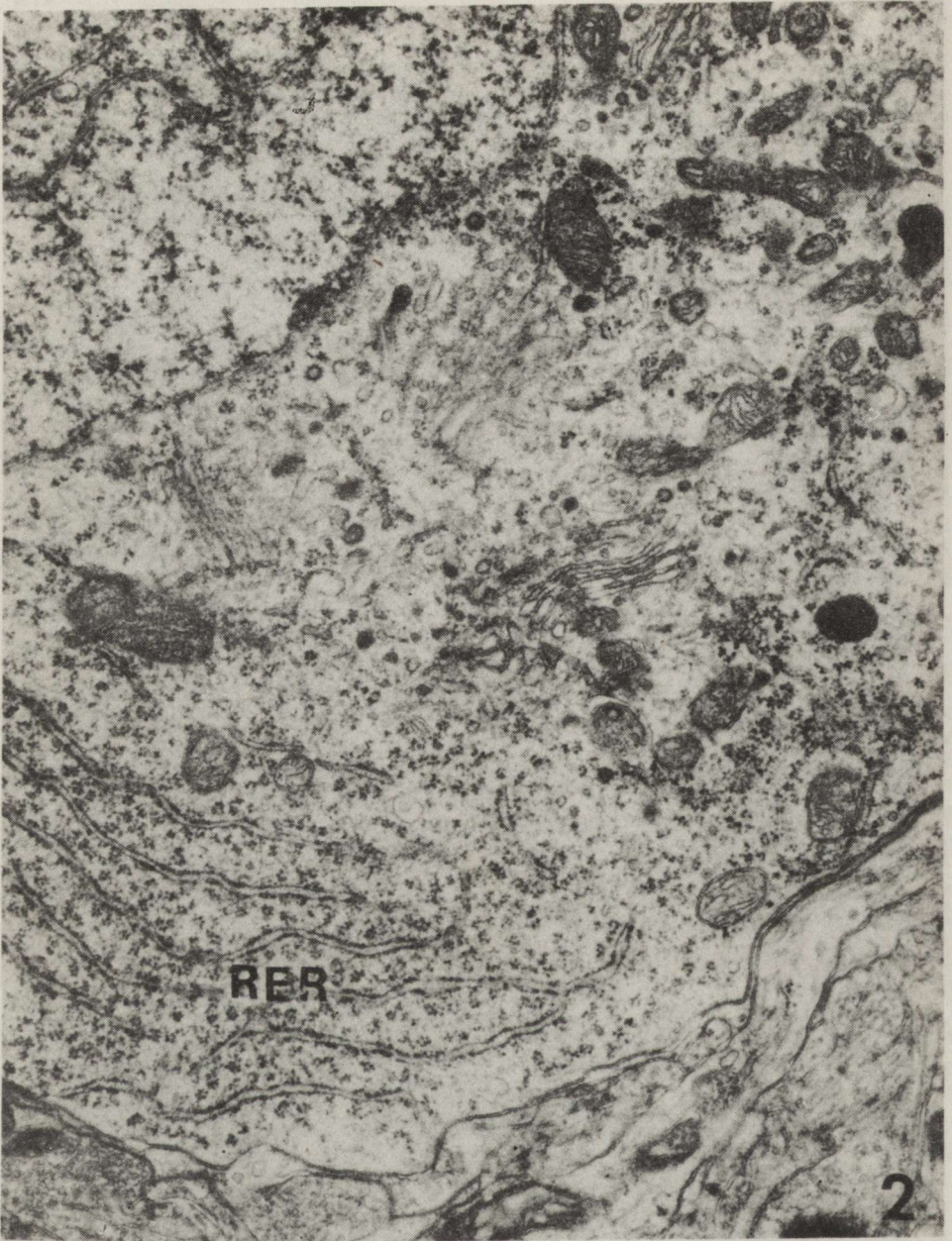
Ze względu na istniejące już opisy neuronów obydwu jąder neurosekrecyjnych w kontroli zostaną one pominięte. Neurony SO i PV zwierząt doświadczalnych wykazywały duże podobieństwo morfologiczne oraz podobieństwo reakcji, dlatego też przedstawione wyniki dotyczą neuronów obydwu jąder. Większość obserwowanych neuronów nie wykazywała istotnych różnic morfologicznych w budowie jądra i cytoplazmy w porównaniu z kontrolą (ryc. 1, 2). Neurony te ułożone ściśle obok siebie miały olbrzymie jądra komórkowe, niekiedy z lekkimi wgłobieniami otoczki jądrowej. Jądra zawierały równomierne rozproszoną chromatynę oraz elektronowo-gęste jąderko. Charakterystyczną cechą tych neuronów była obfita siateczka śródplazmatyczna ziarnista, bardzo rozbudowany kompleks Golgiego, a w jego obszarze zmienna ilość ziarnistości neurosekrecyjnych, polimorficznych lizosomów oraz znaczna ilość neurotubul. W cytoplazmie licznie występowały także mitochondria o rozmaitym kształcie i rozmiarach. Prawidłową budową ultrastrukturalną odznaczały się wszystkie połączenia synaptyczne znajdujące się na neuronach oraz w otaczającym neuropilu.

Oprócz wyżej opisanych spotykano też neurony sekrecyjne o cechach ultrastrukturalnych wskazujących na ich aktywację. Charakteryzowały się one obecnością dużych jąder komórkowych z głębokimi inwaginacjami, dobrze rozwiniętym i rozczłonowanym kompleksem Golgiego, w okolicy którego znajdowała się duża ilość ziarnistości neurosekrecyjnych lub lizosomów oraz



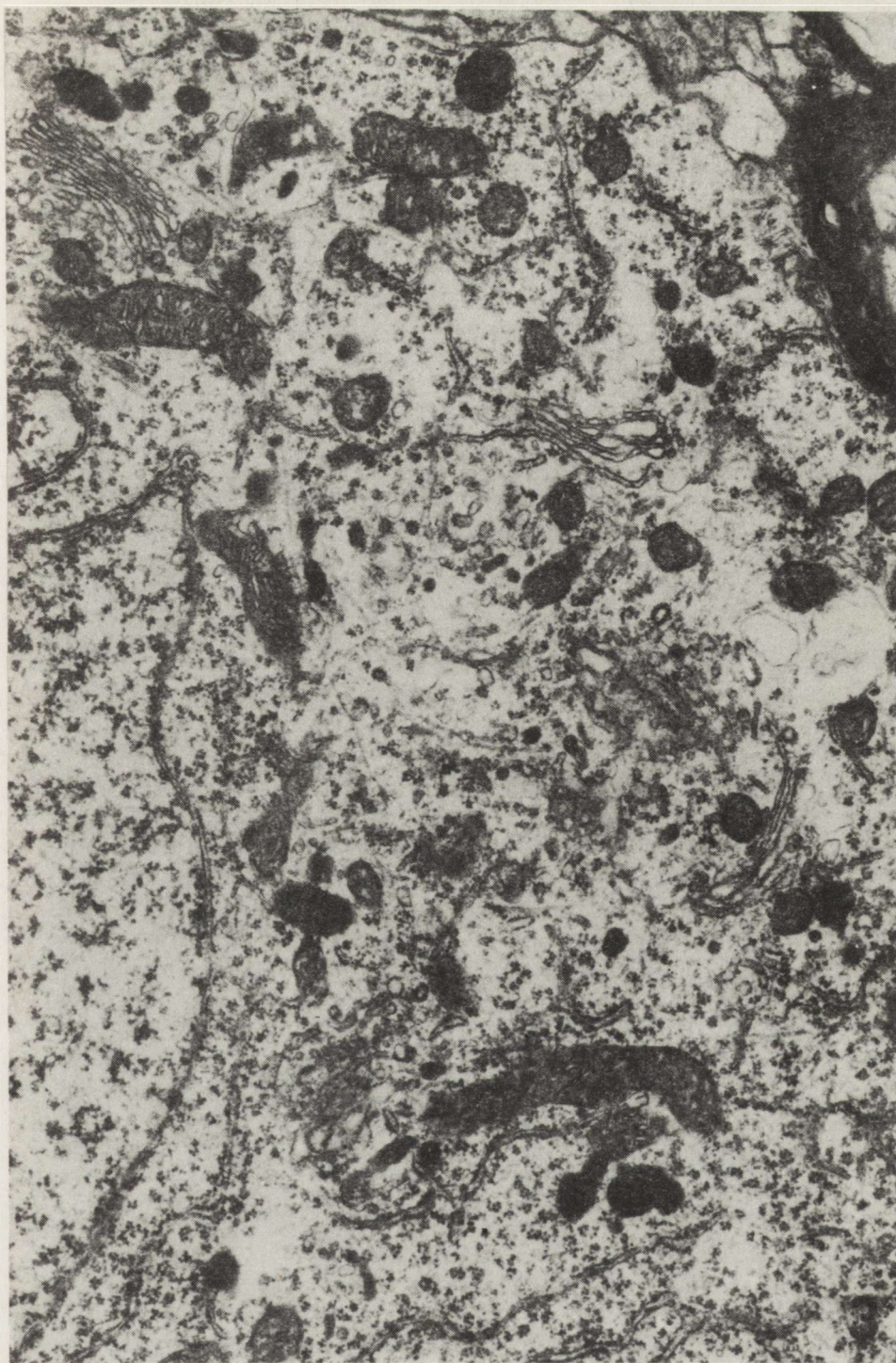
Ryc. 1. Jeden miesiąc po niedokrwieniu. SO. Fragment dwóch komórek neurosekrecyjnych (N) o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Pow. 22 500 ×

Fig. 1. One month after experiment. SO. Fragments of two neurosecretory cells (N) ultrastructurally normal. 22 500 ×



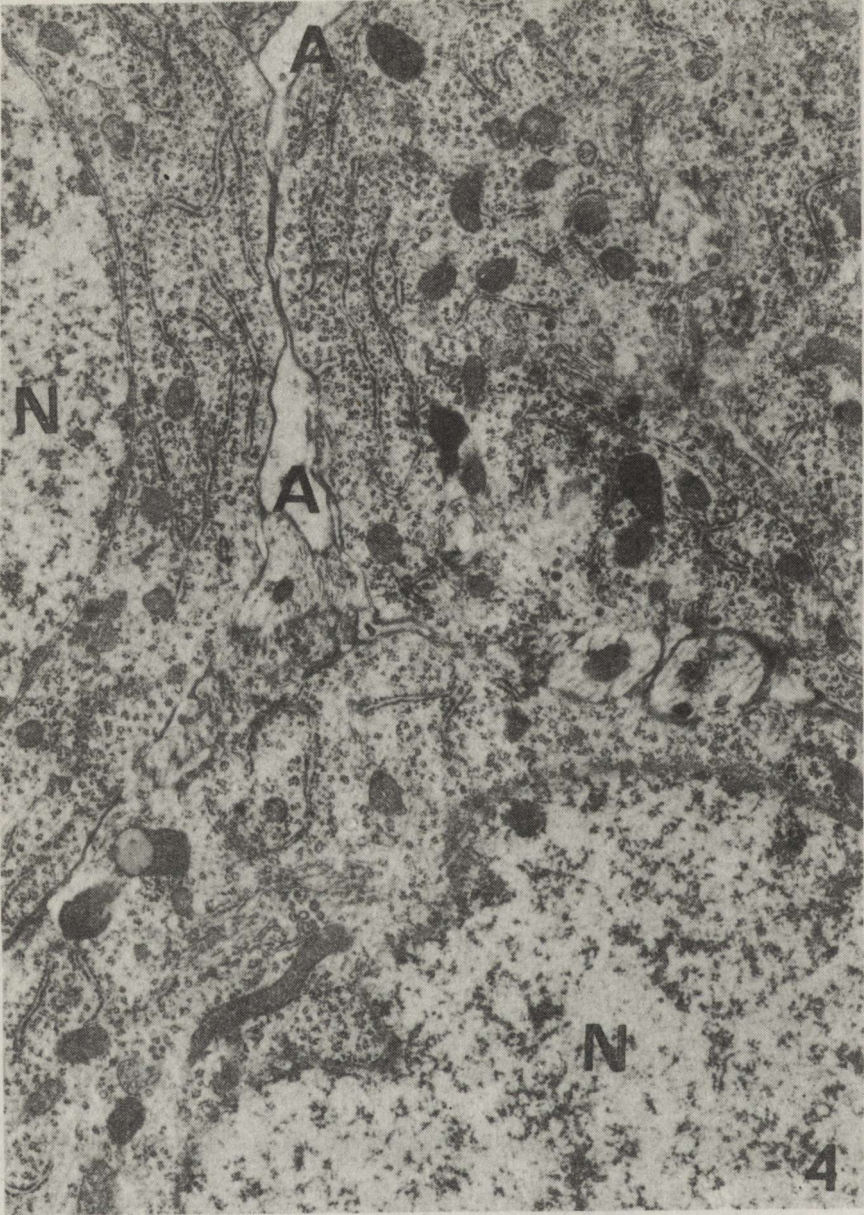
Ryc. 2. Dwa tygodnie po doświadczeniu. PV. Fragment jądra komórkowego z głębokimi inwaginacjami. W cytoplazmie rozwinięty kompleks Golgiego oraz siateczka śródplazmatyczna ziarnista (RER). W obszarze kompleksu Golgiego liczne ziarnistości neurosekrecyjne oraz lizosomy i mitochondria. Pow. 22 500 ×

Fig. 2. Two weeks after experiment. PV. Fragments of nucleus with deep invaginations. Very prominent Golgi complex and RER. In this region numerous neurosecretory granules, lysosomes and mitochondria are present. 22 500 ×



Ryc. 3. Jeden miesiąc po doświadczeniu. PV. W cytoplazmie zwraca uwagę bardzo rozczłonowany kompleks Golgiego. W jego okolicy liczne ziarnistości neurosekrecyjne, lizosomy i elementy cytoskeletonu. Pow. 22 500 ×

Fig. 3. One month after experiment. PV. Note multilocated Golgi complex, its region contains numerous neurosecretory granules, lysosomes and cytoskeletal elements. × 22 500



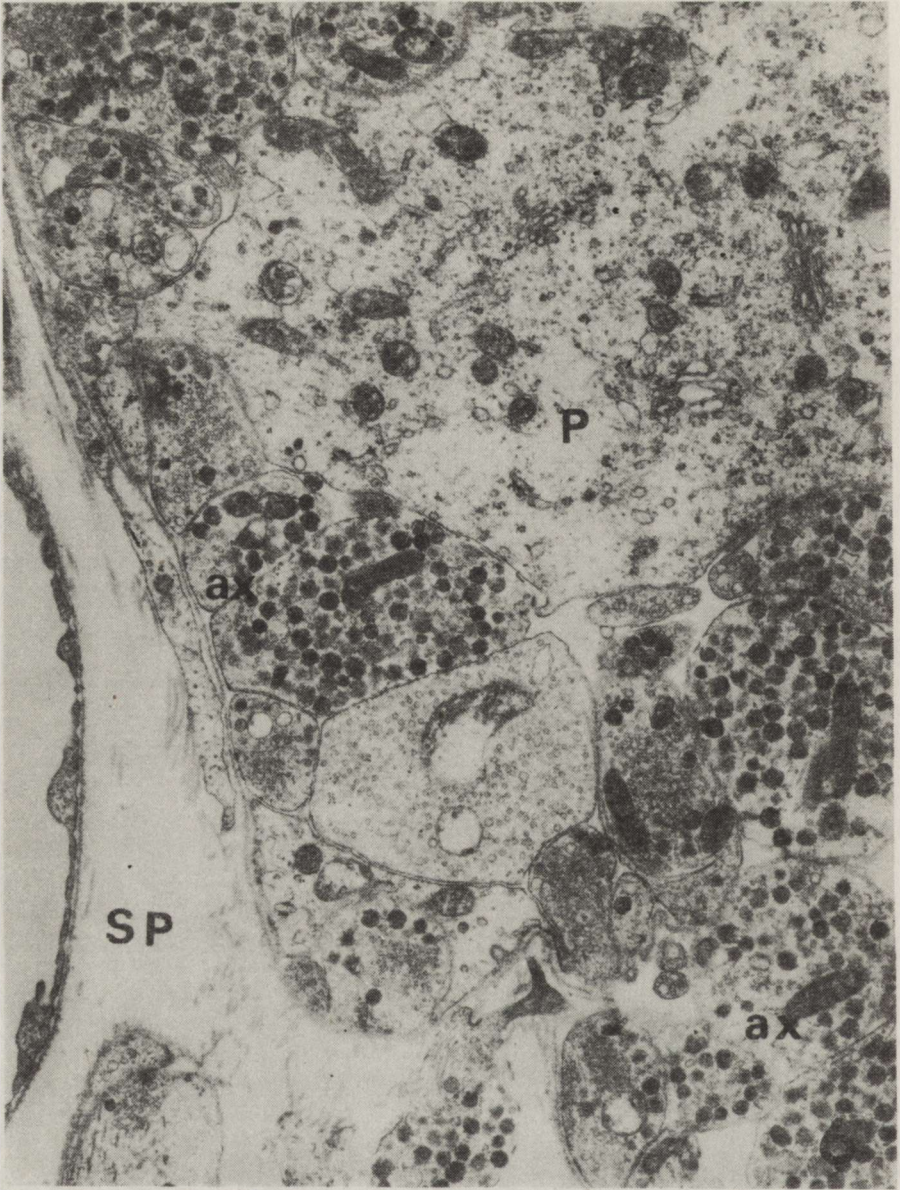
Ryc. 4. Jeden miesiąc po doświadczeniu. SO. Fragmenty trzech neuronów (N). Pomiędzy nimi obrzmiałe wypustki astrocytów (A). Pow. 22 500 ×

Fig. 4. One month after experiment. SO. Fragment of three neurons (N). Note swollen astrocytic processes between them (A). × 22 500



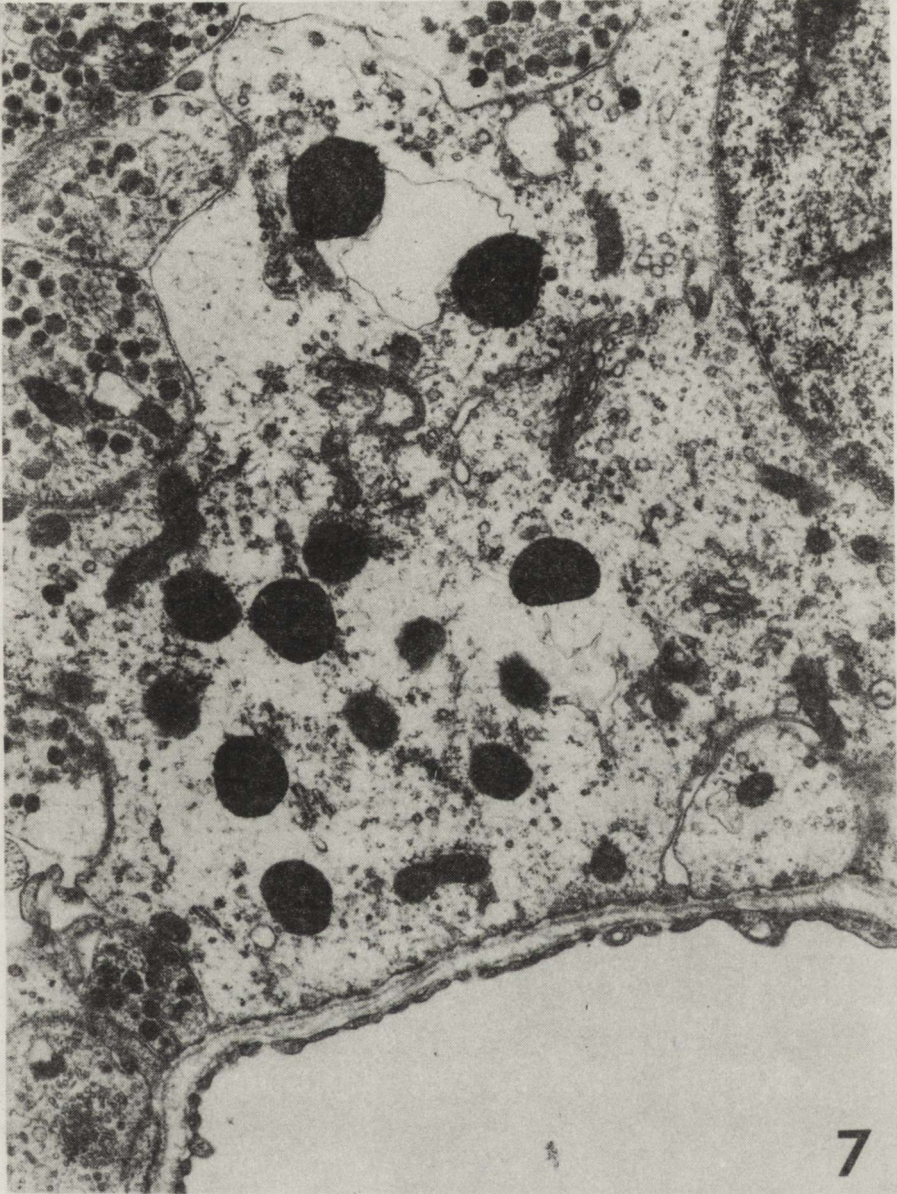
Ryc. 5. Dwa tygodnie po doświadczeniu. SO. Jądro komórkowe z głębokimi inwaginacjami z elektronowo gęstym jąderkiem, w cytoplazmie duże elektronowo-przeźierne wakuole (V). Pow. 21 000 ×

Fig. 5. Two weeks after experiment. SO. Cell nucleus with deep invagination and electron-dense nucleolus. Note two electron-lucent vacuoles (V) in the cytoplasm. × 21 000



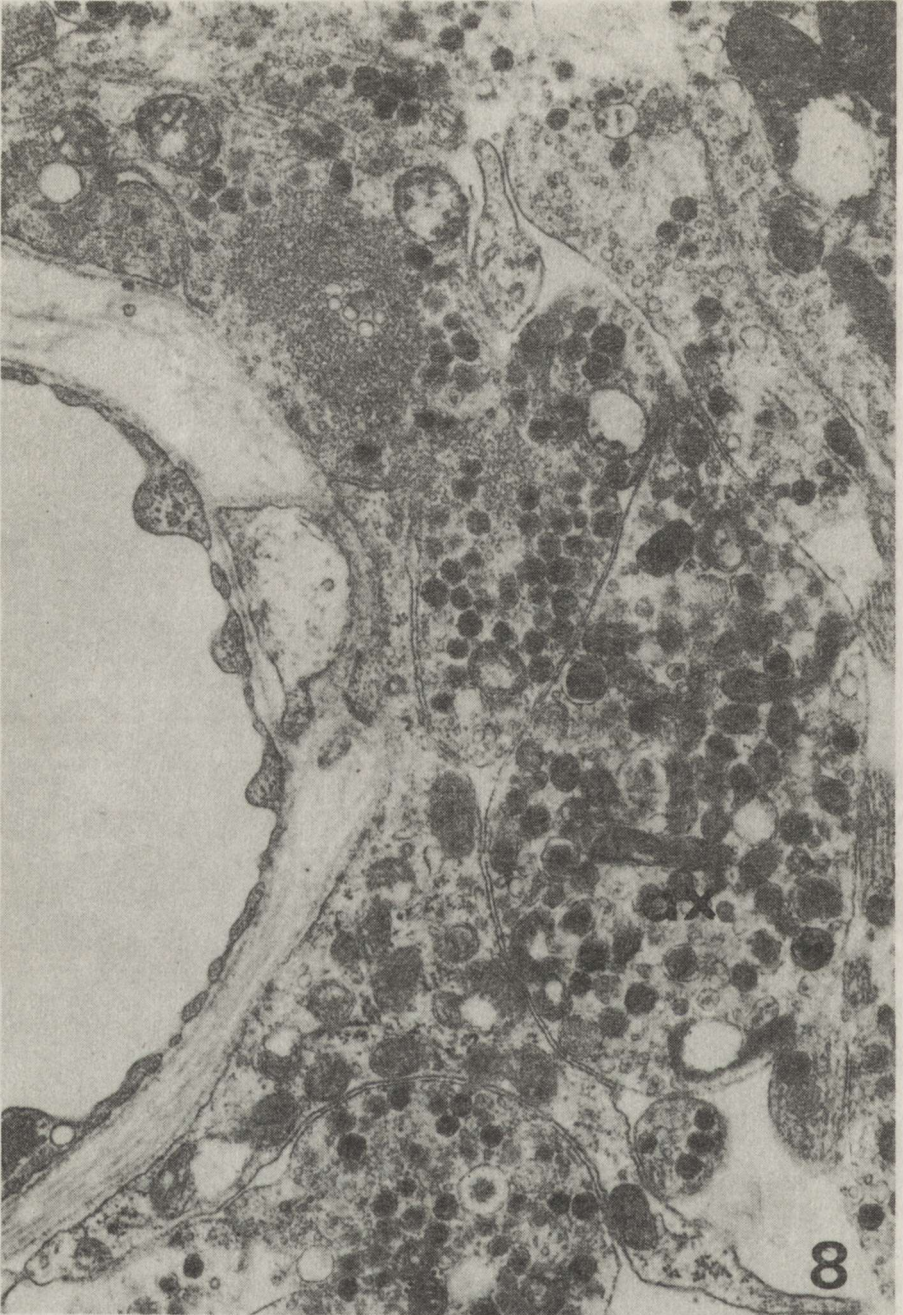
Ryc. 6. Jeden miesiąc po doświadczeniu. Płat nerwowy przysadki (PN). Fragment pericytu o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej oraz zakończenia włókien (ax) wypełnione różną ilością ziarności neurosekrecyjnych, mikropęcherzyków i mitochondriów. Widoczne poszerzone przestrzenie okołonaczyniowe (SP). Pow. 19 850 ×

Fig. 6. One month after experiment. Neurohypophysis. Ultrastructurally normal pericyte (P) and nerve terminals (ax) with various number of neurosecretory granules, microvesicles and mitochondria. Note dilated pericapillary space (SP). × 19 850



Ryc. 7. Dwa tygodnie po doświadczeniu. PN. Fragment pituicyta (P) o obrzmiałej cytoplazmie z dużą ilością lizosomów i obecnością elektronowo-przeziernych wakuoli (V). Pow. 19 850 ×

Fig. 7. Two weeks after experiment. Neurohypophysis. Fragment of swollen pituicyte (P) with electron-lucent vacuole (V) and numerous lysosomes in the cytoplasm. × 19 850



Ryc. 8. Jeden miesiąc po doświadczeniu. PN. Fragment naczynia z odcinkowym poszerzeniem przestrzeni okołonaczyniowej. Zgrupowanie zakończeń aksonalnych, w niektórych z nich (ax) widoczne figury mielinowe i obrzmiałe mitochondria. Pow. 22 500 ×

Fig. 8. One month after experiment. Neurohypophysis. Partially dilated perivascular space. Numerous nerve terminals, some of them (ax) contain myelin figures and swollen mitochondria. × 22 500

obfity cytoskeleton (ryc. 3, 4). Wśród nielicznych tylko neuronów SO i PV spotykano nieprawidłowości ultrastrukturalne polegające na występowaniu w ich cytoplazmie miejscowych przejaśnień lub elektronowo-przeziernych wakuoli (ryc. 5). Zmiany te obserwowano jedynie u zwierząt z dwutygodniowym przeżyciem po niedokrwieniu. Sporadycznie napotymano również w neuropilu otaczającym neurony SO i PV nieznacznie obrzmiałe wypustki astrocytów wciskające się pomiędzy neurony (ryc. 4).

Część nerwowa przysadki

Budowa ultrastrukturalna przysadki nie wykazywała również większych odchyżeń od normy. Zmiany ultrastrukturalne dotyczyły nielicznych pituicytów i polegały na występowaniu przejaśnień lub elektronowo-przeziernych wakuoli w ich cytoplazmie. Zwiększona była także ilość lizosomów (ryc. 7). Wokół nielicznych naczyń włosowatych obserwowano odcinkowe poszerzenia przestrzeni okołonaczyniowej (ryc. 6, 8). Natomiast budowa ultrastrukturalna włókien aksonalnych nie wykazywała żadnych odchyżeń od normy. Włókna lub pęczki włókien znajdowały się w bliskim kontakcie z pituicytami o prawidłowej budowie. W zakończeniach włókien neuronów SO i PV obecne były zmienne ilości ziarnistości neurosekrecyjnych, mikropęcherzyki oraz drobne mitochondria i elementy cytoskeletonu. Niektóre włókna zawierały figury mielinopodobne i pojedyncze obrzmiałe mitochondria (ryc. 6, 7, 8).

OMÓWIENIE

Obserwacje obrazów ultrastrukturalnych jąder neurosekrecyjnych podwzgórza oraz ich zakończeń w części nerwowej przysadki przeprowadzone po upływie 2 tygodni oraz 1 miesiąca po wykonaniu całkowitej 5-minutowej ischemii nie wykazały większych nieprawidłowości w ich budowie ultrastrukturalnej.

Zmiany rozwijające się w mózgu po przywróceniu krążenia opisane jako tzw. „maturation phenomenon” (Ito i wsp. 1975) wydają się zależne od intensywności niedokrwienia (Yamaguchi, Klatzo 1984; Mossakowski, Gajkowska 1984; Pluta, Gajkowska 1984). Układ podwzgórzowo-przysadkowy, odpowiedzialny za regulację gospodarki wodno-mineralnej, jest jednym z wrażliwszych i szybko reagujących na niedokrwienie obszarów mózgu. W trakcie niedokrwienia i w okresie poniedokrwiennym dochodzi do zaburzenia homeostazy wodno-elektrolitowej, powodującego wzrost osmolalności tkanki (Hossmann, Takagi 1976), zahamowania pompy jonowej i zaburzenia procesów energetycznych oraz zmian w przepuszczalności błon (Astrup 1982).

Poprzednie prace dotyczące wczesnych okresów obserwacji wykazały wrażliwość pojedynczych neuronów SO i PV na 2,5 i 5 minutowe całkowite niedokrwienie mózgu (Gajkowska 1987; Gajkowska, Zaręba-Kowalska 1988). Cechy ultrastrukturalne tych neuronów ulegających nekrobiozie były podobne do opisywanych przez Schneider i Dralle (1973) w innych obszarach mózgu,

jednakże częstość ich występowania w naszym materiale była wyraźnie mniejsza.

Obrazy morfologiczne płata nerwowego przysadki wskazywały na hamowanie wydzielania ziarnistości neurosekrecyjnych do krwiobiegu. Zarówno w podwzgórzu, jak i w przysadce obserwowano narastające poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych oraz obrzmienie niektórych odcinków presynaptycznych połączeń akso-somatycznych i niektórych komórek astrogleju, zwłaszcza astrocytarnych wypustek okołonaczyniowych. Według Bourke i wsp. (1980) oraz Shigano i wsp. (1986) niedokrwienie wywołuje depolaryzację błon komórek nerwowych, co powoduje przesunięcie jonów potasu do przestrzeni zewnątrzkomórkowych oraz gromadzenie się jonów sodu w komórkach. Niedokrwienie wywołuje również uszkodzenie bariery krew-mózg, a co za tym idzie, zaburzenie czynności naczyń włosowatych mózgu. Istotną rolę w regulacji przepływu jonów odgrywa enzym Na K/ATP-aza. Djuričić i wsp. (1988), sądzą, że enzym ten jest jednym z czynników odpowiedzialnych za powstawanie i rozwój poniedokrwiennego obrzęku mózgu. Obserwacje morfologiczne neuronów SO i PV oraz włókien płata nerwowego przysadki przeprowadzone w 2 tygodnie oraz w miesiąc po całkowitym 5-minutowym niedokrwieniu wskazywały na utrzymywanie się zmian obrzękowych gleju. Zmiany te obserwowano sporadycznie, ale ich nasilenie było porównywalne do zmian stwierdzonych we wcześniejszym okresie obserwacji (3 godz.).

Analiza ultrastrukturalna neuronów SO i PV wykazała w większości przypadków zdecydowane podobieństwo do kontroli. Spotykano więc neurony w różnych fazach cyklu sekrecyjnego różniące się między sobą zmienną ilością ziarnistości neurosekrecyjnych, lizosomów, konfiguracją kompleksu Golgiego, układem elementów cytoskeletonu oraz siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Jedynie w grupie zwierząt obserwowanych po 2 tygodniach od wykonanego niedokrwienia spotykano sporadycznie nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej neuronów polegające na obecności w ich cytoplazmie elektronowo-przeziernych wakuoli. Niekiedy też zazwyczaj wąskie przestrzenie pomiędzy neuronami były miejscami poszerzone. W neuropilu otaczającym neurony nie obserwowano uchwytnych nieprawidłowości ultrastrukturalnych.

W grupie zwierząt z miesięcznym przeżyciem po niedokrwieniu w wielu neuronach SO i PV obecne były lizosomy polimorficzne w kształcie, rozmiarach i wewnętrznej strukturze. Ten polimorfizm jest wskaźnikiem ich aktywności i wydaje się związany z ich heterofagocytarną lub autofagocytarną funkcją w komórkach (Mayahara, Ogawa 1972; Pfeifer 1987). W układzie podwzgórzowo-przysadkowym regulują one proces sekrecji hormonów na drodze granulolizy i krynofagii (Boudier 1981; Chang, Dellmann 1984). Proces ten polega na rozpuszczaniu ziarnistości neurosekrecyjnych w perykarionach oraz w zakończeniach aksonalnych płata nerwowego przysadki, reguluje więc sekrecję hormonu w zależności od zapotrzebowania ustroju i umożliwia eliminację jego nadmiaru (Gajkowska 1985).

W tych nielicznych neuronach SO i PV, w których w obszarze kompleksu

Golgiego ilość lizosomów, czy też ziarnistości neurosekrecyjnych była dość znaczna, występowały również elementy cytoskeletonu w postaci neurotubul rozrzuconych z pozorną bezładnością. System cytoskeletalny jest powszechnie znany jako układ odpowiedzialny za kształt komórki i jej liczne funkcje, m. in. za poruszanie się komórek, podział lub cytokinezę, fagocytozę, przepływ cytoplazmy i organelli komórkowych oraz sekrecję materiału komórkowego (Allison 1973; Allison, Davies 1974; Bourguignon, Bourguignon 1984; Singer, Kupfer 1986). Ostatnie badania Araki i Ogawa (1987a,b) wykazały, że cytoskeleton odgrywa zasadniczą rolę w regulacji ruchu i transformacji lizosomów i dostarczyły dowodów na interakcję filamentów aktynowych z błonami lizosomalnymi. Na podstawie przedstawionych obserwacji morfologicznych skonfrontowanych z danymi o funkcji lizosomów i cytoskeletonu, można przypuszczać, że w badanych neuronach i ich zakończeniach w części nerwowej przysadki dochodzi do eliminacji nadmiaru substancji neurosekrecyjnej.

Reasumując wyniki przeprowadzonych badań można stwierdzić, że poza zmianami obrzękowymi gleju o charakterze cytotoksycznym nie obserwuje się zmian w ultrastrukturze neuronów SO i PV oraz w zakończeniach włókien płata nerwowego przysadki.

EFFECT OF ISCHEMIA ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE RAT HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSIAL SYSTEM

Summary

The aim of this work was to elucidate the postischemic changes appearing in hypothalamic secretory nuclei (*n. supraopticus* and *n. paraventricularis*) and neurohypophysis in rats which underwent the incident of clinical death. The ultrastructural organization of secretory neurons and their axons in the neurohypophysis was investigated two weeks and one month after the insult. SO and PV neurons showed an increased number of polymorphic lysosomes, lipid droplets as well as an abundance of cytoskeleton elements, i.e., neurotubules and neurofilaments. Some astrocytic processes in the neuropil were swollen. Synaptic endings on SO and PV neurons had a normal ultrastructure. An increased number of lysosomes and dense bodies was observed in some axons and pituicytes in the neurohypophysis.

PIŚMIENNICTWO

1. Allison A. C.: The role of microfilaments and microtubules in the cell movement endocytosis and exocytosis. W: Locomotion of tissue cells. Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Excerpta Medica, North-Holland, Amsterdam, 1973, 13, 109.
2. Allison A. C., Davies P.: Mechanisms of endocytosis and exocytosis. W: Transport at cellular level, Symposia of Society for Experimental Biology. University Press, Cambridge, 1974, 28, 419–446.
3. Araki N., Ogawa K., Regulation of intracellular lysosomal movements by the cytoskeletal system in rat alveolar macrophages. *Acta Histochem Cytochem*, 1987a, 20, 659–678.
4. Araki N., Ogawa K.: *In situ* and *in vitro* morphological evidence for the interaction of actin

- filaments with lysosomes in rat alveolar macrophages. *Acta Histochem Cytochem*, 1987b, 20, 679–691.
5. Astrup J.: Energy-requiring cell function in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg*, 1982, 56, 482–497.
 6. Boudier J.: Neurosecretion et lysosomes. Approche ultrastructurale dans le système hypothalamo-posthypophysaire du rat. Thèse Doctorat d'état, Université d'Aix-Marseille II. 1981.
 7. Bourguignon L. Y. W., Bourguignon G. J.: Capping and cytoskeleton. *Int Rev Cytol*, 1984, 87, 195–224.
 8. Bourke R. S., Kimelberg H. K., Nelsen L. R., Barron K. D., Auen E. L., Popp A. H. Y., Waldman J. B.: Biology of glial swelling in experimental brain edema. *Adv Neurol*, 1980, 28, 99–109.
 9. Chang A. C., Dellmann H. D.: A fine structural study of the formation of temporary swelling (Hering bodies) and reversible degeneration of neurosecretory axons following microiontophoretic ejection of vinblastine into hypothalamo-neurohypophysial tract of the frog (*Rana pipiens*). *Exp Brain Res*, 1984, 53, 357–369.
 10. Djurić B. M., Maletić M., Micić D. V., Mršulija B. B.: /Na, K/ATPase in gerbil cerebral cortex and hippocampus: Differential response to ischemia and subsequent reflow. W: *Stroke and microcirculation*. Red.: J. Cervós-Navarro, R. Ferszt, Raven Press, New York, 1988, 143–149.
 11. Gajkowska B.: Kompleks Golgiego w stymulowanych neuronach sekrecyjnych podwzgórza szczura. *Neuropatol Pol*, 1985, 23, 445–454.
 12. Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądra przykomorowe podwzgórza szczura. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 131–146.
 13. Gajkowska B., Zaręba-Kowalska A.: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego szczura. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 53–69.
 14. Hossmann V., Hossmann K.-A.: Return of neuronal function after prolonged cardiac arrest. *Brain Res*, 1973, 60, 423–438.
 15. Hossmann K.-A., Takagi S.: Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 1976, 51, 124–131.
 16. Hossmann K.-A., Munekata K., Seo K., Imdahl A.: Mechanisms of selective vulnerability of brain after ischemia. An Erwin Riesch Symposium: Brain microcirculation – pathology, diagnosis, therapy. Berlin, September 2–5, 1986. Abstracts.
 17. Ito U., Go K. G., Walker K. J. T. Jr, Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observation. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1975, 32, 209–223.
 18. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982, 239, 57–69.
 19. Korpachev W. G., Lysenkov S. P., Tiel L. Z.: Modelowanie klinической smerti i postreanimatornoy bolezni u krys. *Patol Fizjol Exp Ther*, 1982, 3, 78–80.
 20. Mayahara H., Ogawa K.: Lysosomal wrapping mechanism observed in the autophagolysosome formation. *Histochemistry and Cystochemistry*, Red.: T. Takeuchi, K. Ogawa, S. Fujita, Jap Soc Histochem Cytochem Kyoto, 1972, 29–30.
 21. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the development of ultrastructural abnormalities in the brain following ischemia. *Neuropatol Pol*, 1984, 22, 347–365.
 22. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure in Mongolian gerbils. *Neuropatol Pol*, 1989, 27, (w druku).
 23. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 471–489.
 24. Pfeifer U.: Functional morphology of lysosomal apparatus. W: *Lysosomes: Their role in protein breakdown*, Red.: H. Glaumann, F. J. Ballard. Academic Press, London, 1987, 3–59.

25. Pluta R., Gajkowska B.: Ultrastructural changes in the sensomotor cortex of the rabbit after complete 30-min brain ischemia. *J Neurosci Res*, 1984, 11, 35–47.
26. Pulsinelli W. A.: Selective neuronal vulnerability: Morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 29–37.
27. 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.
28. Shigano 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. *An Erwin-Riesch Symposium: Brain microcirculation: Pathology, diagnosis, therapy*, Berlin, September 2–5, 1986. Abstracts.
29. Singer S. J., Kupfer A.: The directed migration of eukaryotic cells. *Ann Rev Cell Biol*, 1986, 2, 337–365.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba V., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 59–68.
31. Suzuki R., Yamaguchi T., Li C. L., Klatzo I.: The effects of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils: II. Changes of spontaneous neuronal activity in cerebral cortex and CA₁ sector hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60, 217–222.
32. Yamaguchi T., Klatzo I.: Maturation of cell damage following transient ischemia in gerbils. *W: Cerebral ischemia Red.: A. Bes, P. Braquet, R. Paoletti, B. K. Siesjö*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, 13–24.

Adres autorek: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Dworkowa 3, 00–984 Warszawa.

MICHAŁ WALSKI, JERZY BOROWICZ

ZMIANY MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE W JĄDRACH NEUROSEKRECYJNYCH PODWZGÓRZA SZCZURA PO CAŁKOWITYM NIEDOKRWIENIU W SYTUACJI KRÓTKOTRWAŁEJ ŚMIERCI KLINICZNEJ

Instytut Biostruktury Akademii Medycznej, Warszawa,
Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego, Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Przeprowadzone przez nas wcześniej badania cytoskeletonu neuronów jąder sekrecyjnych podwzgórza szczura miały charakter metodyczny. Zastosowane do tych badań utrwalacze aldehydowe wraz z błękitem alcjanu oraz utrwalacze z kwasem taninowym pozwoliły na dokonanie obserwacji poszczególnych składowych wewnątrz-komórkowego szkieletu (Walski, Borowicz 1988). Uważaliśmy, że utrwalacze te wraz ze sposobem ich aplikacji będą przydatne do dalszych badań doświadczalnych.

Celem obecnej pracy było dokonanie analizy organizacji szkieletu komórkowego w neuronach jąder sekrecyjnych podwzgórza szczura po przebytych całkowitym niedokrwieniu mózgu.

MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzono całkowite 5-minutowe niedokrwienie ośrodkowego układu nerwowego u szczura według metody opisanej w 1982 r. przez Korpacheva i wsp. Materiał tkankowy pochodzący z jąder nadwzrostkowych i przykomorowych podwzgórza do badań mikroskopowo-elektronowych, został pobrany w dwa tygodnie po przeprowadzonej reanimacji, po pięciominutowej śmierci klinicznej. Badania wykonano na 8 szczurach rasy Wistar o masie ciała około 180 g. Utrwalanie wstępne prowadzono na drodze perfuzji przez lewą komorę serca stosując utrwalacz o składzie: 2.5% aldehyd glutarowy oraz 2% paraformaldehyd w buforze kakodylanowym o pH 7,4. Następnie pobrane wycinki tkankowe o wymiarach $0,5 \times 0,5$ mm oddzielnie traktowano z zastosowaniem odmiennych utrwalaczy: 1) utrwalacz zawierający błękit alcjanu, 2) utrwalacz zawierający kwas taninowy.

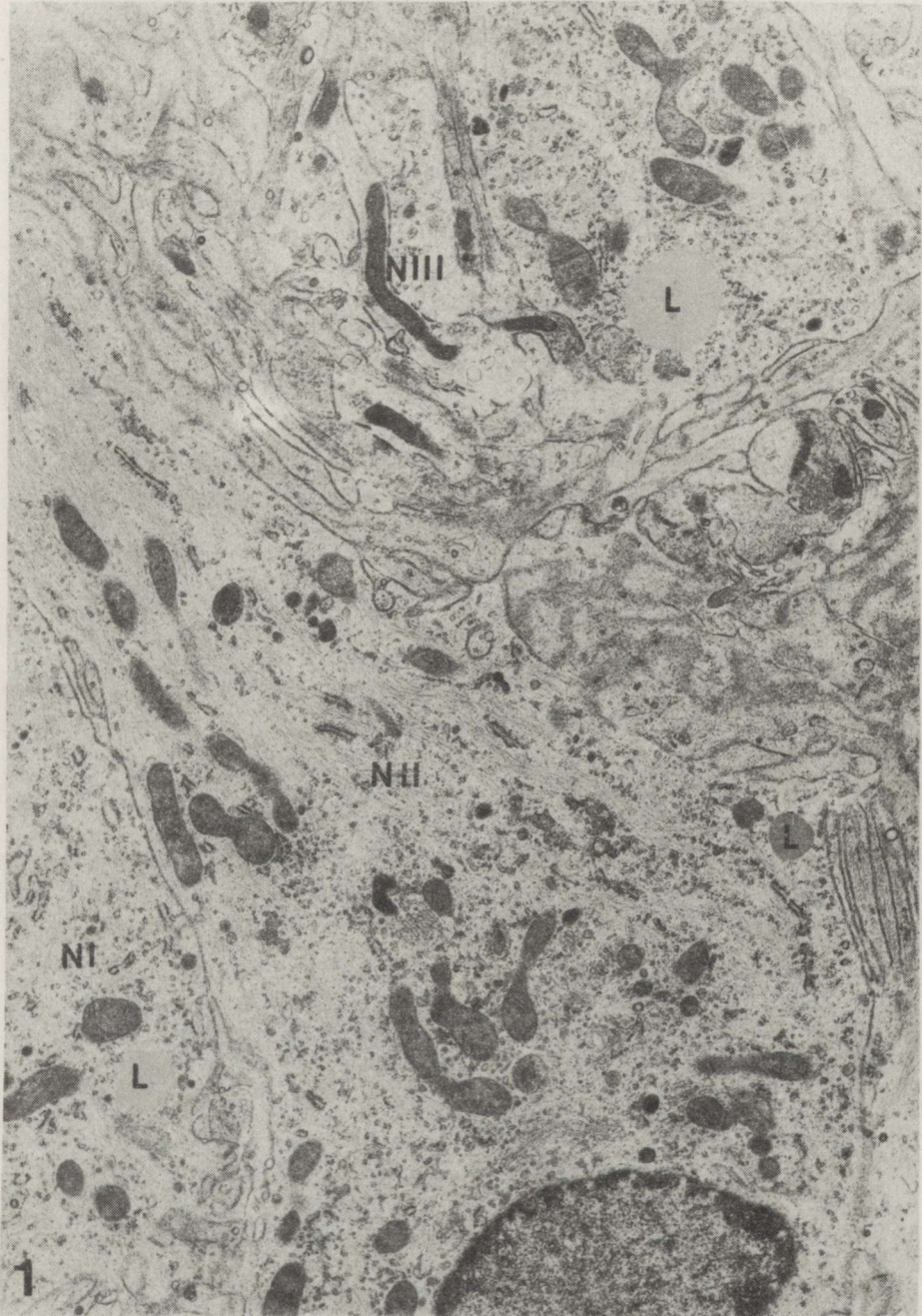
Obie techniki utrwalania zostały szczegółowo omówione w pracy Walskiego i Borowicza (1988).

WYNIKI

Poczynione obserwacje neuronów jądra nadwzrokowego i jądra przykomorowego są podobne, dlatego też zostały przedstawione razem. Wyróżnione zostały natomiast grupy związane z odmiennym postępowaniem metodycznym.

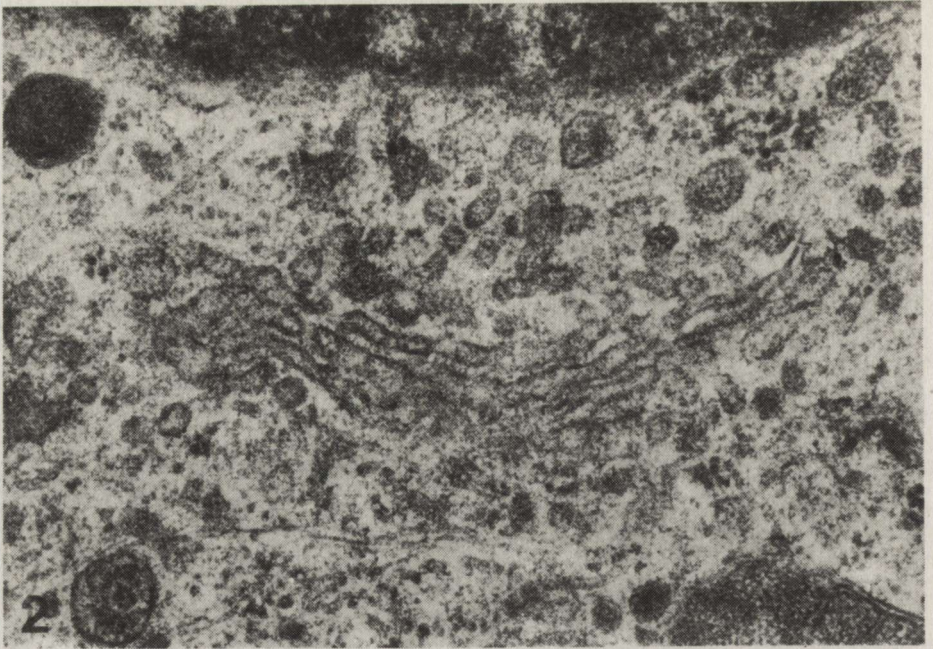
I. Obraz komórek nerwowych utrwalonych w aldehydach z jednoczesnym „dobarwianiem” błękitem alcjanu. Obserwacje dotyczyły przede wszystkim części perykarialnej neurocytów sekrecyjnych. Jądra komórek miały kształty regularne, bądź też wykazywały liczne wgłobienia. Przy otoczce jądrowej obserwowano duże nagromadzenie heterochromatyny. W części przyjądrowej komórki zwracał uwagę umiarkowanie rozbudowany kompleks Golgiego (ryc. 1). Pod dużym powiększeniem zaobserwowano we wnętrzu kanałów oraz w pęcherzykach kompleksu Golgiego cząstki gęstego materiału (ryc. 2). Siateczka śródplazmatyczna nie zawsze tworzyła charakterystyczne układy równoległych względem siebie kanałów. W strefie perykarialnej bywała ona pofragmentowana i rozproszona. W cytoplazmie znajdowały się duże ilości polirybosomów oraz pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne. Zwracały uwagę liczne formacje lizosomów, zróżnicowanych zarówno pod względem wielkości, jak i zawartości wypełniającego je materiału. Małe lizosomy o średnicy nie przekraczającej $0,2 \mu\text{m}$, o elektronowo gęstej zawartości najczęściej były zlokalizowane w strefie kompleksu Golgiego (ryc. 3). Często też występowały tu duże formy lizosomów o średnicy $0,5 \mu\text{m}$, wypełnione cząstkami wielkości rybosomów oraz tworami błonowymi (ryc. 4). Obserwowano też kuliste lizosomy o średnicy $1-2 \mu\text{m}$, wypełnione dość jednorodnym elektronowogęstym materiałem (ryc. 3). Pod dużym powiększeniem niekiedy można w nich było identyfikować formy tubularne lub ziarniste. Niezależnie od wyżej opisanych postaci lizosomów w okolicy strefy Golgiego obserwowano ciała wielopęcherzykowe. W perykarionach obecne były również pojedyncze krople lipidów (ryc. 1, 5). W aksonalnych wypustkach nerwowych często występowały koliste formacje błonowe. Tworzyły one koncentryczne zwoje przypominające figury mielinowe.

Zastosowanemu w tych badaniach barwnikowi polikationowemu – błękitowi alcjanu, przypisać należy lepsze uwidocznienie elementów szkieletu komórkowego (ryc. 3, 5, 6). W części przyjądrowej widoczne były neurotubule rozmieszczone pomiędzy organellami komórkowymi. W obwodowych obszarach neurocytów, zwracała uwagę znaczna ilość neurofilamentów o grubości około 10 nm . Włókienka te najczęściej ułożone były równolegle względem siebie; liczebność neurofilamentów i ich upakowanie sprawiały wrażenie całkowitego wypełnienia tych obszarów komórki (ryc. 7). W wypustkach komórek nerwowych obserwowano liczne neurotubule (ryc. 8). Została uwidoczniiona również delikatna siateczka mikrofilamentów łącząca między sobą ściany poszczególnych neurotubul. W strukturach neuropilu obserwowano pasmowato ułożony homogeny materiał o średniej gęstości elektronowej (ryc. 9).

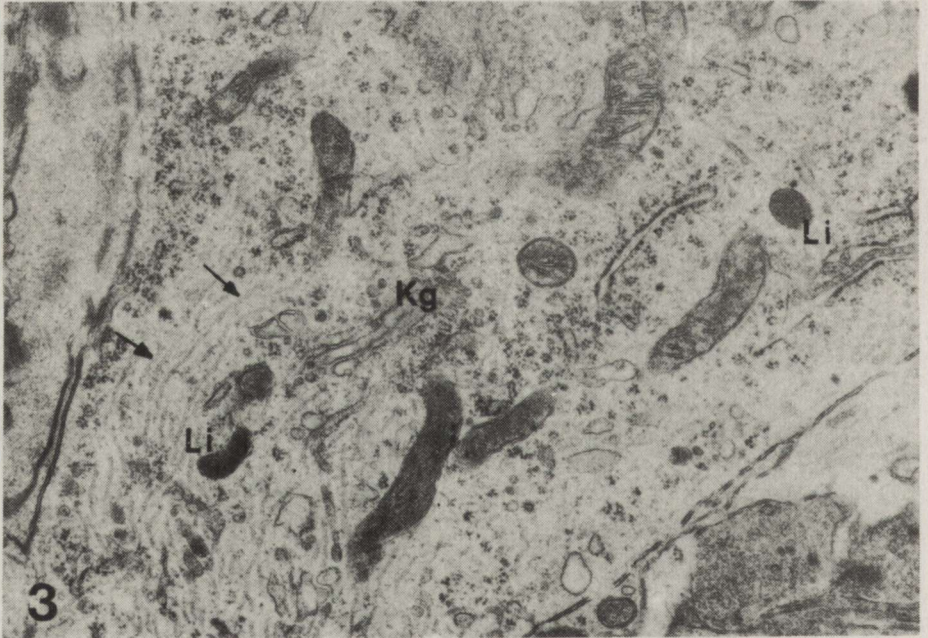


Rys. 1. Reakcja z błękitem alcjana. Fragmenty trzech neuronów jądra nadwzrokowego (NI, NII, NIII) z obfitym materiałem włóknikowym. Obecne krople lipidów (L). Pow. 9000 ×

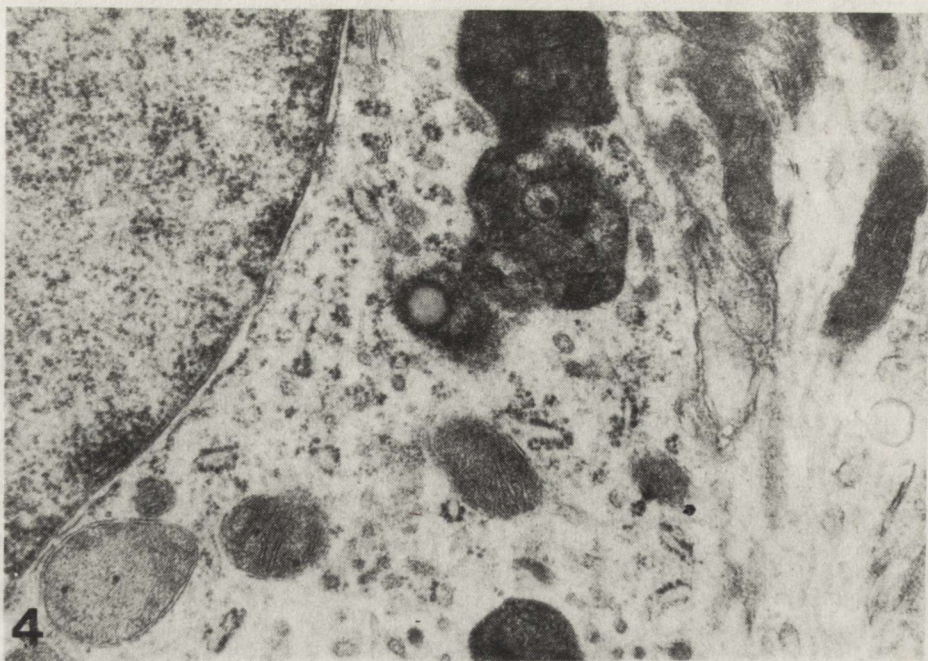
Fig. 1. Reaction with Alcian blue. Supraoptic nucleus. Fragments of three neurons (NI, NII, NIII) with abundant filamentous material. Lipid droplets (L) are present. ×9000



Ryc. 2. Reakcja z błękitem alcjanu. Neuron jądra nadwzrokowego. W zbiornikach i pęcherzykach kompleksu Golgiego widoczny materiał o średniej gęstości. Pow. 50 000 ×
 Fig. 2. Reaction with Alcian blue. Fragment of neuron from supraoptic nucleus. Cisterns and vesicles of Golgi complex containing material of moderate density are visible. ×50 000

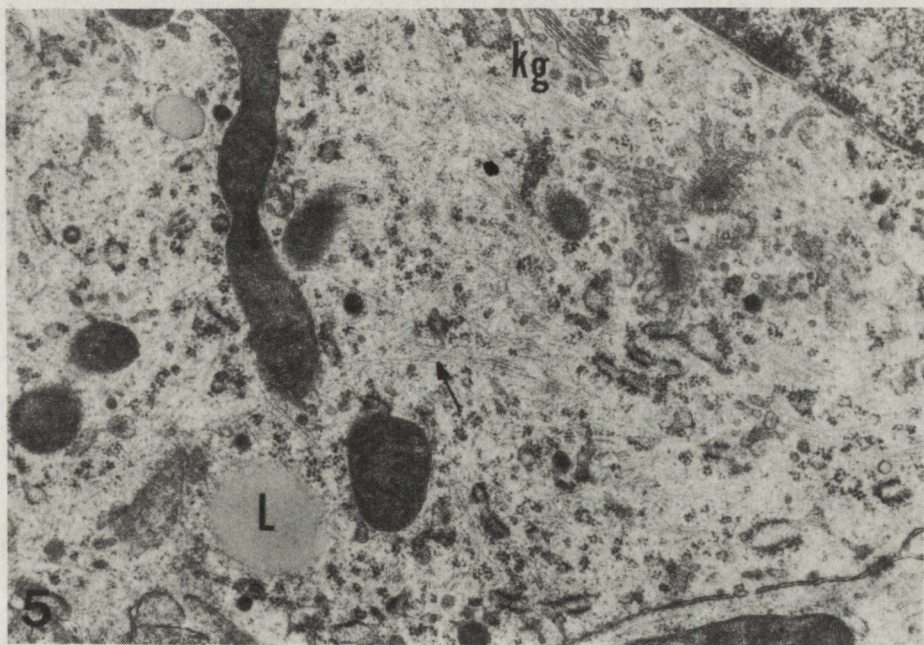


Ryc. 3. Reakcja z błękitem alcjanu. Fragment perykarionu neuronu jądra przykomorowego, w którym widoczny jest kompleks Golgiego (Kg) oraz lizosomy (Li). W sąsiedztwie kompleksu Golgiego liczne neurotubule (strzałki). Pow. 18 000 ×
 Fig. 3. Reaction with Alcian blue. Paraventricular nucleus. In neuronal perikaryon Golgi complex (Kg) and lysosomes (Li) are visible. In the vicinity of Golgi complex abundant neurotubules are accumulated (arrows). ×18 000



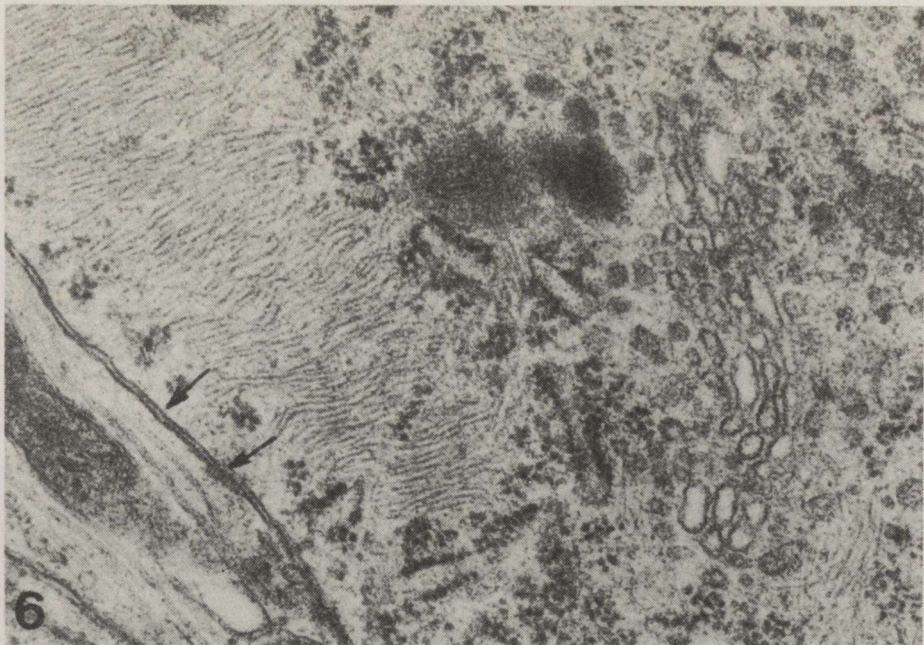
Ryc. 4. Reakcja z błękitem alcjanu. Fragment perykarionu neuronu jądra przykomorowego, w którym widoczny jest płatowaty fagosom wypełniony ziarnistym materiałem, profilami tworów błonowych oraz ziarnami lipidów. Pow. 40 000 ×

Fig. 4. Reaction with Alcian blue. Paraventricular nucleus. Neuronal cytoplasm with large phagosome filled with granular material, membrane profiles and lipid granules is visible. × 40 000



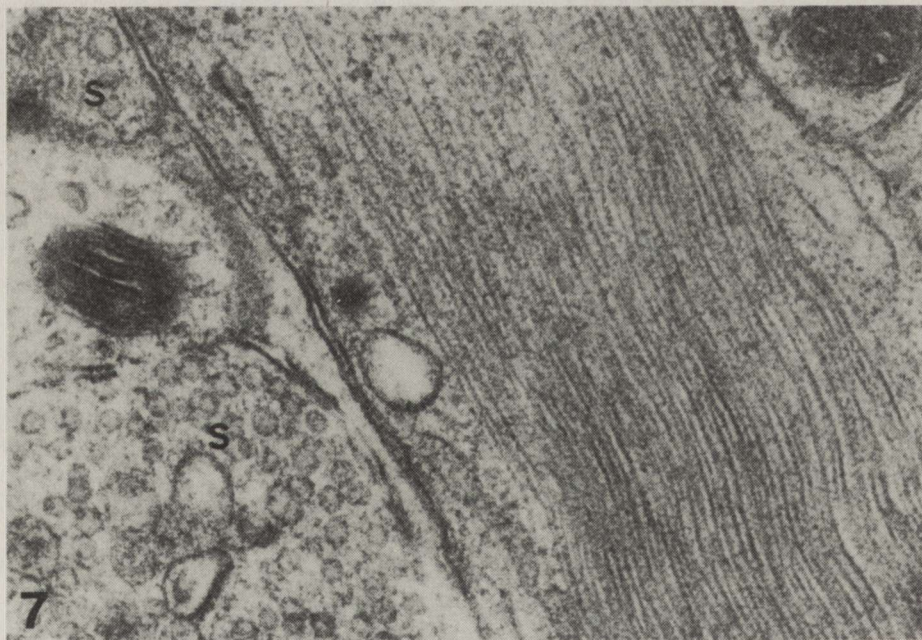
Ryc. 5. Reakcja z błękitem alcjanu. We fragmencie perykarionu komórki nerwowej jądra nadwzrokowego widoczny kompleks Golgiego (Kg), pofragmentowana siateczka śródplazmatyczna, ciała gęste, krople lipidów (L) oraz elementy szkieletu komórkowego: neurotubule i liczne wiązki filamentów pośrednich rozmieszczone chaotycznie (strzałka). Pow. 25 000 ×

Fig. 5. Reaction with Alcian blue. Supraoptic nucleus. Fragment of neuronal perikaryon with Golgi complex (Kg), fragmented endoplasmic reticulum, dense bodies, lipid droplets (L), and cytoskeleton elements: neurotubules and abundant bundles of intermediate filaments irregularly distributed (arrow). × 25 000



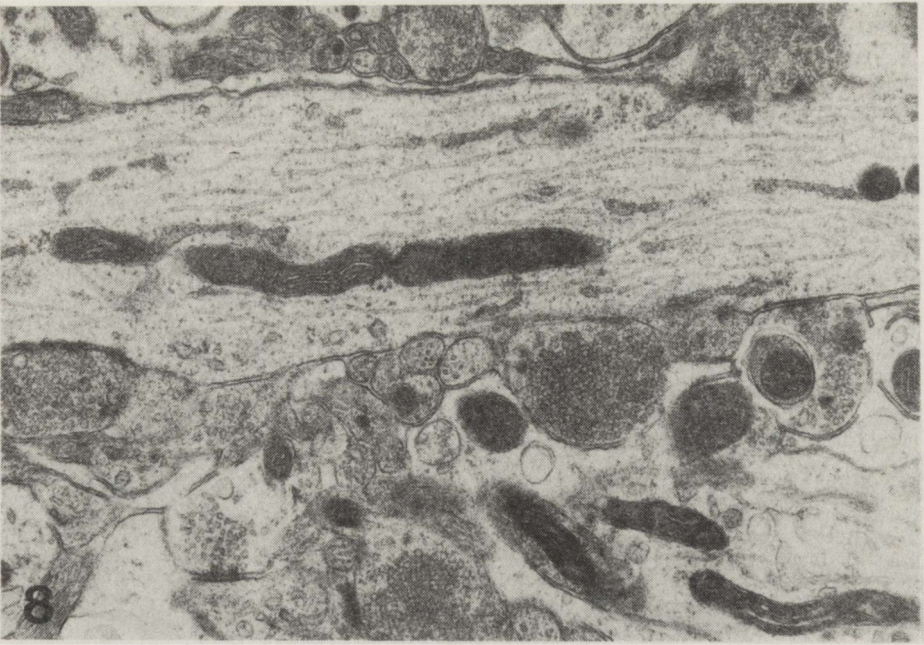
Ryc. 6. Reakcja z błękitem alcjanu. We fragmencie perykaryalnym neuronu jądra nadwzrokowego widoczny jest kompleks Golgiego, pofragmentowana siateczka śródplazmatyczna ziarnista oraz bardzo liczne neurofilamenty ułożone równolegle względem siebie, a prostopadle do błony plazmatycznej (strzałki). Pow. 50 000 ×

Fig. 6. Reaction with Alcian blue. Supraoptic nucleus. In the fragment of neuronal perikaryon Golgi complex, fragmented granular endoplasmic reticulum and abundant neurofilaments are visible. Parallel bundles of the latter are perpendicularly arranged towards cytoplasmic membrane (arrows). × 50 000



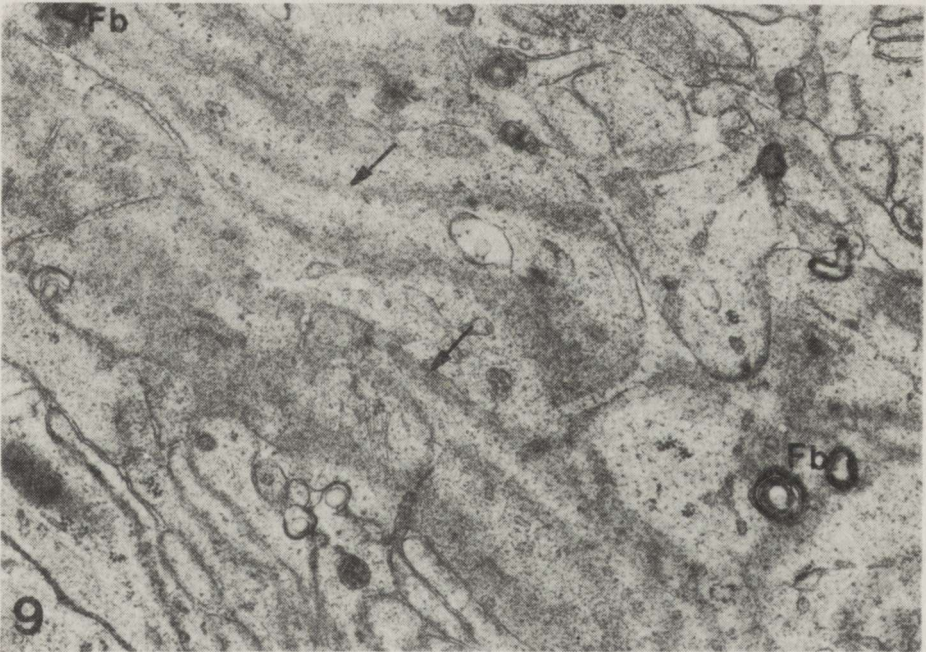
Ryc. 7. Reakcja z błękitem alcjanu. Fragment wypustki nerwowej jądra przykomorowego w całości wypełnionej neurofilamentami ściśle przylegającymi do siebie o przebiegu równoległym, zgodnym z osią długą wypustki. Do włókna nerwowego przylegają zakończenia synaptyczne. (S). Pow. 60 000 ×

Fig. 7. Reaction with Alcian blue. Fragment of a nerve process from the paraventricular nucleus densely filled with neurofilaments, parallelly arranged along the process axis. Synaptic endings (S) in the immediate vicinity of nerve process. × 60 000



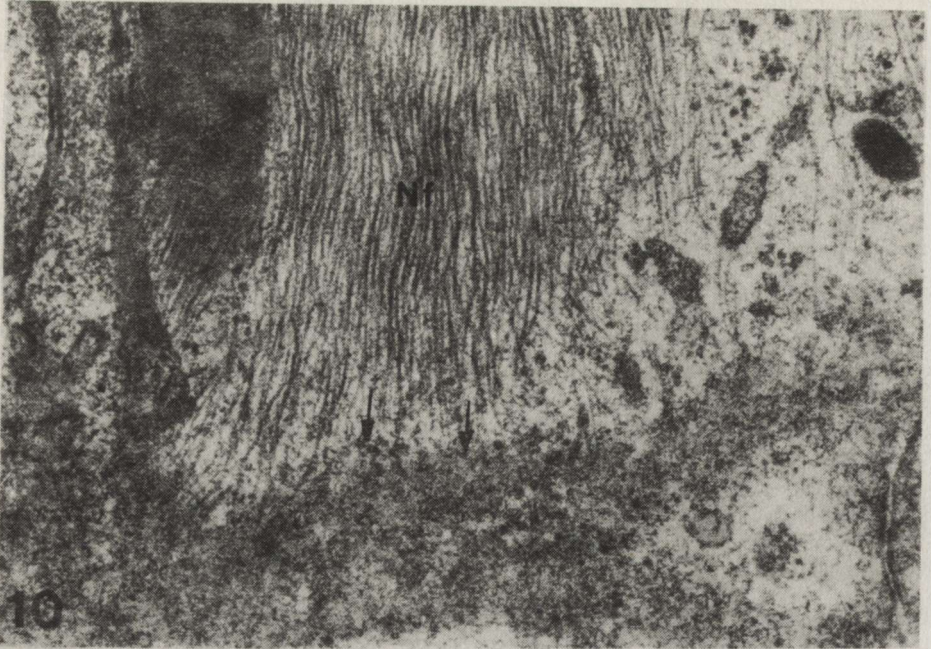
Ryc. 8. Reakcja z błękitem alcjanu. W neuropilu jądra nadwzrokowego widoczna wypustka osiowa komórki, w której są widoczne neurotubule, delikatna siateczka mikrofilamentarna oraz mitochondria. Do włókna nerwowego przylegają liczne zakończenia synaptyczne. Pow. 28 000 ×

Fig. 8. Reaction with Alcian blue. Neuropil of supraoptic nucleus comprising nerve cell process in which neurotubules, delicate network of microfilaments and mitochondria are visible. Numerous synaptic endings are localized along nerve cell process. × 28 000



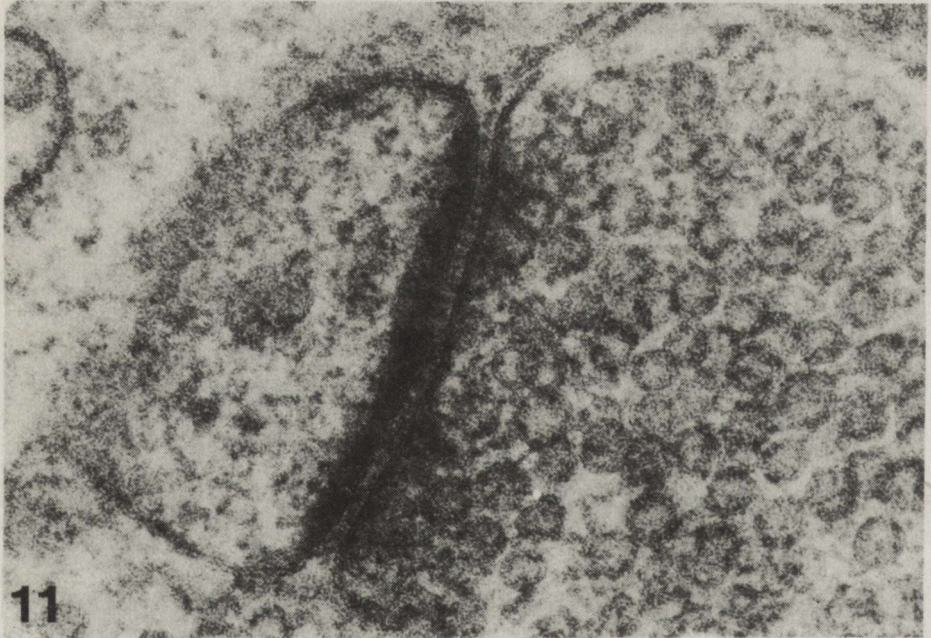
Ryc. 9. Reakcja z błękitem alcjanu. W neuropilu jądra nadwzrokowego widoczny drobnowlókienny materiał tworzący pasmowate układy (strzałki), o średniej gęstości elektronowej. Obecne formacje błonowe koncentrycznie zwinięte (Fb). Pow. 26 000 ×

Fig. 9. Reaction with Alcian blue. Neuropil of supraoptic nucleus containing fine fibrillary material forming irregularly distributed bundles of moderate electron density is visible. Concentrically arranged membrane structures (Fb) are seen. × 26 000



Ryc. 10. Reakcja z błękitem alcjanu. Fragment ryc. 9. Widoczny wzajemny układ neurofilamentów (NF) i drobnowłókienkowego materiału (strzałki). Pow. 65 000 ×

Fig. 10. Reaction with Alcian blue. Fragment of Fig. 9. Interrelations of neurofilaments (NF) and fine-fibrillary material (arrows) are demonstrated. × 65 000



Ryc. 11. Reakcja z błękitem alcjanu. Jądro przykomorowe. Na powierzchni błon ograniczających szczelinę synaptyczną widoczny drobnowłókienkowy materiał, który w części postsynaptycznej ma bogatszy rysunek. Kolbka synaptyczna w całości wypełniona pęcherzykami. Pow. 150 000 ×

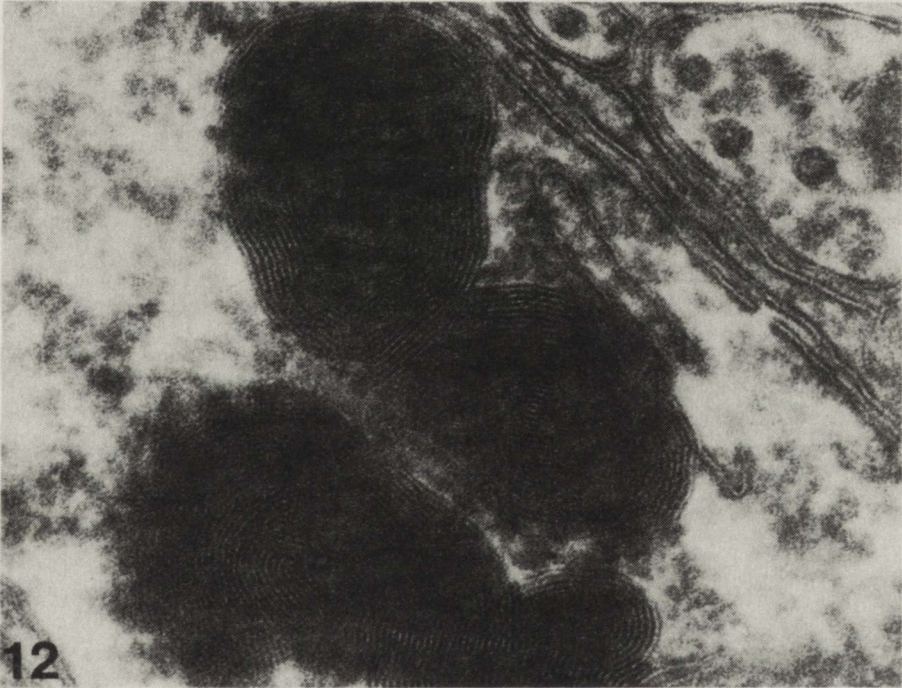
Fig. 11. Reaction with Alcian blue. Paraventricular nucleus. Surfaces of membranes limiting synaptic cleft covered with fine fibrillary material which demonstrates more characteristic features in the synaptic cleft and on the postsynaptic side. Presynaptic ending filled with synaptic vesicles. × 150 000

Pod powiększeniem rzędu 70 tysięcy razy stwierdzono, że ten pozornie homogeny materiał miał budowę drobnowłókienkową o grubości 5 nm. Niekiedy do tego drobnowłókienkowego materiału przylegały pasma ściśle upakowanych neurofilamentów (ryc. 10).

W pojedynczych włóknach zmielinizowanych występujących zwykle na obwodzie jąder neurosekrecyjnych obserwowano obkurczenie się aksoplazmy i „odstawanie” jej od osłonki mielinowej. W tych okolicach blaszki osłonki mielinowej ulegały rozwarstwianiu się oraz tworzyły się buławkowate struktury wpuklone do wnętrza włókna nerwowego.

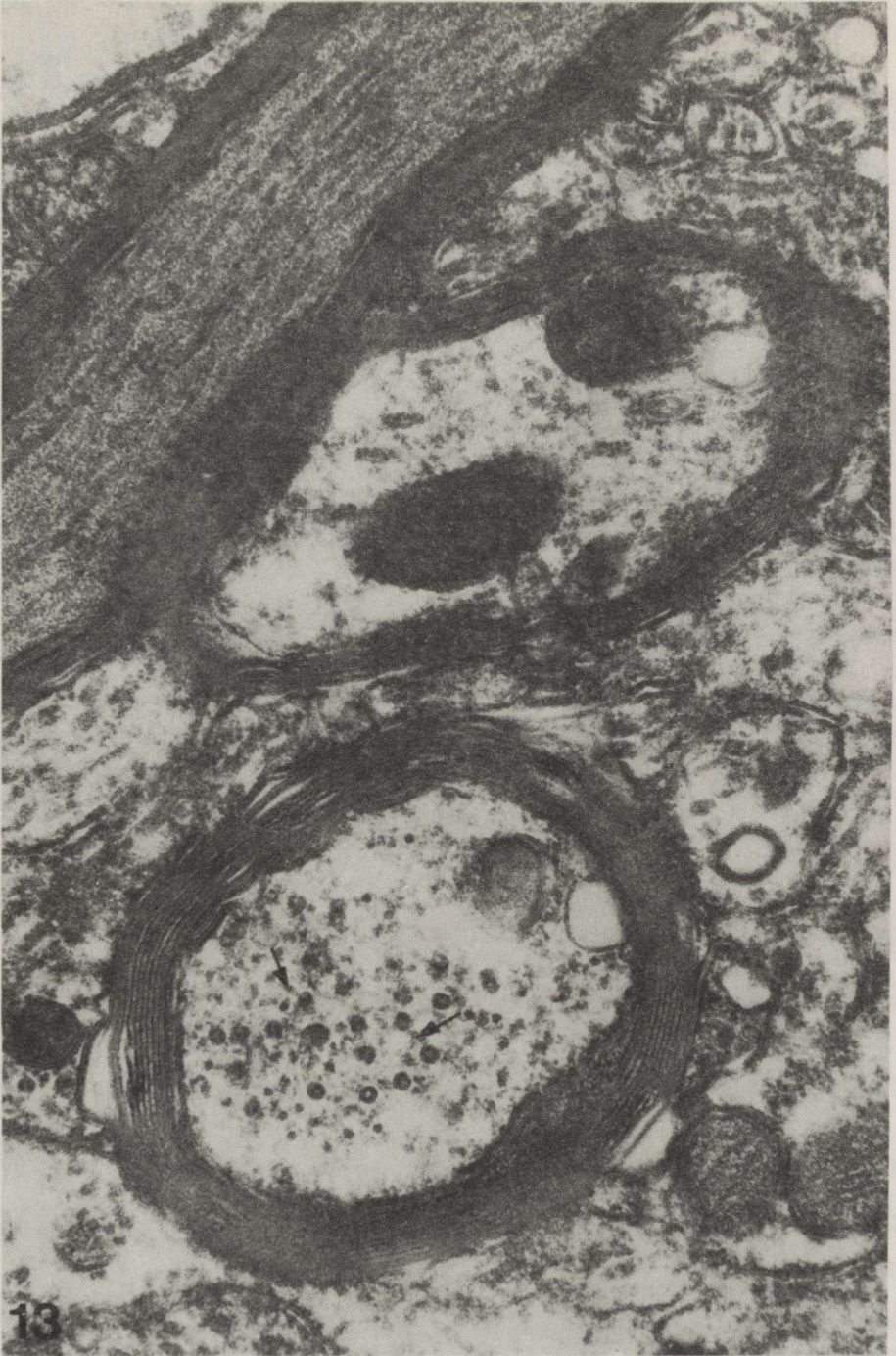
Zakończenia synaptyczne najczęściej wypełnione były przylegającymi do siebie pęcherzykami. Niekiedy obserwowano lizosomy wypełnione elektronowo-gęstym materiałem blaszkowatym. Strefa błon pre- i postsynaptycznych była dobrze zróżnicowana, ujawnione zostały też filamety błony postsynaptycznej (rys. 11).

II. Metoda utrwalania w aldehydach z dodatkiem kwasu taninowego oraz następowym dotrwalaniem w żelazocyjanku potasu wraz z czterotlenkiem osmu, pozwoliła na dokonanie dodatkowych obserwacji. W części perykariальной komórek neurosekrecyjnych przy strefie Golgiego obserwowano ciała



Ryc. 12. Utrwalanie z kwasem taninowym. We fragmencie wypustki nerwowej w jądrze nadwzrokowym widoczne struktury mielinopodobne. Pow. 180 000 ×

Fig. 12. Fixation with tannic acid. In a fragment of nerve process in the supraoptic nucleus myelin-like structures with fingerprint pattern are visible. ×180 000



Ryc. 13. Utrwalanie z kwasem taninowym. W zmielinizowanych aksonach jądra nadwzrokowego widoczne profile ścian neurotubul utworzone z protofilamentów. Widoczne filamety przylegające do ścian neurotubul (strzałki). Pow. 60 000 ×

Fig. 13. Fixation with tannic acid. In myelinated fibers in supraoptic nucleus profiles of neurotubule walls, formed of protofilaments are visible. Filaments adjacent to neurotubule walls are seen (arrows). × 60 000

wielopęcherzykowe, ciała gęste oraz struktury utworzone z błon koncentrycznie ułożonych względem siebie. Niekiedy struktury te posiadały w części centralnej homogenne gęste elektronowo materiał. Również zróżnicowany był ich kształt: od form kulistych do eliptycznych (ryc. 12). Podobne formacje obserwowano również we włóknach nerwowych. Kwas taninowy ujawnił na przekrojach poprzecznych włókien nerwowych zróżnicowaną strukturę ściany neurotubul. Dobre uwidocznienie neurotubul pozwoliło też zwrócić uwagę na ich nierównomierne rozłożenie (ryc. 13). Ujawniła się też zróżnicowana gęstość cytoplazmy aksonalnej. W niektórych fragmentach osłonki mielinowej jej blaszki uległy rozwarstwieniu. Rozwarstwione blaszki osłonki wpuklały się do włókna aksonalnego.

OMÓWIENIE

Neurony jąder sekrecyjnych szczurów poddawanych krótkotrwałemu niedokrwieniu, w zastosowanym modelu doświadczalnym (Gajkowska 1987), miały na ogół prawidłową budowę ultrastrukturalną, sporadycznie obserwowano tzw. neurony ciemne. Podobnie Ito i wsp. (1975) zmiany w tkance mózgowej gerbilla w niedokrwieniu wywołanym podwiązaniem tętnic szyjnych obserwowali dopiero po dłuższym czasie przeżycia zwierzęcia. Wymienieni autorzy występowanie późnych zmian w tkance mózgu wiązali ze zjawiskiem dojrzewania procesu patologicznego.

Nasze badania dotyczyły jąder neurosekrecyjnych szczurów w dwa tygodnie po pięciominutowym całkowitym zatrzymaniu krążenia. W obrębie perykarionów komórek neurosekrecyjnych zmiany dotyczyły strefy Golgiego. W sąsiedztwie niewielkich spłaszczonych cystern i nielicznych pęcherzyków obserwowano sporadycznie pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne. Również siateczka śródplazmatyczna szorstka była bardzo ubogo reprezentowana w tych rejonach komórki. Spostrzeżenia te mogą świadczyć o zmniejszeniu syntezy substancji neurohormonalnej. Gajkowska (1987) podaje, że po recyrkulacji krwi w następstwie krótkotrwałego niedokrwienia mózgu dochodzi do wzmożonej aktywności neuronów sekrecyjnych. Przemawia za tym rozbudowana strefa Golgiego oraz obecność dużej ilości ziaren neurosekrecyjnych. Natomiast w dalszych okresach po przebytych incydencie niedokrwicznym może dojść do załamania się metabolizmu tych komórek.

W perykarionach komórek neurosekrecyjnych, jak i również w ich wypustkach stwierdziliśmy stosunkowo duże ilości lizosomów o zróżnicowanej zawartości, wielkości i kształcie. Obecne też były mikrokrople lipidów. Z badań biochemicznych Domańskiej-Janik i wsp. (1982) wynika, że w następstwie niedotlenienia mózgu następuje częściowa degradacja łańcuchów węglowodanowych glikolipidów, zwłaszcza cerebrozydów błon cytoplazmatycznych, spowodowana wzrostem aktywności specyficznych hydrolaz fosfolipidowych. Te badania biochemiczne mogą potwierdzić nasze obserwacje, a zarazem wskazu-

ją na mechanizm powstawania dużych lizosomów wypełnionych materiałem błonowym.

W błonach synaptycznych wielu badaczy stwierdzało dużą zawartość gangliozydów i kwasów sialowych (Hanssen i wsp. 1977; Yohe i wsp. 1980). Domańska-Janik i wsp. (1982) postulują, iż niedotlenienie ma bezpośredni wpływ na zawartość gangliozydów wiążących kwas sialowy w błonach synaptycznych. Wyniki te mogą przeto być przydatne do wytłumaczenia powstawania lizosomów w zakończeniach synaptycznych w naszym materiale.

W osłonkach mielinowych obserwowaliśmy rozwarstwianie się blaszek oraz tworzenie się „buławkowatych” struktur. Badania biochemiczne Wendera i wsp. (1987) wykazują, iż ostre niedotlenienie powoduje przesunięcie ilościowe w zakresie frakcji fosfolipidowych, co doprowadza do uszkodzenia struktury molekularnej osłonki mielinowej. Cullen (1988) stosując technikę „freeze-fracture” do badania degenerujących neuronów, wskazał na zmniejszenie się ilości zgrupowań cząsteczek białkowych na powierzchni blaszek mielinowych, przypisując tym białkom zasadniczą rolę w zachowaniu spistości osłonki. Tak więc można przypuszczać, iż w ocenionych przez nas warunkach dochodzi do zmian w lipidach i białkach blaszek osłonek mielinowych.

W badanym materiale zwróciliśmy szczególną uwagę na elementy szkieletu komórkowego w części perykarialnej oraz w wypustkach komórek nerwowych. Obrazy te zdecydowanie odbiegały od tych, które obserwowaliśmy w materiale kontrolnym (Walski i Borowicz 1988). W części perykarialnej obecne były stosunkowo liczne neurotubule; ich rozmieszczenie sprawiało wrażenie separowania poszczególnych organelli komórkowych. W wypustkach komórek nerwowych biegingły one równoległe do osi długiej aksonów. W niektórych włóknach można było zaobserwować ogniskowe skupienie się neurotubul. Zwiększona była też ilość neurofilamentów zarówno w części perykarialnej, jak i w częściach obwodowych neuronów. W tych ostatnich ilość neurofilamentów była tak duża, że wypełniały one niekiedy bez reszty te obszary komórki. Podobne obserwacje zostały poczynione przez Donaghy i wsp. (1988), a wcześniej przez Jędrzejowską i Drac (1977) w aksonach pochodzących od chorych z tzw. neuropatią olbrzymich aksonów. Wraz ze zwiększeniem się ilości neurofilamentów następowało wyraźne zmniejszenie odległości między nimi. To zmniejszenie odległości jest tłumaczone uszkodzeniem „mechanizmu mostków poprzecznych” odpowiedzialnego za uszeregowanie neurofilamentów (Donaghy i wsp. 1988; Kwak, Matus 1988; Matus 1988). Na obecnym etapie badań trudne jest dla nas wyjaśnienie powstawania pasm złożonych ze zbrylonych drobnych włókień. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleźliśmy wyjaśnienia tego zjawiska, a metody którymi dysponujemy nie dały podstaw do ich identyfikacji.

Uzyskane przez nas wyniki wskazują, iż krótkotrwałe niedokrwienie mózgu szczura w badanym modelu doświadczalnym sprowadza zmiany wyraźnie widoczne po dwutygodniowym przeżyciu. Zmiany zachodzące w budowie

względnie organizacji szkieletu komórkowego nie były dotychczas podnoszone w dostępnym nam piśmiennictwie. Są one zapewne wyrazem nieodwracalnych ograniczeń metabolizmu badanych komórek.

ELECTRON MICROSCOPIC CHANGES IN NEUROSECRETORY NUCLEI OF RAT HYPOTHALAMUS FOLLOWING GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA IN THE COURSE OF SHORT-TERM CLINICAL DEATH

Summary

Hypothalamic neurosecretory nuclei of rats in which short-term clinical death was experimentally induced, were examined electron-microscopically. Material for studies was taken two weeks after resuscitation of animals following 5 min cardiac and respiratory arrest. Application of aldehyde fixatives with Alcian blue as well as fixatives containing tannic acid revealed numerous additional ultrastructural features not visualized in routine electron microscopy.

The obtained results are indicative that short-term cerebral ischemia in rats results in ultrastructural abnormalities in neurosecretory hypothalamic nuclei, which appear after 2 weeks survival. These are electron microscope exponents of reduced secretory function, increased number of lysosomal structures and changes in cytoskeleton organization. They are accompanied by abnormalities in axoplasm and myelin sheaths. The authors consider those structural abnormalities as exponents of delayed irreversible metabolic changes of nerve cells.

REFERENCES

1. Cullen M. J.: Freeze-fracture analysis of myelin membrane changes in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol*, 1988, 17, 105–115.
2. Domańska-Janik K., Strosznajder J., Zalewska T.: Effect of ischemia and hypoxia on rat brain glycolipids. *J Neurosci Res*, 1982, 7, 363–370.
3. Donaghy M., King R. H. M., Thomas P. K., Workman J. M.: Abnormalities of the axonal cytoskeleton in giant axonal neuropathy. *J Neurocytol*, 1988, 17, 197–208.
4. Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i jądro przykomorowe podwzgórza szczura. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 131–146.
5. Hanssen H., Holmgren I., Svennerholm L.: Ultrastructural localization of cell membrane GM₁ ganglioside by cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74, 3782–3786.
6. Ito U., Spatz M. T., Walker K. J. T. Jr., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in mongolian gerbils. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1975, 32, 209–223.
7. Jędrzejowska H., Drac H.: Infantile chronic peripheral neuropathy with giant axons. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1977, 37, 213–217.
8. Korpachev W. G., Lysenkov S. P., Tiel L. Z.: Modelirovanie klinicheskoi smierti i postreanionnoi bolezni u krys. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 1982, 3, 78–80.
9. Kwak S., Matus A.: Denervation induces long-lasting changes in the distribution of microtubule proteins in hippocampal neurons. *J Neurocytol*, 1988, 17, 189–195.
10. Matus A.: Microtubule-associated proteins: Their potential role in determining neuronal morphology. *Annu Rev Neurosci* 1988, 11, 29–44.
11. Walski M., Borowicz J.: Badania mikroskopowo-elektronowe elementów szkieletu komórkowego neuronów jąder neurosekrecyjnych podwzgórza szczura. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 233–243.
12. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz T. Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowska A.: Effect of acute hypoxia on myelin lipids. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 107–115.

13. Yohe H. C., Uene K., Chang N. C., Glaser G. H., Yu R. K.: Incorporation of N-acetylmannosamine into rat brain subcellular gangliosides. Effects of pentylenetetrazol-induced convulsion on brain gangliosides. *J. Neurochem*, 1980, 34, 3, 560–568.

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

ANNA ZARĘBA-KOWALSKA, BARBARA GAJKOWSKA

WPLYW ISCHEMII NA ULTRASTRUKTURĘ JĄDRA OLBRZYMIOKOMÓRKOWEGO U SZCZURA

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

Z badań nad niedokrwieniem mózgu wynika, że wywołuje ono liczne zmiany fizjologiczne, biochemiczne i morfologiczne, zarówno w komponencie glejowym, jak i nerwowym. Zaburzenia mikrokrążenia mózgu po przebytych niedokrwieniu utrzymują się przez wiele godzin po przywróceniu krążenia krwi i stanowią istotny czynnik uszkadzający tkankę nerwową (Klatzo 1975, 1985). Jednym z elementów patogennych jest uszkodzenie poperfuzyjne (Hekmatpanah, Hekmatpanah 1986), które obok samego niedokrwienia, odgrywa istotną rolę w rozwoju uszkodzeń tkanki nerwowej (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983; Mossakowski, Gajkowska 1984). Istotną rolę w rozwoju poischemicznych nieprawidłowości odgrywa również zjawisko dojrzewania procesu patologicznego, polegające na nasilaniu się zmian w OUN wraz z upływem czasu po niedokrwieniu (Ito i wsp. 1975).

Wiadomo, że neurony poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego wykazują zróżnicowaną wrażliwość na niedokrwienie. Jak wykazały badania Mossakowskiego i wsp. (1986) neurony jądra olbrzymiomórkowego tworzą siatkowatego pnia mózgu (*nucleus reticularis gigantocellularis*) należą do struktur wybiórczo wrażliwych na niedokrwienie.

W bogatym piśmiennictwie dotyczącym ischemicznych i poischemicznych zmian ultrastrukturalnych w różnych obszarach ośrodkowego układu nerwowego i w różnych układach doświadczalnych, dane dotyczące zmian w jądrze olbrzymiomórkowym są skąpo reprezentowane (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1985, 1987).

Morfologia czynnościowa jądra olbrzymiomórkowego jest stosunkowo mało poznana, a piśmiennictwo z tego zakresu bardzo skąpe (Bowsher, Westman 1970). Z badań fizjologicznych wynika, że jądro olbrzymiomórkowe stanowi ważny ośrodek kojarzeniowy pomiędzy wieloma ośrodkami mózgu i rdzenia kręgowego (Bowsher i wsp. 1968; Guilbaud i wsp. 1973; Siegel 1979),

jądro to stanowi również ośrodek przekaźnictwa bodźców bólowych (Burton 1968; Casey 1971; Basbaum i wsp. 1978).

Celowa wydawała się ocena obrazów ultrastrukturalnych jądra olbrzymiomórkowego pnia mózgu szczura z dłuższym przeżyciem po krótkotrwałym (5 min), przejściowym niedokrwieniu mózgu. Jak wykazały badania Mossakowskiego i wsp. (1986), uszkodzenia neuronów w niektórych strukturach mózgowia, uznanych za wybiórczo wrażliwe na niedokrwienie, pojawiają się lub nasilają z kilkudniowym opóźnieniem, przeciwnie niż w okolicach uznanych za mniej wrażliwe. Obecna praca jest kontynuacją uprzednio prowadzonych badań, w których wykazano występowanie i utrzymywanie się zmian obrzękowych w obszarze olbrzymiomórkowym pnia mózgu w 7 dni po niedokrwieniu (Zaręba-Kowalska, Gajkowska 1988). W odróżnieniu od poprzedniego doświadczenia obserwacje przeprowadzono po dłuższym czasie przeżycia zwierząt, tj. po 14 i 30 dniach od wykonania zabiegu.

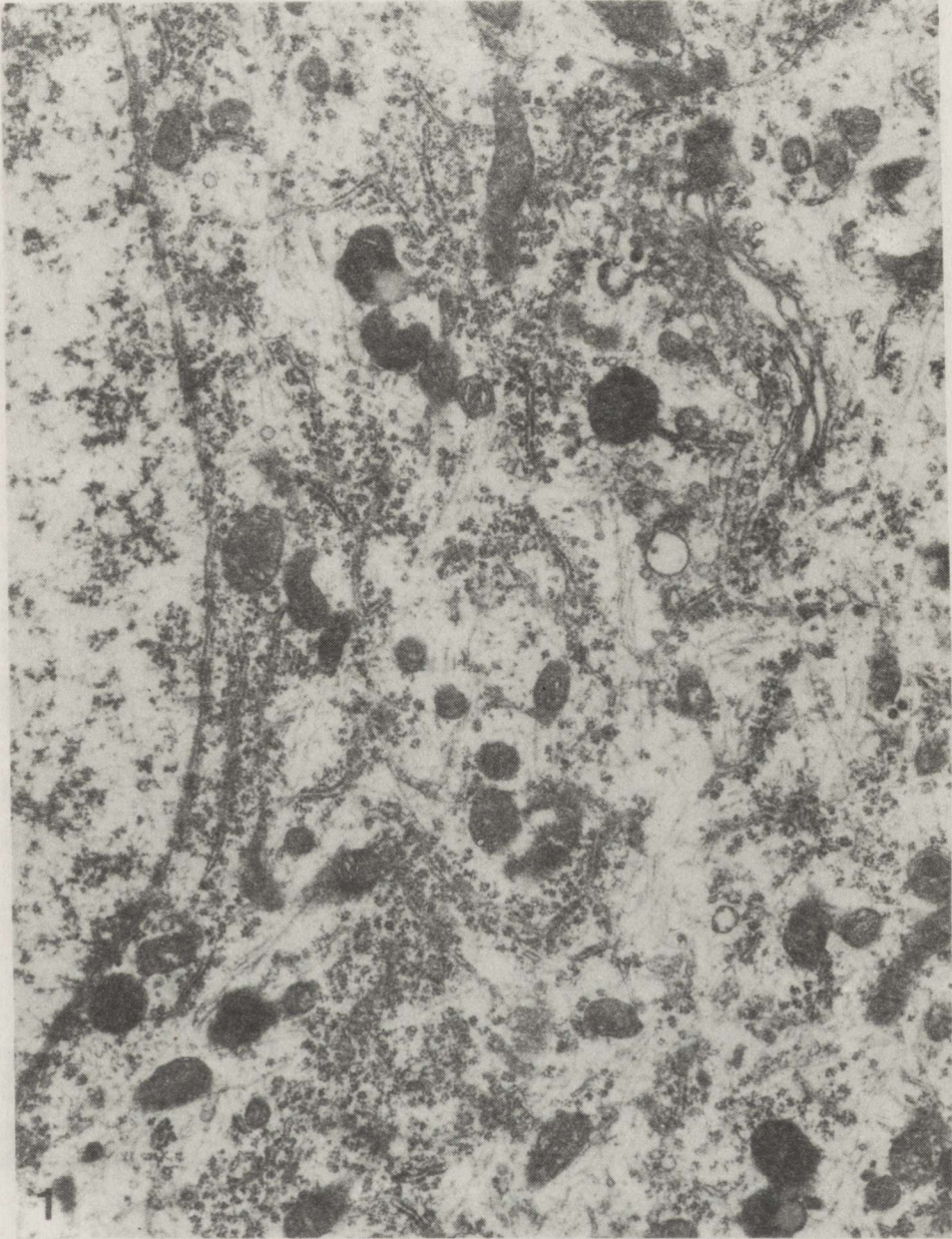
MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 10 dojrzałych szczurach szczepu Wistar, samicach o masie ciała 160–180 g. U 8 szczurów spowodowano śmierć kliniczną według metody Korpacheva i wsp. (1982). Czynności reanimacyjne podejmowano po 5 min od momentu zatrzymania czynności serca.

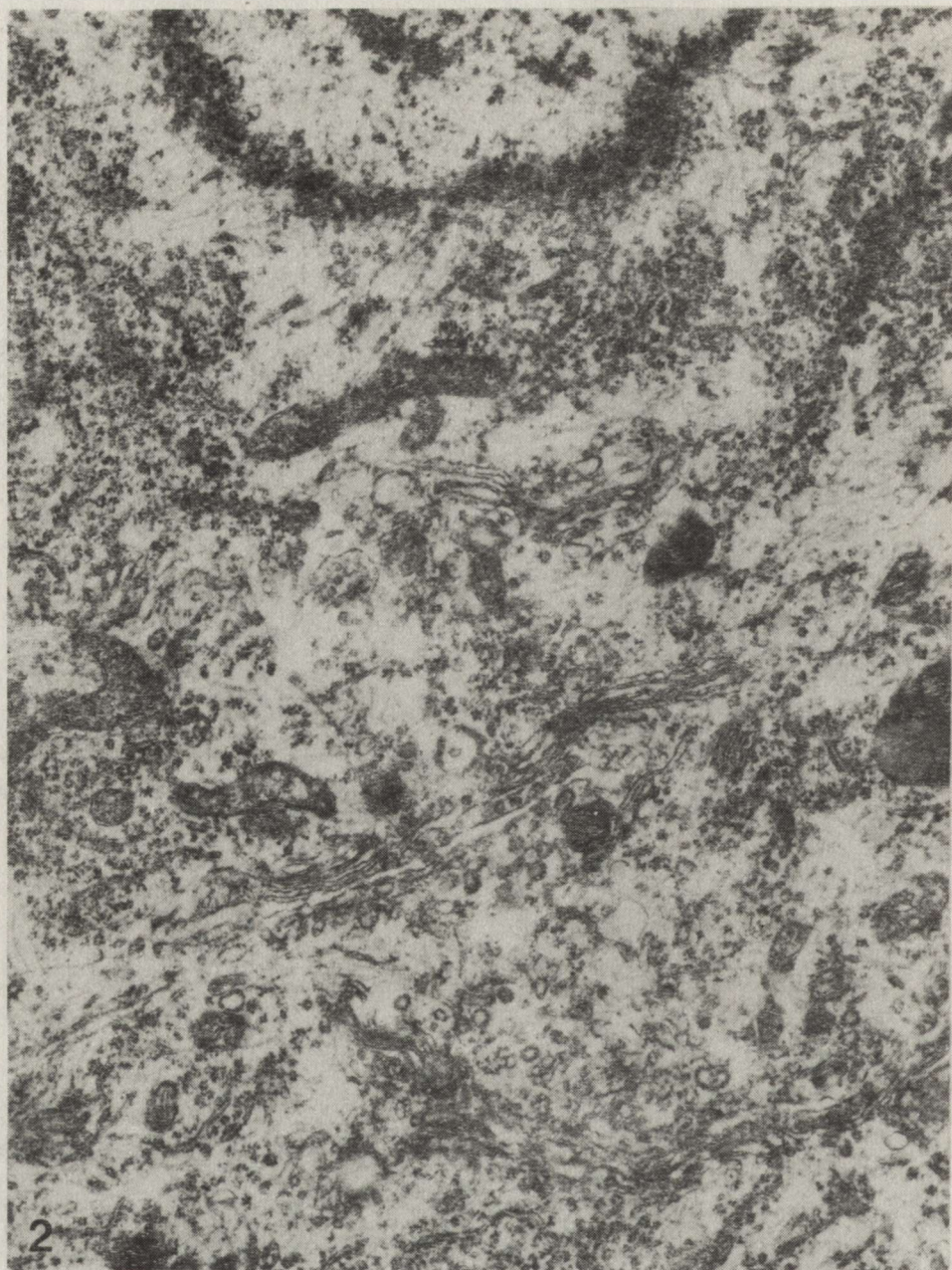
Zwierzęta doświadczalne uśmiercano, wykonując przezsercową perfuzję zbuforowanym roztworem paraformaldehydu i glutaraldehydu według Karnovskiego. Cztery zwierzęta zdekapitowano po 14 dniach po reanimacji, następne 4 po upływie 30 dni po doświadczeniu. Kontrolę badań stanowiły 2 szczury, które nie były poddane żadnym zabiegom. Do badań mikroskopowo-elektrowych pobierano wycinki z pnia mózgu zawierające jądro olbrzymiomórkowe. Następnie utrwalono je przez imersję według Karnovskiego, dotrwalano 1% OsO₄, 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

Ultrastruktura jądra olbrzymiomórkowego pnia mózgu szczura została uprzednio opisana (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1987), w związku z czym dokumentacja dotycząca budowy tego jądra u szczurów kontrolnych została pominięta. Należy jednak zwrócić uwagę na występowanie w tym obszarze dwóch typów neuronów, z których tylko jeden typ, tj. neurony olbrzymie, wykazywał reakcję na niedokrwienie (Zaręba-Kowalska, Gajkowska 1988). Neurony olbrzymie odznaczały się znacznymi rozmiarami perykarionów, kilkakrotnie przekraczającymi wielkością pozostałe neurony oraz bogato rozwiniętymi i wtórnie rozgałęziającymi się dendrytami. Zawierały one duże,



Ryc. 1. Fragment neuronu olbrzymiego, 14 dni po ischemii. W cytoplazmie widoczne liczne, drobne mitochondria, neurotubule, neurofilamenty oraz liczne lizosomy. Pow. 18 000 \times
Fig. 1. Fragment of large neuron. 14 days after ischemia. Numerous small mitochondria, neurotubules, neurofilaments, and numerous lysosomes are visible in cytoplasm. \times 18 000



Ryc. 2. Fragment neuronu olbrzymiego. 30 dni po ischemii. W cytoplazmie komórki widoczny dobrze rozwinięty kompleks Golgiego, obfita siateczka śródplazmatyczna ziarnista oraz liczne neurotubule i neurofilamenty, zarówno w strefie przyjądrowej, jak również w pozostałych obszarach cytoplazmy. Pow. 22 500 ×

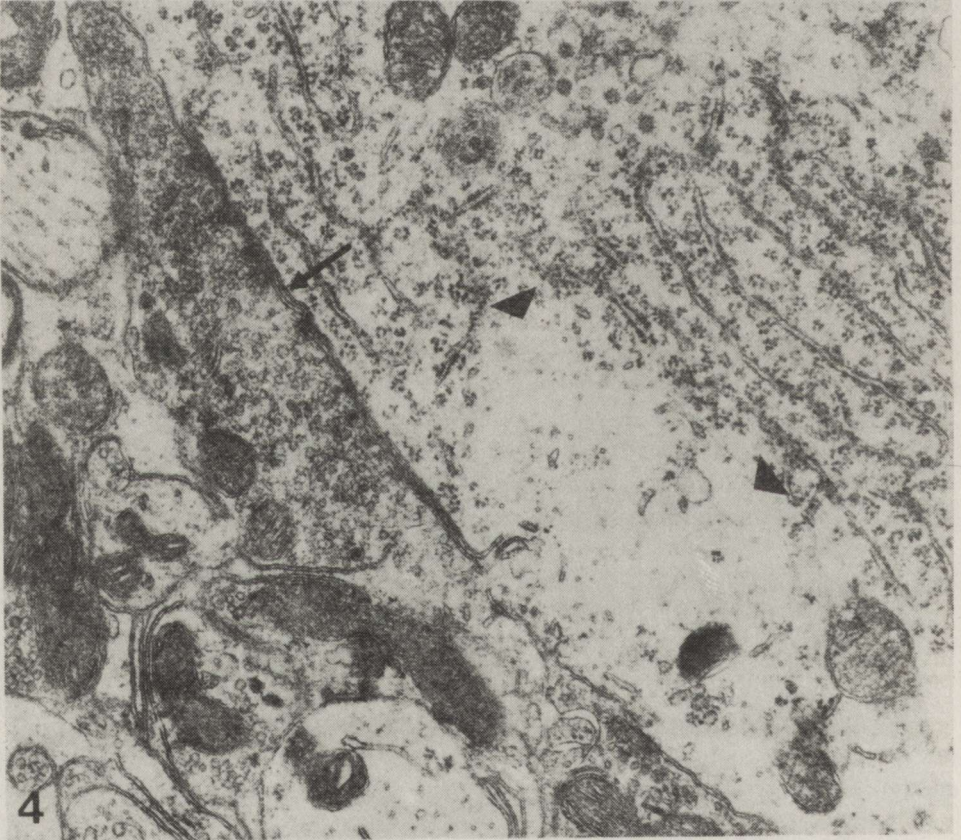
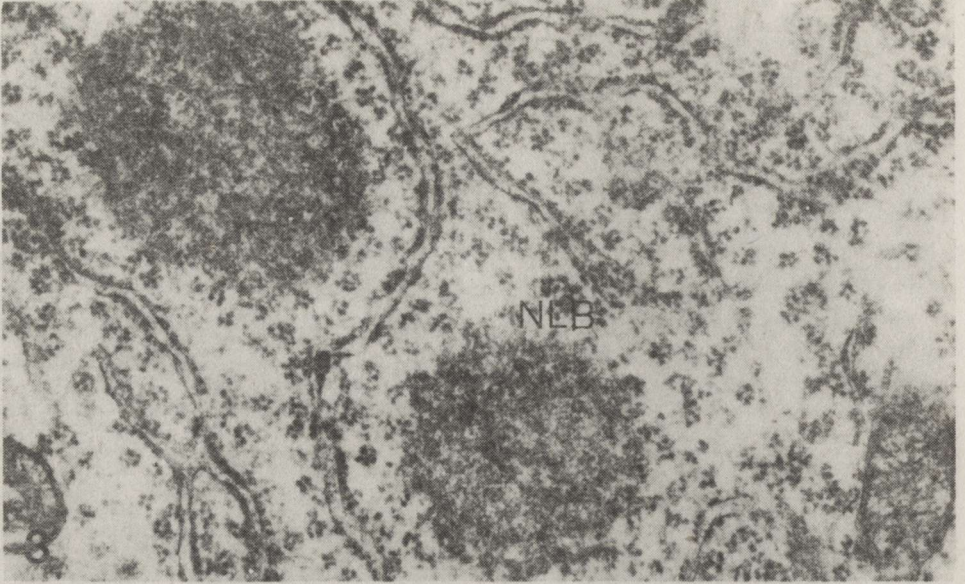
Fig. 2. Fragment of large neuron. 30 days after ischemia. Well developed Golgi complex, abundant granular endoplasmic reticulum, numerous neurotubules and neurofilaments are visible in various areas of cytoplasm. $\times 22\,500$

centralnie położone jądra z równomiernie rozproszoną chromatyną jądrową. Charakterystyczną cechą tych komórek była obfita siateczka śródplazmatyczna ziarnista, zajmująca rozległe obszary cytoplazmy. Kompleks Golgiego był dobrze rozwinięty, licznie występowały mitochondria odznaczające się znacznym polimorfizmem kształtu i wielkości. Powierzchnia ciała tych neuronów, jak również proksymalne odcinki dendrytów były pokryte zakończeniami presynaptycznymi. Drugi typ neuronów stanowiły małe neurony z nielicznymi dendrytami. Jądra tych neuronów były bogatsze w chromatynę i wykazywały zagęszczenia heterochromatyny pod otoczką jądrową. Siateczka śródplazmatyczna ziarnista oraz kompleks Golgiego były średnio rozwinięte. Znaczna część powierzchni tych neuronów kontaktowała się z komórkami glejowymi, naczyniami lub zmielinizowanymi aksonami. Zakończenia presynaptyczne na powierzchni małych neuronów były nieliczne.

Zwierzęta doświadczalne. Obserwacje morfologiczne przeprowadzono po 14 i 30 dniach po zabiegu. W obu grupach doświadczalnych stwierdzono podobną reakcję na niedokrwienie. Większość obserwowanych neuronów olbrzymich oraz neurony małe nie wykazywały zmian w budowie ultrastrukturalnej jądra i cytoplazmy w porównaniu z kontrolą. Na uwagę zasługiwała jednak obfitość elementów cytoskeletonu: neurotubul i neurofilamentów oraz wzrost liczby lizosomów i ciał lipidowych w cytoplazmie niektórych neuronów olbrzymich w czternastym dniu po zabiegu. Liczne neurotubule i neurofilamenty były obecne zarówno w strefie przyjądrowej tych komórek, jak również w wypustkach dendrytycznych i aksonalnych. W cytoplazmie neuronów obserwowano liczne, drobne mitochondria (ryc. 1, 2). Występowały także ciała jąderko-podobne (ryc. 3). Mniej liczne neurony olbrzymie wykazywały miejscowe przejaśnienia cytoplazmy (ryc. 4), bądź też zawierały elektronowo-przeziernie wakuole (ryc. 5). W neuronach tych stwierdzano równocześnie zmniejszenie się ilości elementów cytoskeletonu, neurotubul i neurofilamentów. Stwierdzono ponadto obrzmienie niektórych dendrytów oraz wypustek astrocytarnych. W cytoplazmie astrocytów występowały niekiedy elektronowo-przeziernie wakuole (ryc. 6, 7). Kolbki presynaptyczne połączeń akso-somatywnych na perykarionach oraz wypustkach neuronów olbrzymich nie wykazywały nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej (ryc. 4, 6, 7). Charakterystyczną zmianą obserwowaną w neuropilu, w dwa tygodnie i w miesiąc po ischemii, było rozwarstwienie blaszek mieliny niektórych włókien zmielinizowanych (ryc. 8).

OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują na występowanie stosunkowo niewielkich zmian ultrastrukturalnych w jądrze olbrzymiokomórkowym pnia mózgu szczura po krótkotrwałym, całkowitym niedokrwieniu. Zmiany obserwowane po 14 i 30 dniach od wykonania zabiegu miały podobny charakter i dotyczyły neuronów olbrzymich oraz astrogleju. Były one typowe dla



niedokrwienia i polegały na obrzmieniu dendrytów neuronów olbrzymich oraz astrocytów, a zwłaszcza ich wypustek. W cytoplazmie pojedynczych neuronów olbrzymich obserwowano przejaśnienia oraz liczne wakuole. Jak wykazywały uprzednie badania nad krótkotrwałym (2,5 min i 5 min), całkowitym niedokrwieniem mózgu (Zaręba-Kowalska, Borowicz 1987; Zaręba-Kowalska, Gajkowska 1988), wczesne zmiany obserwowane w neuronach olbrzymich bezpośrednio i w 3 godz. po przywróceniu krążenia krwi polegały na obrzmieniu mitochondriów. We wczesnym okresie (3 i 7) dni po zabiegu stwierdzono również zmiany w postaci obrzmienia struktur cytoplazmatycznych dotyczące neuronów olbrzymich oraz zmiany astrogleju, zwłaszcza w okolicach okołonaczyniowych. W jądrach neuronów olbrzymich obserwowano wtręty. Częstość ich występowania (Seite 1977) wiąże się ze stopniem aktywności komórek. Wyniki obecnych badań wskazują na utrzymywanie się, pomimo upływu czasu, zmian ultrastrukturalnych, a zatem na utrzymywanie się zaburzeń czynnościowych w tym obszarze mózgu.

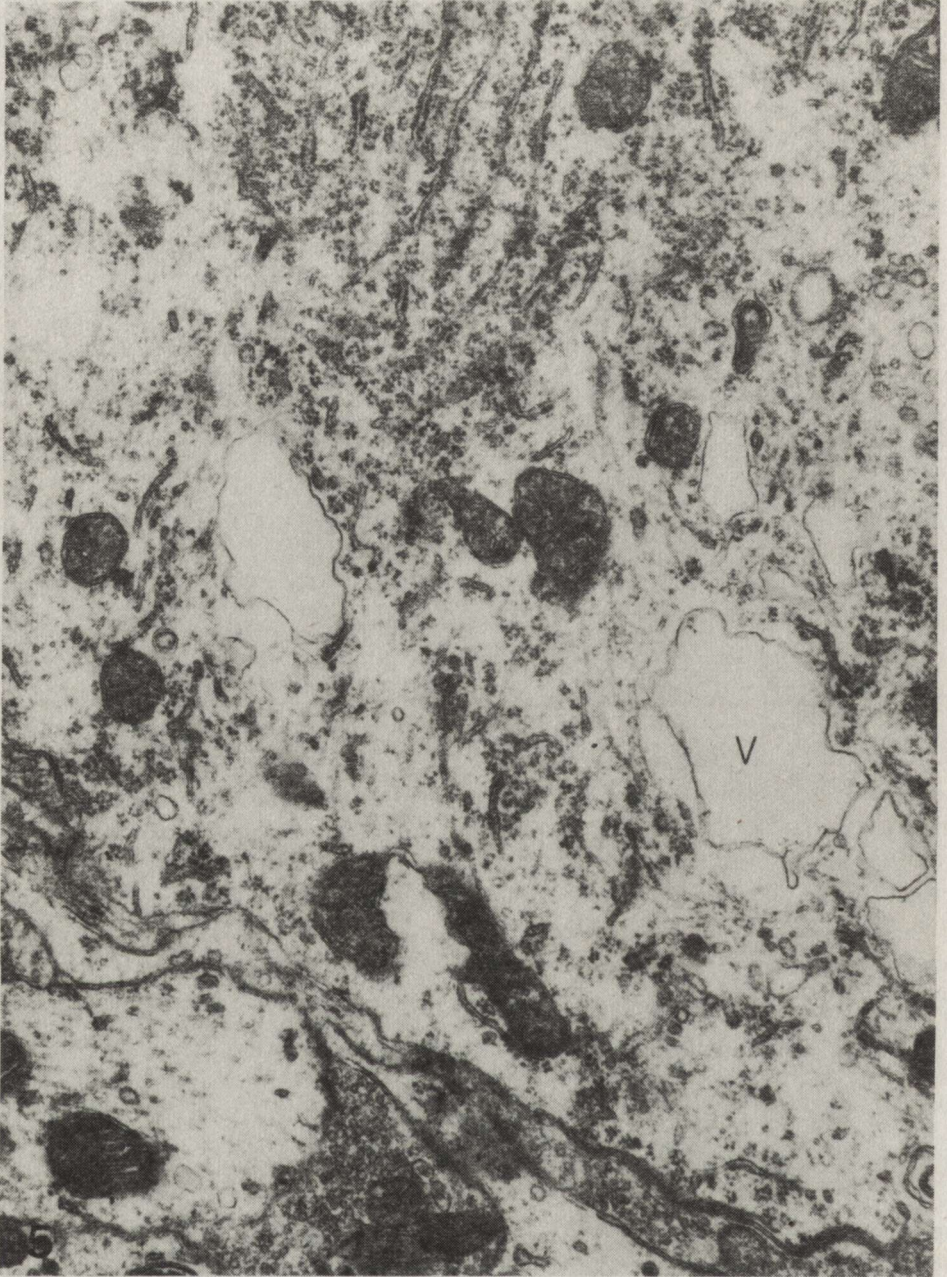
W piśmiennictwie jest stosunkowo niewiele doniesień dotyczących następstw krótkotrwałego, całkowitego niedokrwienia mózgu. Według Hossmanna i Zimmermanna (1974) całkowite niedokrwienie mózgu jest mniej uszkodzające dla OUN niż jego częściowe niedokrwienie. Strukturalne uszkodzenia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu mózgu mają zróżnicowany charakter w zależności od stosowanego modelu doświadczalnego i pojawiają się w różnym czasie po incydencie niedokrwieniowym (Hossmann, Sato 1970; Hossmann, Hossmann 1973; Mossakowski i wsp. 1986). Dotyczą one przede wszystkim formacji szarych i mają charakter bądź zmian uogólnionych z predylekcyjnym zajęciem kory mózgu i mózdzku (Nemoto i wsp. 1977; Kalimo i wsp. 1979; Pulsinelli, Brierley 1979), hipokampa (Mossakowski i wsp. 1989), bądź też są wybiórczo ograniczone do struktur podkorowych, głównie gałki bladej, prążkowiec i wzgórza (Hossmann, Zimmermann 1974; Marshall i wsp. 1975). Częste uszkodzenia komórek nerwowych obserwowano również w istocie czarnej, tworze siatkowatym pnia mózgu, a zwłaszcza w jego jądrze olbrzymiokomórkowym i jądrach szwu (Mossakowski i wsp. 1986). Szczególnie wrażliwy

Ryc. 3. Neuron olbrzymi. 30 dni po ischemii. Fragment cytoplazmy, w której widoczne są ciała jąderko-podobne (NLB). Pow. 45 000 ×

Fig. 3. Large neuron. 30 days after ischemia. Fragment of cytoplasm with nucleolus-like bodies (NLB). × 45 000

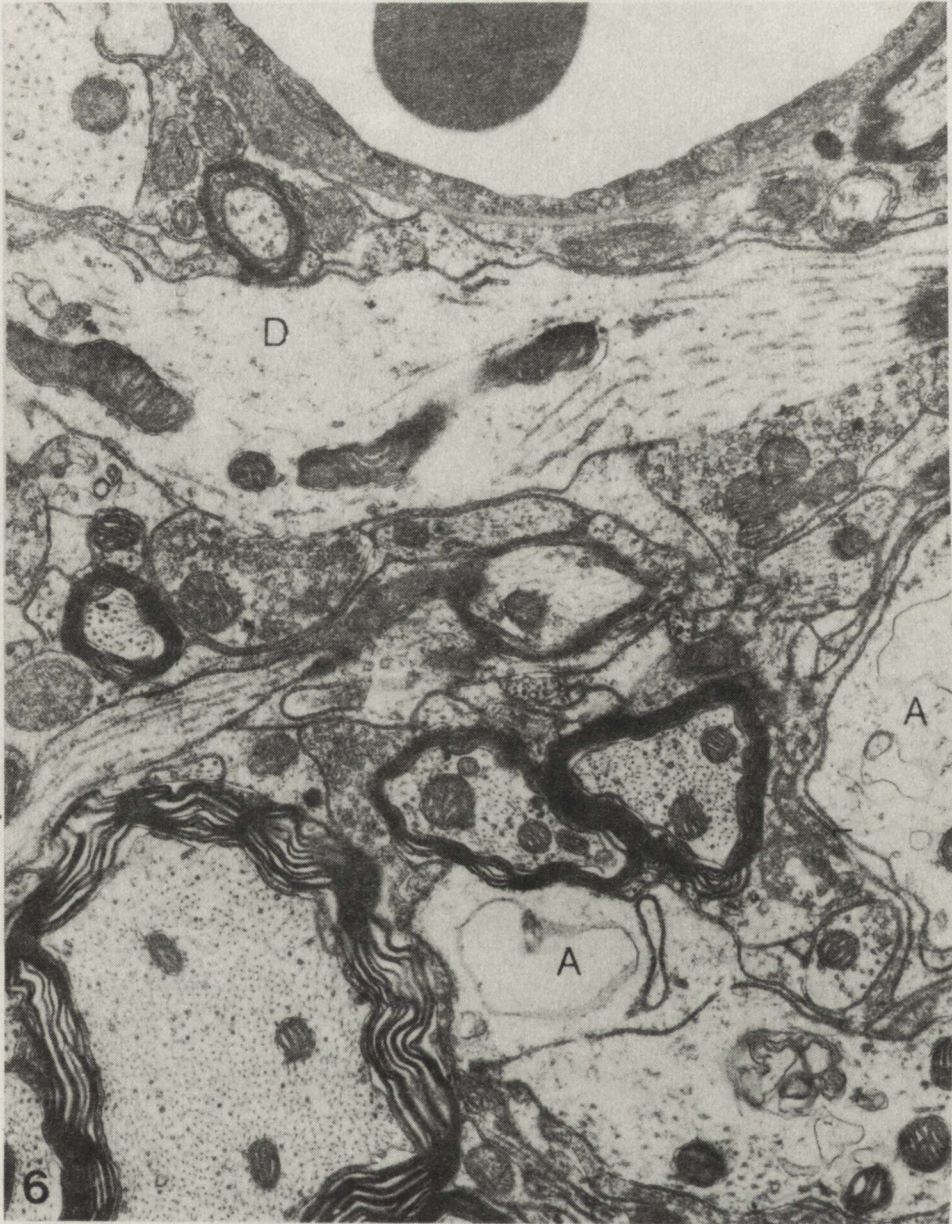
Ryc. 4. Neuron olbrzymi. 30 dni po ischemii. Fragment cytoplazmy z widocznymi przejaśnieniami (główki strzałek). Kolbki presynaptyczne połączeń akso-somatycznych o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej zawierają liczne, kuliste i owalne mikropecherzyki. Widoczny kanał siateczki śródplazmatycznej ziarnistej w ścisłym kontakcie z błoną postsynaptyczną neuronu (strzałka). Pow. 30 000 ×

Fig. 4. Large neuron. 30 days after ischemia. Cytoplasm shows electron-lucent places (arrow heads). Normal presynaptic boutons of axo-somatic synapses containing numerous, round and oval microvesicles. Granular endoplasmic reticulum channel exhibits close contact with postsynaptic membrane of neuron (arrow). × 30 000



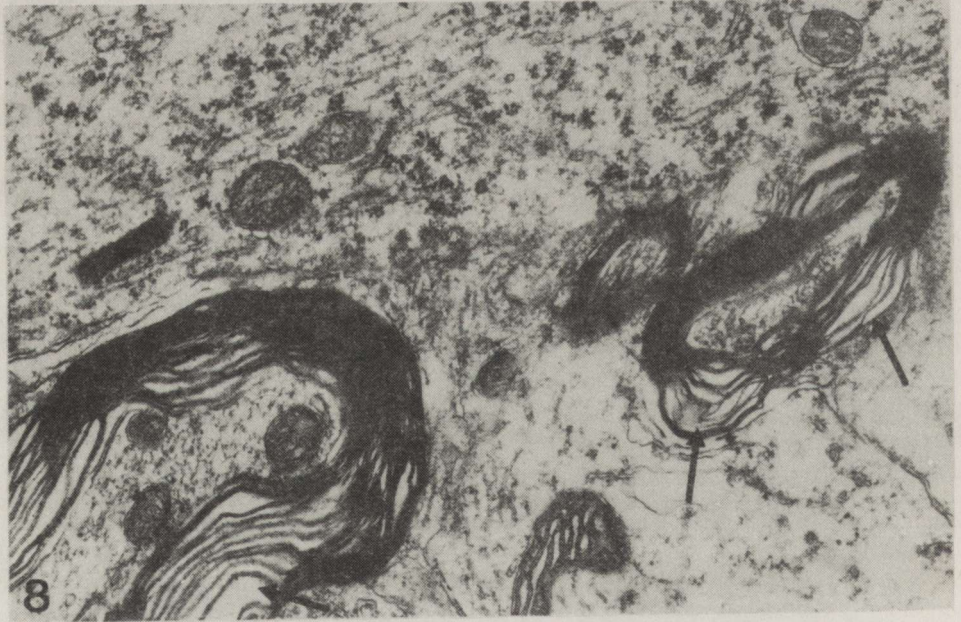
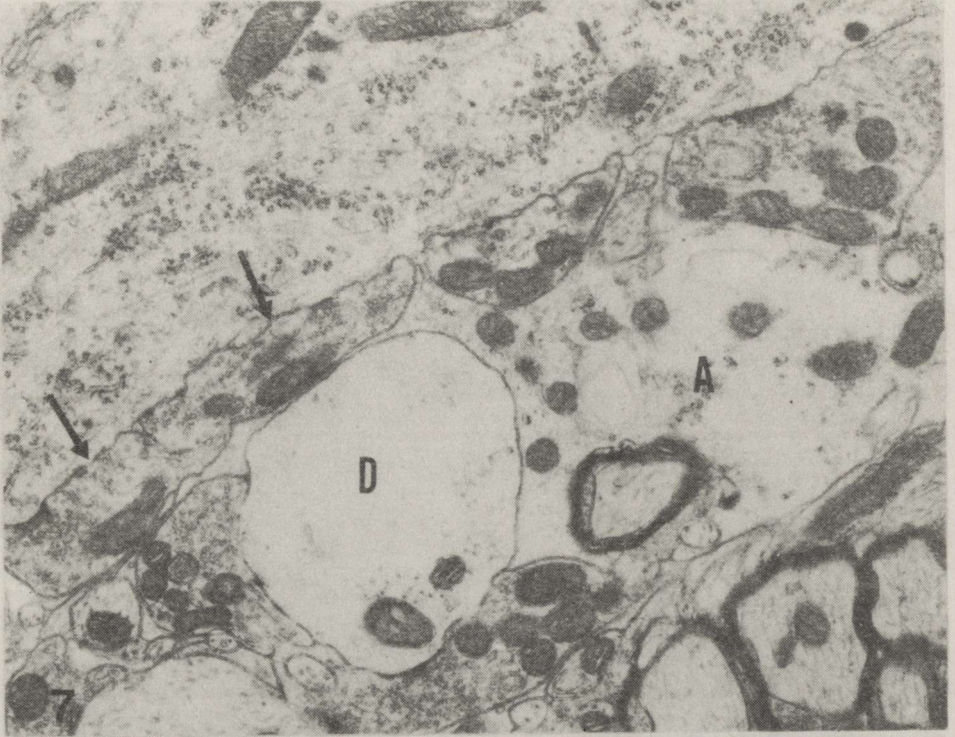
Ryc. 5. Neuron olbrzymi. 30 dni po ischemii. Cytoplazma neuronu zawierająca liczne wakuole (V). Pow. 30 000 ×

Fig. 5. Large neuron. 30 days after ischemia. Cytoplasm contains numerous vacuoles (V).
× 30 000



Ryc. 6. Obszar olbrzymiokomórkowy. 30 dni po ischemii. W okolicy okołonaczyniowej widoczna obrzęta wypustka dendrytyczna (D) oraz obrzęte przynaczyniowe wypustki astrocytów (A) zawierające wakuole. Pow. 22 500 ×

Fig. 6. Gigantocellular region. 30 days after ischemia. Swollen dendritic profile (D), swollen perivascular astrocytic processes (A) containing vacuoles are visible. × 22 500



na niedokrwienie jest sektor CA₁ hipokampa, w którym niektórzy autorzy obserwowali wybiórcze martwice (Kirino i wsp. 1984; Petito, Pulsinelli 1984). Yamaguchi i wsp. (1986) zwrócili uwagę na bezpośrednią zależność pomiędzy intensywnością niedokrwienia a narastaniem procesu patologicznego.

Obecne obserwacje morfologiczne przeprowadzone po 14 i 30 dniach po niedokrwieniu, wykazały niewielkie zmiany w postaci obrzmienia przede wszystkim astrocytów oraz dendrytów neuronów olbrzymich. Należy jednak zaznaczyć, że większość neuronów olbrzymich nie wykazywała nieprawidłowości ultrastrukturalnych. Obserwowane zmiany oraz pojawianie się wakuoli w cytoplazmie neuronów olbrzymich można tłumaczyć zaburzeniami homeostazy wodno-elektrolitowej w czasie niedokrwienia i w okresie poischemicznym. Powodują one wzrost osmolalności tkanki, a tym samym miejscowe zaburzenia osmotyczne (Hossmann, Takagi 1976; Bandaranayake i wsp. 1978). Przeprowadzone obserwacje wskazują, że przebyte 5 min całkowite niedokrwienie mózgu wywołuje w jądrze olbrzymiomórkowym zmiany obrzękowe w populacji astrocytów i neuronów olbrzymich, również po 14 i 30 dniach po incydencie niedokrwieniowym, które mogą stanowić wykładnik utrzymujących się zaburzeń czynnościowych.

EFFECT OF ISCHEMIA ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE GIGANTOCELLULAR NUCLEUS OF THE RAT

Summary

The gigantocellular region of the reticular formation of the brain stem of rat was studied two weeks and one month after complete, 5-min ischemia. Edematous changes affected some large neurons, especially their dendrites, as well as some astrocytes. An increased number of polymorphic lysosomes and lipid droplets was observed in large neurons. Some of them exhibited an abundance of cytoskeleton elements, i.e., neurotubules and neurofilaments. These ultrastructural changes persisted one month after the ischemic incident.

PIŚMIENNICTWO

1. Bandaranayake N. M., Nemoto E. M., Stezoski S. W.: Rat brain osmolality during barbiturate anaesthesia and global brain ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 249–254.
2. Basbaum A. I., Clanton C. H., Fields H. L.: Three bulbospinal pathways from the rostral

Ryc. 7. Obszar olbrzymiomórkowy. 30 dni po ischemii. W neuropilu widoczny jest obrzmiały dendryt (D) oraz obrzmiała wypustka astrocyta (A). Zakończenia presynaptyczne na neuronie olbrzymim wykazują prawidłową budowę ultrastrukturalną (strzałki). Pow. 18 000 ×
 Fig. 7. Gigantocellular region. 30 days after ischemia. Swollen dendrite (D), swollen astrocytic processes (A) are present in neuropil. Presynaptic boutons on large neuron exhibit normal ultrastructure (arrows). × 18 000

Ryc. 8. Obszar olbrzymiomórkowy. 30 dni po ischemii. W neuropilu widoczne przekroje poprzeczne włókien zmielinizowanych z rozwarstwionymi blaszkami otoczki mielinowej (strzałki). Pow. 22 500 ×

Fig. 8. Gigantocellular region. 30 days after ischemia. Transverse profiles of myelinated nerve fibers with splitting of myelin sheath lamellae are visible in neuropil (arrows). × 22 500

- medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *J Comp Neurol*, 1978, 178, 209–224.
3. Bowsher D., Mallart A., Petit D., Albe-Fessard D.: A bulbar relay to the centre median. *J Neurophysiol*, 1968, 21, 288–300.
 4. Bowsher W., Westman J.: The gigantocellular reticular region and its spinal afferents: a light and electron microscopic study in the cat. *J Anat (Lond)*, 1970, 106, 23–36.
 5. Burton H.: Somatic sensory properties of caudal bulbar reticular neurons in the cat (*Felis domestica*). *Brain Res*, 1968, 11, 357–372.
 6. Casey K. L.: Responses of bulboreticular units to somatic stimuli eliciting escape behaviour in the cat. *Int J Neurosci*, 1971, 2, 15–28.
 7. 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.
 8. Hekmatpanah F. F., Hekmatpanah C. R.: Microvascular alterations in cerebral contusion and correlation with neural damage. An. Riesch Symposion: Brain microcirculation: Pathology, diagnosis, therapy. Berlin, September 2–5, 1986, Abstracts.
 9. Hossmann V., Hossmann K.-A.: Return of neuronal functions after prolonged cardiac arrest. *Brain Res*, 1973, 60, 423–438.
 10. Hossmann K.-A., Sato K.: The effect of ischemia on sensitive cortex of cat. Electrophysiological, biochemical and electron-microscopical observations. *Neurology*, 1970, 198, 33–45.
 11. Hossmann K.-A., Takagi S.: Osmolality of brain in cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 1976, 51, 124–131.
 12. 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.
 13. Ito U., Spatz M., Walker K. J. T. Jr., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1975, 320, 209–223.
 14. Kalimo H., Paljarvi L., Vapalahti M.: The early ultrastructural alterations in the rabbit cerebral and cerebellar cortex after compression ischemia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1979, 5, 211–223.
 15. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 64, 739–747.
 16. 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.
 17. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences, Innsbruck, 17–19 October, 1985. Abstracts.
 18. Korpachev W. G., Lysenkov S. P., Tiel L. Z.: Modelirovanie klinicheskoi smierti i postreanimatornoi bolezni u krys. *Patol Fiziol Exp Ter*, 1982, 3, 78–80.
 19. Marshall L. F., Graham D. I., Durity F., Lounsbury R., Welsh F., Langfitt T. W.: Experimental cerebral oligemia and ischemia produced by intracranial hypertension. Part 2. Brain morphology. *J Neurosurg*, 1975, 43, 318–322.
 20. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropatol Pol*, 1984, 22, 347–365.
 21. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenie mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropatol Pol*, 1983, 21, 287–301.
 22. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 471–489.
 23. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure of neurons from CA₁ sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropatol Pol*, 1989, 27 (w druku).
 24. Nemoto E. M., Bleyaert A. L., Stezoski S. W., Moosy J., Rao G. R., Safar P.: Global brain ischemia. A reproducible monkey model. *Stroke*, 1977, 8, 558–564.

25. Petit C. K., Pulsinelli W. A.: Delayed neuronal recovery and neuronal death in the rat hippocampus following severe cerebral ischemia: a possible relationship to abnormalities in neuronal processes. *J. Cereb Blood Flow Metab*, 1984, 4, 194–208.
26. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke*, 1979, 10, 267–272.
27. 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, 69–105.
28. Siegel J. M., Behavioral functions of the reticular formation. *Brain Res Rev*, 1979, 1, 69–105.
29. Yamaguchi T., Wagner H. G., Klatzo I.: Observations on the post-ischemic physiology in the gerbil brain including K^+ and Ca^{++} changes. W: Proc. of NATO Advised Research Workshop on Mechanism of Secondary Brain Damage. Plenum Press, New York, 1986.
30. Zaręba-Kowalska A., Borowicz J.: The effect of hyperthermia on the ultrastructure of the gigantocellular reticular region in the rabbit. *Neuropatol Pol*, 1985, 23, 335–352.
31. 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. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 117–130.
32. Zaręba-Kowalska A., Gajkowska B.: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę jądra olbrzymiomórkowego pnia mózgu szczura. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 303–316.

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

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO, EWA BERTRAND

KORELACJE KLINICZNO-MORFOLOGICZNE W ZAWALACH MÓZGU WTÓRNIE UKRWOTOCZNIONYCH*

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

W przebiegu uszkodzenia tkanki mózgu na tle niedokrwienia, mogą pojawiać się w obrębie zawału bladego, w poszczególnych fazach jego rozwoju, ogniska krwotoczne różnej wielkości, od drobnych wybroczyn do większych, zlewających się krwotoków. Patogeneza ich powstania jest bardzo złożona i stanowi przedmiot wielu badań zarówno klinicznych, jak i doświadczalnych (Denny-Brown, Russel 1941; Lindenberg 1955, 1968; Aizawa i wsp. 1961; Quadbeck 1965; Zülch 1968, 1971). Ogniska krwotoczne powiększają obszar pierwotnego uszkodzenia tkanki mózgu, a jeżeli przebijają się do przestrzeni płynowych mózgu, zacierają najczęściej pierwotną ogniskową lokalizację procesu chorobowego. Należałoby się spodziewać, że ukrwotocznienie zawału pierwotnie bladego winno zmanifestować się dwu- lub wieloetapowym przebiegiem klinicznym. Zadaniem naszej pracy była analiza kliniczno-morfologiczna przypadków, w których w przebiegu naczyniopochodnego uszkodzenia mózgu doszło do pojawienia się ognisk krwotocznych w obrębie zawału.

MATERIAŁ I METODY

Analizie kliniczno-morfologicznej poddano 2770 kolejnych przypadków sekcyjnych Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii. Byli to chorzy, którzy zmarli w klinikach neurologicznych i psychiatrycznych Instytutu w latach 1970–1986. Z grupy naczyniopochodnego rozmiękania OUN, obejmującej 960 przypadków, wyodrębniono 355 przypadków z wtórnym ukrwotocznieniem zawału bladego.

Na utrwalonych w formalinie mózgach badano makroskopowo topografię zmian naczyniopochodnych. Strukturę ogniska rozmiękania, jego wiek, jak i lokalizację oraz wiek ukrwotocznienia oceniano na dużych skrawkach obejmujących ognisko rozmiękania wraz z pograniczem tkanki nieuszkodzo-

*Praca wykonana w ramach Problemu Resortowego R 13.1/J.

nej. Skrawki parafinowe barwiono fioletem krezyłu, HE, met. Mallorego, Spielmeyera, van Gieson i/lub van Gieson z orceiną oraz impregnowano metodą Bielschowsky'ego.

WYNIKI

Badany materiał obejmował 355 przypadków sekcyjnych, w tym 223 kobiety i 132 mężczyzn, zmarłych między 39 a 96 rokiem życia. Średni wiek badanej grupy wynosił 67 lat. Wielu chorych leczyło się z powodu nadciśnienia (200 przypadków), cukrzycy (88 przypadków) lub zaburzeń rytmu serca, najczęściej migotania przedsionków (169 przypadków). Przebyty zawał mięśnia sercowego podano w wywiadzie u 84 chorych. Początek udaru był zwykle nagły, w przeważającej liczbie przypadków (86) towarzyszyła mu utrata przytomności lub zaburzenia świadomości (130 przypadków), przechodzące najczęściej w śpiączkę (109 przypadków). U 42 chorych spostrzegano drgawki. Najczęściej stwierdzanym zespołem chorobowym był połowiczny niedowład (220 przypadków) bądź bezwład (120 przypadków). U 5 chorych obserwowano tylko afazję mieszaną z deficytem piramidowym. Objawy pniowe i/lub zaburzenia mózdkowe obserwowano sporadycznie (odpowiednio 6 i 7 przypadków). Wieloetapowy przebieg kliniczny obserwowano u 78 chorych.

W trakcie obserwacji klinicznej u 78 chorych niedowład przekształcił się w bezwład połowiczny bądź czterokończynowy. Stopniowe pogarszanie się stanu chorego i narastanie niedowładu do bezwładu połowicznego obserwowano w pierwszych dwóch dniach od incydentu udarowego u 39 chorych, a do bezwładu czterokończynowego u 9 chorych. U pozostałych 30 chorych po początkowej poprawie, najczęściej w postaci spłycenia zaburzeń przytomności i możliwości nawiązania kontaktu słownego z chorym, niedowład przekształcił się w porażenie. U 15 chorych nastąpiło to między 4 a 7 dobą, u 9 chorych w trakcie prowadzenia ćwiczeń rehabilitacyjnych około 21 dnia choroby, a u 6 chorych między 21 a 35 dniem zachorowania. Pogorszeniu stanu neurologicznego towarzyszyła w 10 przypadkach utrata przytomności, a w 20 przypadkach pogłębiające się zaburzenia przytomności od senności do głębokiej śpiączki mózgowej. Czas przeżycia chorych wahał się od kilku godzin do kilku tygodni (tab. 1). W 1 tygodniu od pojawienia się udaru zmarło 140 chorych. W 2 tygodniu 98 chorych, w 3 tygodniu 50 chorych. Więcej niż 21 dni przeżyło 67 chorych. U 252 chorych udar śmiertelny był pierwszym incydentem mózgowym, u 85 chorych drugim, a u 18 chorych – trzecim.

W wykonanych badaniach diagnostycznych w płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono podwyższony poziom białka od 56 do 162 mg% u 61 chorych, a w 69 przypadkach – zespół krwotoczny. Badanie CT wykonane u 6 chorych oraz scyntygraficzne u 29 chorych pozwoliło zazwyczaj na zlokalizowanie czy scharakteryzowanie procesu chorobowego.

Rozpoznanie kliniczne w większości przypadków było zgodne z neuropatologicznym. W 301 przypadkach rozpoznano proces rozmięknieniowy, w 32

Tabela 1. Czas trwania choroby

Table 1. Duration of the disease

Czas przeżycia Survival time	Liczba przypadków Number of cases	Razem Total
24 godz	15	
24 h		
2 – 3 dni days	49	
4 – 7 dni days	76	140
8 – 14 dni days	98	
15 – 21 dni days	50	
ponad 21 dni more than 21 days	67	215

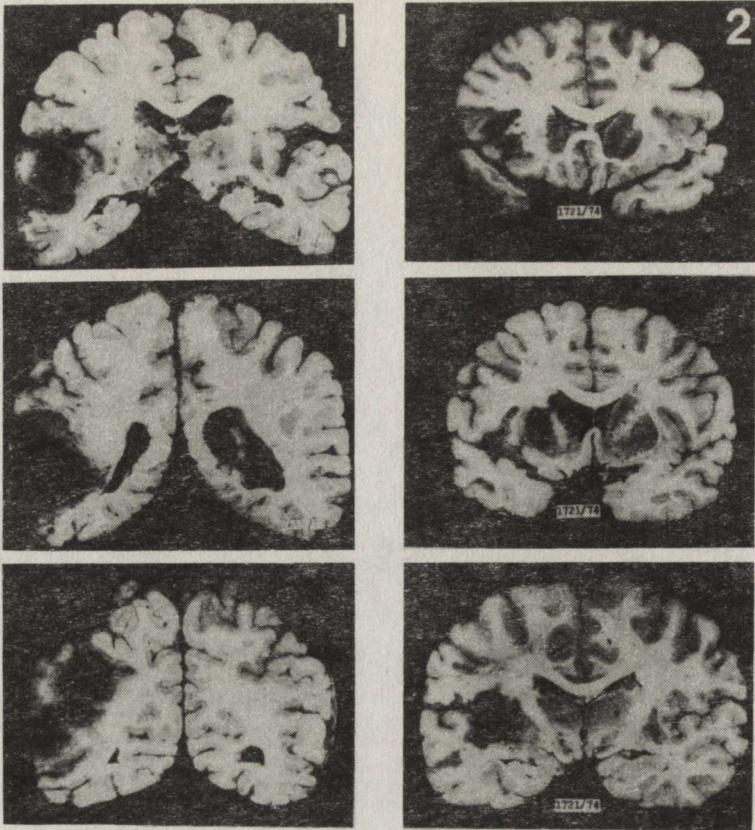
355

przypadkach – krwotok mięszowo-oponowy, u 10 chorych rozpoznano proces nowotworowy, u 3 chorych krwotok podtwardówkowy, u 2 proces zapalny OUN, u pozostałych zaś 7 chorych – zespół psychoorganiczny. Pogorszenie się stanu klinicznego interpretowano zazwyczaj jako wynik wtórnego krwotoku do pnia mózgu, bądź łączono je z dodatkowym ogniskiem rozmiękania w obrębie pnia mózgu.

Badania sekcyjne wykonano u 338 chorych. U 65 chorych stwierdzono świeży zawał mięśnia sercowego, a u 126 chorych bliznę pozawałową. W 16 przypadkach obecny był zakrzep w tętnicy szyjnej wewnętrznej w odcinku pozaczasztkowym. Zapalenie płuc stwierdzono u 183 chorych, zator w tętnicy płucnej u 61, a zawały nerek lub śledziony u 31 chorych. Ostre owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy z krwawieniem do przewodu pokarmowego zanotowano u 31 chorych. U 10 chorych znaleziono nowotwory narządowe (raka płuc u 7 chorych, raka gruczołu krokowego u 2 chorych, raka sutka u 1 chorej).

Badania makroskopowe mózgu

Zgodnie z założeniem pracy wszystkie badane przypadki reprezentowały ogniska rozmiękania mózgu wtórnie ukrwotocznione. Ogniska krwotoczne w polu rozmiękania półkulowego zlokalizowane w otoczeniu dna rowków niszcząc korę i istotę białą przebiegały się zazwyczaj do przestrzeni podpajęczynówkowej (ryc. 1). Czasami obserwowano rozległe, smugowate lub kuliste krwotoki w istocie białej i jądrach podkorowych w rejonie unaczynienia odpowiedniej tętnicy (ryc. 2). Ogniska krwotoczne przekraczały niekiedy



Ryc. 1. Rozmiękanie ukrwotoczniowe korowo-podkorowe, w obszarze unaczynienia powierzchownych gałązek tętnicy mózgu środkowej lewej z przebiciem do przestrzeni podpajęczynówkowej. Zdjęcie makroskopowe

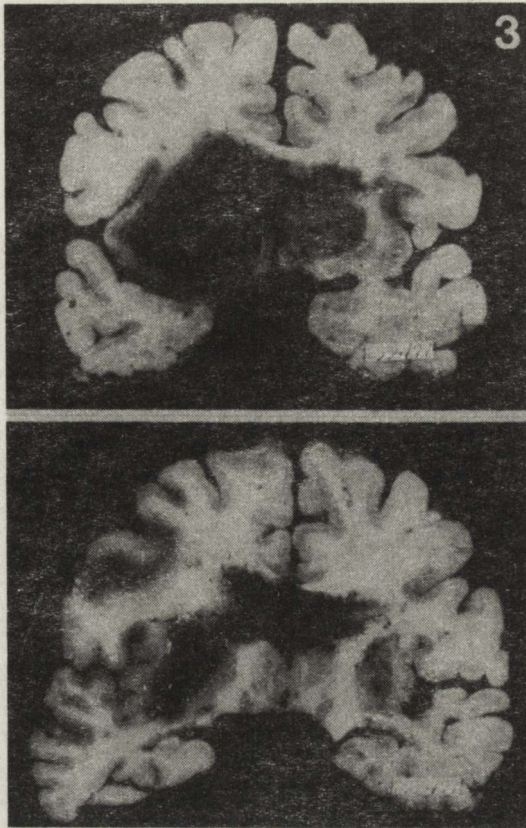
Fig. 1. Cortical and subcortical hemorrhagic malacia in region of vascularization of the superficial branches of the left middle cerebral artery with penetration to the subarachnoid space

Ryc. 2. Rozmiękanie ukrwotoczniowe w rejonie unaczynienia tętnicy mózgu środkowej lewej. Zdjęcie makroskopowe

Fig. 2. Hemorrhagic necrotic focus in region of vascularization of the left middle cerebral artery

obszar unaczynienia danej tętnicy i przebijały się do układu komorowego (ryc. 3).

Rozmiękanie tkanki w 54 przypadkach było bardzo rozległe i obejmowało w 29 przypadkach — cały obszar unaczynienia tętnicy szyjnej wewnętrznej. W 2 przypadkach obok rejonu t. mózgu przedniej i środkowej rozmiękanie obejmowało również obszar t. mózgu tylnej. W 6 przypadkach zajęty był obszar t. mózgu środkowej i tylnej, po jednym przypadku: rejon t. mózgu przedniej i tylnej, obu tętnic mózgu tylnych i t. podstawnej, a także obu tętnic mózgu środkowych i t. mózgu przedniej. W pozostałych 14 przypadkach rozmiękanie, poza półkulami mózgu, obecne było w rejonie unaczynienia tętnic mózdzku. Dane liczbowe uwzględniające lokalizację ognisk rozmiękania



Ryc. 3. Rozmiękanie ukrwotocznione w obszarze unaczynienia gałązek głębokich tętnicy mózgu środkowej lewej z przebicciem do układu komorowego. Zdjęcie makroskopowe
 Fig. 3. Hemorrhagic infarction in region of vascularization of deep branches of the left middle cerebral artery with perforation to the ventricle system

w obszarach unaczynienia poszczególnych tętnic podstawy mózgu zestawiono w tabeli 2. Zakrzepy w świetle naczyń obecne były w 30 przypadkach, najczęściej w śródczaszkowym odcinku t. szyjnej wewnętrznej oraz w t. mózgu środkowej (tab. 3). Miażdżycza naczyń podstawy obecna była w 326 przypadkach (tab. 4) z niewielką przewagą zmian I° i II° (170 przypadków) nad zmianami III° i IV° (156 przypadków). Odmiany rozwojowe koła tętniczego Willizjusza stwierdzono w 126 przypadkach. W 279 przypadkach obserwowano objawy obrzęku mózgu. Spłaszczenie zakrętów z zaciśnięciem rowków po stronie zawału obserwowano w 269 przypadkach. Przepuklinę zakrętu obręczy po stronie ogniska rozmiękania stwierdzono w 76 przypadkach, wklonowanie haka zakrętu hipokampa po stronie ogniska w 138 przypadkach, a obustronnie w 160 przypadkach. W 186 przypadkach obecne było wgłobienie migdałków mózdzku, z tego w 14 przypadkach wraz z robakiem.

W 210 przypadkach układ komorowy był niesymetryczny, zaciśnięty w półkuli po stronie ogniska, a w 74 przypadkach komora III była przesunięta

Tabela 2. Lokalizacja zmian rozmięknieniowych w rejonie unaczynienia poszczególnych tętnic mózgu

Table 2. Localization of necrotic foci in the region of vascularization of particular brain arteries

Rejon unaczynienia Region of vascularization	Liczba przypadków Number of cases			Pień mózgu Brain stem	Razem Total
	półkule mózgu i mózdzku cerebral and cerebellar hemispheres				
	prawa right	lewa left	obustronnie bilateral		
<i>a. cerebri anterior</i>	9	5	—	—	14
<i>a. cerebri media</i>	126	126	3	—	255
<i>a. cerebri posterior</i>	5	11	6	—	22
<i>a. cerebelli superior</i>	1	—	2	—	3
<i>a. cerebelli superior + inferior anterior</i>	1	—	—	—	1
<i>a. cerebelli inferior posterior</i>	—	1	—	—	1
<i>a. basilaris</i>	—	—	—	5	5
Razem Total	142	143	11	5	301

Tabela 3. Lokalizacja zmian zakrzepowych w tętnicach mózgu

Table 3. Localization of thrombosis in brain arteries

Tętnica Arteria	Liczba przypadków Number of cases
<i>a. carotis communis</i>	1
<i>a. carotis interna</i>	12
<i>a. cerebri media</i>	9
<i>a. cerebri anterior</i>	1
<i>a. cerebri posterior</i>	1
<i>a. vertebralis</i>	2
<i>a. basilaris</i>	4
Razem Total	30

poza linię środkową. W 45 przypadkach obecne były różnej wielkości wtórne ogniska krwotoczne w pniu mózgu, zlokalizowane najczęściej w części podstawnej mostu.

Badanie mikroskopowe mózgu

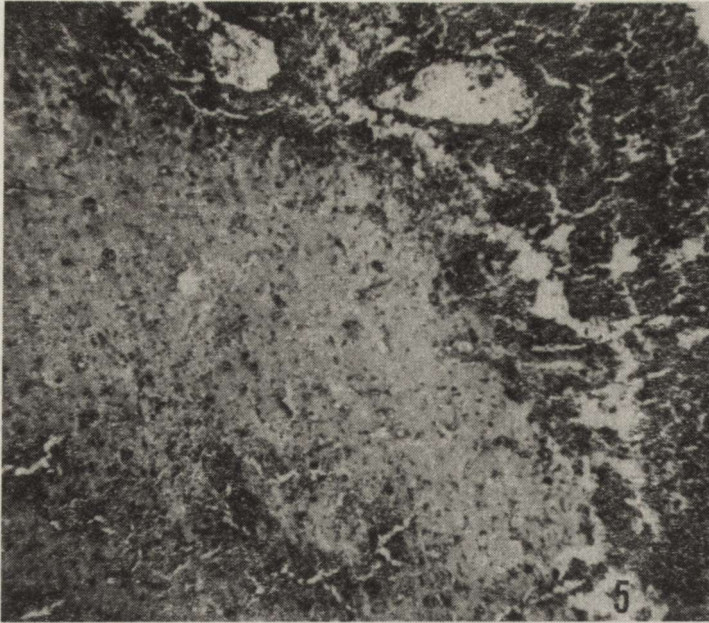
Ogniska rozmiękania tkanki w poszczególnych przypadkach znajdowały się w różnych fazach resorpcji i organizacji. Obok wczesnych obrazów bezodczynowej martwicy skrzepowej, poprzez jej zgąbczenie do zupełnego rozpadu tkanki z wybitnym obrzękiem, obserwowano obrazy nawału leukocytarnego, resorpcji makrofagowej oraz proliferacji włóściczek. Odczyn resorpcyjny i włóknotwórczy astrocytarny był na ogół słabo wyrażony. W polu martwicy i organizacji zjawiały się jamki różnej wielkości. Niekiedy w obszarze dokonanego zawału można było prześledzić różne stadia rozpadu i resorpcji. Ogniskom rozmiękania towarzyszył w 20 przypadkach odczyn nekrotoksyczny (z przewagą leukocytów) w przestrzeni podpajęczynówkowej.

Morfologia ognisk krwotocznych w polach rozmiękania zależała w dużej mierze od ich wielkości i lokalizacji. W korze drobne krwotoki układały się wzdłuż naczyń w postaci pasm rozsuwając tkankę zgąbczałą lub stosunkowo dobrze zachowaną (ryc. 4). Ogniska krwotoczne „przekraczały” często obszar zawału bladego, przebijały się do przestrzeni podpajęcznej wywołując w 141 przypadkach ograniczone krwotoki w jej obrębie (ryc. 5), najczęściej bezod-



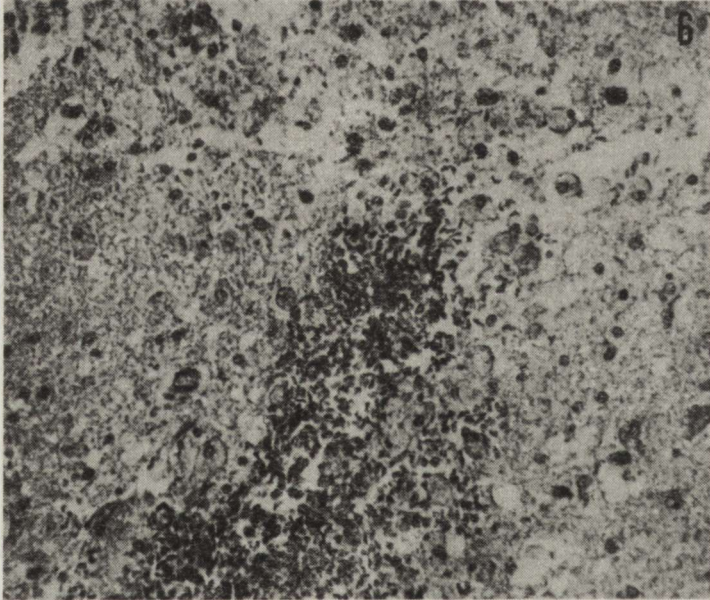
Ryc. 4. Krwawienie do martwiczo zmienionej tkanki wzdłuż naczyń oraz na pograniczu warstw kory mózdzku. Mallory. Pow. 100 ×

Fig. 4. Bleeding into necrotic tissue along vessels and at the boundary of the cerebellar cortical layers. Mallory. × 100



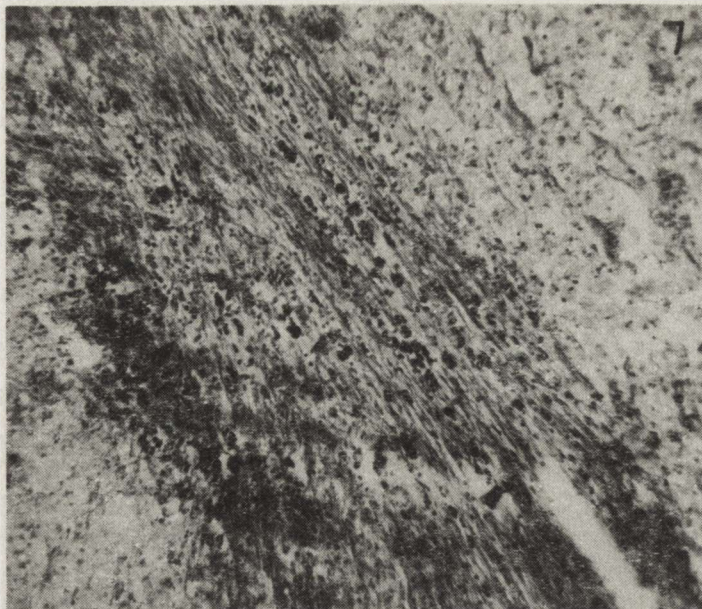
Ryc. 5. Krwotok podpajęczynówkowy nad obszarem ukrwotoczonego zawału białego. Płat ciemieniowy. Mallory. Pow. 60 ×

Fig. 5. Subarachnoid hemorrhage above pale infarction with hemorrhagic areas. Parietal lobe. Mallory. × 60



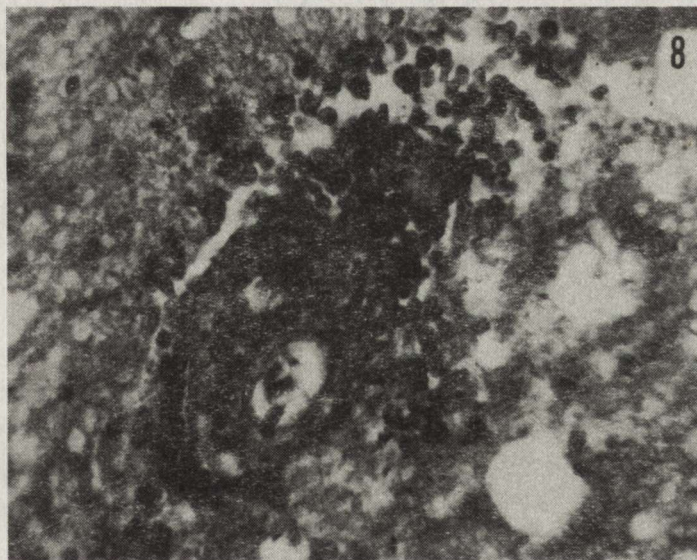
Ryc. 6. Płat czołowy. Martwica kory i istoty białej w okresie resorpcji makrofagowej ze świeżym ogniskiem krwotocznym. HE. Pow. 200 ×

Fig. 6. Necrosis of cortex and white matter in the phase of macrophage resorption with recent hemorrhagic focus. Frontal lobe. HE. × 200



Ryc. 7. Płat ciemieniowy. Krwawienie do ogniska martwicy w okresie tworzenia się blizny łącznotkankowo-glejąwej. Van Gieson-orceina. Pow. 100 ×

Fig. 7. Parietal lobe. Bleeding into necrotic tissue in the phase of cicatrization. Van Gieson-orceina. × 100



Ryc. 8. Krwawienie z naczynia żylnego w polu bliznowacenia. Van Gieson-orceina. Pow. 200 ×

Fig. 8. Bleeding from venous vessel on area of cicatrization. Van Gieson-orceina. × 200

czynowe. Czasami obserwowano w przestrzeni podpajęczynówkowej odczyn komórkowy, głównie makrofagi, histiocyty i limfocyty.

W istocie białej ogniska krwotoczne osiągały większe rozmiary. Wśród mas wylanej, najczęściej zhemolizowanej krwi, widoczne były fragmenty martwiczo zmienionej tkanki w fazie resorpcji makrofagowej (ryc. 6) i proliferacji włóściczków. Czasami poszczególne pola krwotoczne łączyły się ze sobą tworząc „rozlewiska” o nieregularnych brzegach, otoczonych martwiczo zmienioną tkanką z barwikiem krwi i masami płynu przesiękowego. Rozległe krwotoki przekraczały zazwyczaj obszar pierwotnego zawału. W 20 przypadkach były to rozległe, świeże krwotoki do ogniska rozmiękania znajdującego się w fazie resorpcji makrofagowej bądź w okresie tworzenia się blizny łącznotkankowo-glejujowej (ryc. 7). Ustalenie źródła krwawienia w martwiczo zmienionej tkance było najczęściej niemożliwe. Rzadko można było uchwycić fragmenty krwawiącego naczynia (ryc. 8) ze zmienioną martwiczo ścianą. Nie zawsze można było jednak ustalić czy jest to naczynie żyłne (ryc. 9), czy tętnicze. Odczyn resorpcyjny na brzegu rozległych ognisk krwotocznych był minimalny, dość rzadko obserwowano makrofagi obładowane hemosyderyną, występujące pojedynczo lub w skupieniach.

W świetle naczyń oponowych, jak i śródmiąższowych stwierdzano niekiedy zakrzepy (56 przypadków). Nasilenie zmian miażdżycowych w naczyniach podstawy odpowiadało obserwacjom makroskopowym. Stopień zmian stwardnieniowych w naczyniach śródmiąższowych wahał się od I° do IV° (tab. 4). W 200 przypadkach obok znacznego zwłóknienia włóściczków obserwowano szkliwienie i/bądź zwapnienie ścian tętniczek i tętnic w 71 przypadkach ze wężeniem światła.

Ubytki komórek nerwowych i nasilenie schorzeń komórkowych w obszarach nie zajętych zawałem czy ukrwotoczeniem odpowiadały obrazowi morfologicznemu obserwowanemu zwykle w wieku podeszłym. Stosunkowo często, bo w 168 przypadkach obecne były kłęбки naczyniowe, a w 30 przypadkach – płytki starcze.

Tabela 4. Miażdżycza tętnic i stwardnienie tętniczek

Table 4. Atherosclerosis and arteriolosclerosis

Stopień zmian Degree of changes	Liczba przypadków Number of cases	
	Atherosclerosis	Arteriolosclerosis
0	29	0
I	67	46
II	103	109
III	99	129
IV	57	71
	Razem Total	355
		355

OMÓWIENIE

W obrazie klinicznym badanych przez nas przypadków dominował nagły początek choroby z niedowładem bądź bezwładem połowicznym, któremu towarzyszyły w 216 przypadkach zaburzenia przytomności o różnym nasileniu. Przebieg choroby był na ogół postępujący, niedowłady połowiczne przechodziły w porażenie połowiczne bądź czterokończynowe. Jedynie w 30 przypadkach spośród 355 badanych, obserwowano w pierwszych tygodniach po udarze przebiegającym z utratą przytomności, poprawę w stanie klinicznym. Największa ilość, bo 140 chorych ginęła w pierwszym tygodniu wśród głębokiej śpiączki mózgowej czy stanu odmóżdzeniowego. W 9 przypadkach uchwycono w przebiegu choroby zespoły wgłobienia i objawy wtórnych krwotoków do pnia mózgu. Nagły początek i gwałtowny przebieg choroby stały się źródłem rozpoznania u 32 chorych pierwotnego krwotoku z przebiciem do przestrzeni podpajęczynówkowej lub układu komorowego. U 3 chorych podejrzewano klinicznie obecność krwiaka podtwardówkowego.

Rozpoznając proces rozmięknieniowy w półkulach mózgu, nagłe bądź stałe pogarszanie się stanu klinicznego wiązano raczej z powikłaniami o charakterze internistycznym, mając na uwadze wiek chorych, przebyte lub świeże zawały mięśnia sercowego, współistniejące zaburzenia rytmu serca, nadciśnienie tętnicze czy proces zapalny w płucach lub nerkach. Jedynie w 6 przypadkach podejrzewano w przebiegu choroby wtórne ukrwotoczenie ogniska zawałowego.

Mimo toczącego się w OUN procesu zanikowego, obrzęk mózgu był szczególnie nasilony w zawałach rozległych. O szybkim narastaniu ciśnienia śródczaszkowego świadczył zarówno obraz kliniczny, a mianowicie pogłębiające się zaburzenia świadomości, pogarszanie się zespołu neurologicznego, drgawki, stosunkowo krótki czas trwania choroby (większość zgonów w pierwszych dniach po udarze), jak i stwierdzone sekcyjnie rozległe ukrwotoczenie zawału. Wykładnikiem obrzęku mózgu było makroskopowo uchwytnie spłaszczenie zakrętów, zaciśnięcie rowków na sklepiści, zaciśnięcie komory bocznej po stronie rozmiękania, przesunięcie komory III wraz ze strukturami centralnymi poza linię środkową, przepuklina zakrętu obręczy oraz zakrętu hipokampa. Prowadziło to do wzmożonego ucisku nadnamiotowej części mózgu na namiot mózdzku i pień doprowadzając do pogłębiania się zaburzeń przytomności w obrazie klinicznym, a morfologicznie u części chorych do pojawiania się wtórnych krwotoków w obrębie pnia mózgu lub zawałów ukrwotoczniowych w strukturach wgłobionych. Mikroskopowo obserwowano znaczne przekrwienie naczyń, poszerzenie przestrzeni okołonacyniowej ze zgąbczeniem struktur otaczających naczynia, jeziorka włókniaka wokół naczyń, a w tkance poza zawałem rozsiane zgąbczenia typu „kropli deszczu”.

Morfologia ogniska zawałowego była w większości przypadków dosyć zróżnicowana. Najczęściej obok świeżej bezdoczynowej martwicy rozplywnej obserwowano w tych samych przypadkach pola o różnym stopniu zaawanso-

wania resorpcji i organizacji. Zarówno w obszarach świeżego bezodczynowego rozmiękania, jak i bardzo zaawansowanej rozbiórki makroflagowej i glejowej, czy nawet w fazie organizacji glejowo-mezodermalnej z tworzeniem się włókien łącznotkankowych i glejowych, obserwowano smugowate bądź kuliste, świeże krwotoki zlewające się niekiedy w rozległe rozlewiska o nieregularnych brzegach. Struktura tkanki nerwowej w otoczeniu tych krwotoczków była zmieniona martwiczo w przeciwieństwie do typowych obrazów zawału krwotocznego z zachowaną strukturą tkanki, które obserwowano również poza polem zawału bladego, najczęściej w korze i istocie białej struktur wgłobionych, zwłaszcza w obszarze unaczynienia t. mózgu tylnej i t. mózdzku górnej.

Patogeneza pojawiania się wtórnego ukrwotocznienia zawału bladego jest dosyć złożona. Za jedną z przyczyn przyjmuje się ponowne udroźnienie naczynia pierwotnie zamkniętego przez zator (Messen, Stochdorph 1957; Zülch 1968; Quandt 1969; Stehbens 1972; Dymecki 1981). Jeżeli materiał zatorowy blokujący światło naczynia, ulegnie rozpadowi i przemieszczeniu do dalszych odcinków drzewa naczyniowego, dochodzi do przywrócenia krążenia krwi w poprzednio niedrożnym odcinku. Uszkodzona przez niedokrwienie ściana tego naczynia staje się jednak przepuszczalna dla krwinek czerwonych i w tych warunkach może dojść do ukrwotocznienia części pola zawału bladego. Krwinkotoki są rozsiane wśród martwiczo zmienionej tkanki pokrytej makroflagami, nie zawierającymi w tej fazie ukrwotocznienia hemosyderyny. Przyczyną krwawienia do ogniska zawału bladego może być również uszkodzenie ściany naczyń spowodowane długotrwałym zastojem w wyniku zaburzeń naczynioruchowych w przebiegu niedostatku ukrwienia i ischemicznego obrzęku mózgu (Wechsler, Decker 1963; Stehbens 1972; Klatzo 1975). W naszym materiale krwotoki dosyć często przekraczały pierwotne pole zawału bladego i tym mechanizmem można wytłumaczyć ich pojawienia się.

Za przyczynę ukrwotocznienia rozmiękania bladego przyjmuje się również stopniowe narastanie ucisku tętnicy i znaczne wahania ciśnienia tętniczego krwi poza miejscem uciśniętym, co prowadzić ma do powtarzających się krwinkotoków „*per diapedesim*” (Zülch 1961; Szapiro 1964; Sohn, Levine 1967; Stefanko 1969; Yates 1976).

Niektórzy autorzy (Bannwarth 1935; Cannon 1951; Lindenberg 1968) ukrwotocznienie zawałów bladych tłumaczą głównie zastojem żylnym spowodowanym uciskiem dużych pni żylnych w przebiegu narastającego obrzęku mózgu towarzyszącego rozległym ogniskom rozmiękania w OUN, zwiększającego ciasnotę śródczaszkową lub też współlistnieniem miejscowych zaburzeń krążenia zarówno tętniczego, jak i żylnego (Poppen i wsp. 1952; Lindenberg 1955; Johansson, Melin 1960; Goodman, Becker 1973; Adams, Graham 1976; Slater i wsp. 1977). Niedokrwienie tkanki oraz zastój tworzy zespół czynników stanowiących razem z narastającym obrzękiem układ „sprzężenia zwrotnego dodatniego”, którego wynikiem jest m. in. ukrwotocznienie martwicy bladej. Przynieszone poglądy wskazują na złożoność czynników patogenetycznych powodujących wtórne ukrwotocznienie zawału bladego.

Chcielibyśmy podkreślić, że w podeszłym wieku, zwłaszcza przy współistnieniu zaburzeń rytmu serca i nadciśnienia, należy w przebiegu rozmiękania mózgu spodziewać się jego ukrwotocznienia i odpowiednio prowadzić postępowanie lecznicze. Na ogół nawet w opracowaniach statystycznych schorzeń naczyniopochodnych OUN zagadnienie to jest potraktowane marginesowo (Gurdijan i wsp. 1960; Johansson, Melin 1960). Ansari (1974) obserwował ukrwotocznienie zawału bladego u 27 spośród 39 chorych, a w naszym materiale obecne było w 355 spośród 960 przypadków rozmiękania OUN. Równocześnie obserwowaliśmy zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe naczyń śródmiąższowych mózgu, co dodatkowo mogło sprzyjać nasilaniu się zmian martwiczych w ich ścianach i przyczyniać się do krwawienia (Brierley, Graham 1984).

Często (prawie w 2/5 liczby przypadków) ogniska krwotoczne w polu rozmiękania przebijały się do przestrzeni podpajęczynówkowej. W płynie mózgowo-rdzeniowym u 69 chorych spostrzegano bądź pełny zespół krwotoczny, bądź też eryocyty i erytrofagi, obok dodatknej próby benzydynamowej. Tylko w 78 przypadkach można było prześledzić wieloetapowy przebieg choroby, zazwyczaj jednak obserwowano stopniowe pogarszanie się stanu chorego, bądź też ukrwotocznienie zawału bladego przebiegało klinicznie tak burzliwie, że sugerowało pierwotny krwotok miąższowy czy miąższowo-oponowy, a nawet proces nowotworowy.

CLINICAL-MORPHOLOGICAL CORRELATIONS IN SECONDARILY HEMORRHAGIC BRAIN INFARCTIONS

Summary

Clinical-morphological analysis of cases in which, in the course of vasogenic necrotic brain lesion, hemorrhagic foci appeared within the infarcted area, was performed. The material comprised 355 cases with encephalomalacia (223 women and 123 men). The patients died at age between 39 and 96 years. In the clinical picture a sudden onset of the disease prevailed, with hemiparesis or hemiplegia associated in 216 cases with disturbances of consciousness. The course of the disease was in general progressive. Only in 30 patients improvement of clinical state was observed. The time of survival varied from several hours to several weeks. Most patients (140) died in the first week in deep cerebral coma or state of decerebration. In nine cases clinical symptomatology of herniation and secondary hemorrhages into the brain stem was found. A sudden onset and violent course of the disease resulted in a diagnosis of primary hemorrhage with penetration to the subarachnoid space or ventricular system in 32 patients. Only in six cases was a secondary hemorrhage into the primary infarction diagnosed clinically.

Hemorrhagic malacia was most frequently (in 255 cases) located in region vascularized by the middle cerebral artery and very seldom, the basilar artery or cerebellar arteries. Malacia was accompanied by considerable brain edema. This was particularly intense in extensive infarctions and persisted even in cases with considerable long survival. In 45 cases secondary hemorrhagic foci were found within brain stem.

The morphology of the infarction foci was variable in most cases. Independently to fresh unreactive diffuse necrosis, sometimes areas with various advancement of resorption and organization processes were observed in the same case. Both in areas of fresh reaction-

-less malacia and of advanced macrophage-gial disintegration, or even in areas of advanced gliomesodermal organization, strand-like or spherical hemorrhages could be seen merging sometimes into extensive pools. The morphology of hemorrhagic foci was largely dependent on their size and localization. The hemorrhagic foci located close to the depth of the cortical sulci very often destroyed the cortex and white matter, and penetrated to the subarachnoid space (141 cases). It was usually almost impossible to detect the source of bleeding within the necrotically changed area. The resorption reaction at the edge of extensive hemorrhagic foci was in general minimal.

A lesion of the vessel wall, caused by stasis of long duration, resulting from disorders of the vascular function in the course of deficient blood supply and ischemic brain edema are considered the main causes of bleeding into the pale infarction.

PIŚMIENNICTWO

1. Adams J. H., Graham D. I.: The relationship between ventricular fluid pressure and the neuropathology of raised intracranial pressure. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1976, 2, 322–332.
2. Aizawa T., Tazaki Y., Gotoh F.: Cerebral circulation in cerebrovascular disease. *World Neurol*, 1961, 2, 635–640.
3. Ansari K.: Les hémorragies secondaires du tronc cérébral. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr*, 1974, 114, 1, 1–28.
4. Bannwarth A.: Zur Pathologie des Hirntumors. *Arch Psychiatr*, 1935, 103, 472–500.
5. Brierley J. B., Graham D. I.: Hypozia and vascular disorders of the central nervous system. W: *Greenfield's Neuropathology*. Red.: J. H. Adams, J. A. N. Corsell's, E. Arnold, London, 1984, 124–156.
6. Cannon B. W.: Acute vascular lesions of the brain stem: complication of supratentorial space occupying lesions. *Arch Neurol*, 1951, 66, 687–698.
7. Denny-Brown D., Russel W. R.: Experimental cerebral contusion. *Brain*, 1941, 64, 93–164.
8. Dymecki J.: Choroby naczyniowe i naczyniopochodne ośrodkowego układu nerwowego. W: *Podstawy Neuropatologii*. Red. M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender, PZWL, Warszawa, 1981, 227–236.
9. Goodam S. J., Becker D. P.: Vascular pathology of the brain stem due to experimentally increased intracranial pressure: changes noted in the micro- and macrocirculation. *J Neurosurg*, 1973, 39, 601–609.
10. Gurdijan E. S., Lindner D. W., Hardy W. G., Webster J. E.: Cerebrovascular diseases. An analysis of 600 cases. *Neurology* 1960, 10, 372–380.
11. Johannson G. H., Melin H. G.: Spontaneous cerebral haemorrhage and encephalomalacia. *Acta Psychiatr Scand*, 1960, 35, 457–479.
12. Klatzo I.: Pathophysiologic aspects of cerebral ischemia. W: *The nervous system*. Red.: D. B. Tower, Raven Press, New York, 1975, 1, 313–322.
13. Korthals J.: Doświadczalne niedokrwienie mózgu u królika. *Klinika i morfologia. Neuropatol Pol*, 1969, 7, 113–160.
14. Lindenberg R.: Compression of brain arteries as pathogenetic factor for tissue necroses and their areas of predilection. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1955, 14, 223–243.
15. Lindenberg R.: Patterns of lesions primarily determined by local vascular compressions. W: *Pathology of the nervous system*. Red.: J. Minckler, McGraw-Hill Book Comp., New York, 1968, v. 2, 1604–1617.
16. Messen H., Stochdorph O.: Erweichung und Blutung. W: *Hdb der spez. path. Anatomie u. Histologie*. Red.: W. Scholz, Springer. Berlin 1957, XIII/IB, 1384–1403.
17. Poppen J. Z., Kendrick J. F., Hicks F.: Brain stem haemorrhages secondary to supratentorial spacetaking lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1952, 11, 267–279.
18. Quadbeck G.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der zerebralen Durchblutungsstörungen. *Med Welt*, 1965, 2107–2118.

19. Quandt J., Sommer H.: Die zerebral Arteriosklerose. W: Die zerebralen Durchblutungsstörungen des Erwachsenenalters, Red. J. Quandt, Veb. Verlag Volks u. Gesundheit, Berlin 1969, 601–645.
20. Slater R., Reivich M., Goldberg H.: Diaschisis with cerebral infarction. *Stroke*, 1977, 8, 684–690.
21. Sohn D., Levine S.: Frontal lobe infarcts caused by brain herniation. Compression of anterior cerebral artery branches. *Arch Pathol.* 1967, 64, 509–512.
22. Stehbens W. E.: Pathology of the cerebral blood vessels. Mosley, St. Louis, 1972, 329–334.
23. Stefanko S.: Morfologia i patomechanizm rozmięknień w obszarze unaczynienia tętnic mózgu tylnych. IV Konferencja Nauk Sekcji Neuroradiologii PTN, Rzeszów 6–7. VI. 1969, 31–39.
24. Szapiro J.: Niektóre zagadnienia fizjologii niedokrwienia tkanki mózgowej. *Neurol Neurochir Psychiatr Pol*, 1964, 15, 509–515.
25. Wechsler W., Decker K.: Zur Pathogenese hämorrhagischer Erweichungen bei akuter intrakranieller Drucksteigerung. *Neurochirurgia*, 1963, 6, 22–23.
26. Zülch K. J.: Über die Entstehung und Lokalisation der Hirninfarkte. *Zentralbl Neurochir*, 1961, 21, 158–178.
27. Zülch K. J.: Histological criteria of brain edema and brain swelling. W: Brain Edema. Red.: I. Klatzo, F. Seitelberger, Springer, New York, 1967, 95–116.
28. Zülch K. J.: Hemorrhage, thrombus, embolism. W: Pathology of the nervous system. Red.: J. Minekler, McGraw-Hill, New York, 1968, v. 2, 1499–1526.
29. Zülch K. J.: Zur Pathogenese von Massenblutung und Erweichung unter besonderer Berücksichtigung klinischer Gesichtspunkte. *Acta Neurochir (Wien), Suppl.* 1971, 7, 51–56.
30. Yates P. O.: Vascular disease of the central nervous system. W: Greenfield's Neuropathology. Red.: W. Blackwood, J. A. N. Corsellis, E. Arnold, Edinburgh, 1976, 121–124.

Adres autorek: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Al. Sobieskiego 1/9, 02–957 Warszawa.

IRENA NIEBRÓJ-DOBOSZ, JANINA RAFAŁOWSKA, MIROŚLAWA ŁUKASIK

DO LIPID CHANGES INFLUENCE THE DENSITY OF AGING HUMAN BRAIN MYELIN*

Department of Neurology, School of Medicine, Warszawa

Myelin from the human central nervous system when isolated from senile and younger subjects may be distinguished by the density of its vesicles (Berlet et al. 1982; Niebrój-Dobosz et al. 1988). The reason of this is unknown but changes in myelin composition with aging may be responsible for it.

The aim of this study was examination of the main lipid components of human brain myelin in order to establish whether the lipid pattern of senile myelin may contribute to the heterogeneity of myelin vesicles in aged subjects.

MATERIAL AND METHODS

The material comprised eight autptic cases of age from 25 to 91 years with no signs of central nervous system involvement, neither clinical or autptic. In all cases autopsy was performed 24 hours after death. The brain samples were formalin-fixed and preserved in formalin before histological and biochemical examinations for one to five years.

For histological studies the formalin-fixed and paraffin embedded sections were stained by routine histological methods. The same brain sections were used for biochemical studies. After washing several hours in distilled water at 4°C to remove formalin the material was dried on Whatman paper No 1 and weighed. The myelin fractions were separated according to the method of Agrawal et al. (1974). Sucrose discontinuous gradient and centrifugation in an Ultracentrifuge VAC 601 (Janetzki) were used. The myelin fractions separated at 0.32 M, 0.55 to 0.75 M and 0.85 M sucrose concentrations were collected, and after dilution sedimented at 100 000 × g during 15 min and weighed. Myelin lipids were determined after extraction from each of these fractions according to the method of Folch et al. (1957), and total lipids by the method of Skipski et al. (1969), phospholipids by Bartlett's method (1959), cerebrosides

* Study was supported by Ministry of Health grant (No R. 34.1)

by the Hess and Lewin method (1965), total cholesterol by the Błaszczyzyn method (1970). In order to separate free cholesterol from the esterified form 100 µg of lipid was placed on Silica Gel H (Merck) coated glass plates and thin-layer chromatography was performed (Müller, Vahar-Matiar 1984). The R_f values of individual separated lipids were compared with separately run standards (Sigma) and the percentage content of free and esterified cholesterol was determined after planimetry of the absorption curves at 560 nm in a ERJ-63 densitometer (Zeiss, Jena). In order to evaluate the influence of formalin-fixation on the content of the examined lipid classes fresh-unfixed, one-year and five-year formalin-fixed brain white matter for myelin isolation was used. The lipid values in white matter myelin of brain formalin-fixed for one year were lower in total lipids by 1.8%, in total phospholipids by 5.8%, in total cholesterol by 2.6% and in cerebrosides by 3.2%. The same values in the brains formalin-fixed for five years were 2.8%, 5.4%, 3.6% and 2.8% respectively, as compared with those for non-fixed white matter myelin.

RESULTS

The yield (recovery) of isolated myelin from adult brains was approximately comparable between the age of 25 and 51 years. Later a progressive decrease was observed (Fig. 1). The lowest myelin value was noted in the 91-years-old subject. When centrifuged to equilibrium the myelin membrane fraction, collected at the 0.85 M sucrose level, predominated over the other fractions in senile subjects, as has been demonstrated in our previous paper (Niebrój-Dobosz et al. 1986, 1988).

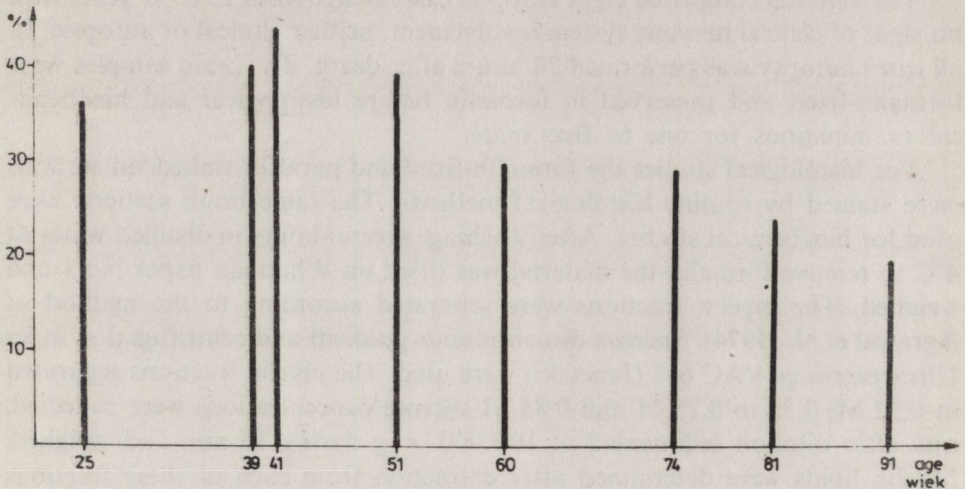


Fig. 1. Yield of myelin isolated from human brain in aging subjects. Results expressed as percentage of white matter weight

Ryc. 1. Zawartość mieliny mózgu w procesie starzenia u człowieka. Wyniki wyrażone w procentach masy substancji białej mózgu

The total lipid content decreased with age (Fig. 2). The beginning of this decline appeared in heavy and light myelin at the age of 60 years, in the membrane fraction after the 8th decade of life. When comparing the total lipid content in a 25-year-old subject with that of the 91-year-old case, the decrease was 4.8 : 4.8 : 2.9-fold in light myelin, heavy myelin, membrane fraction, respectively.

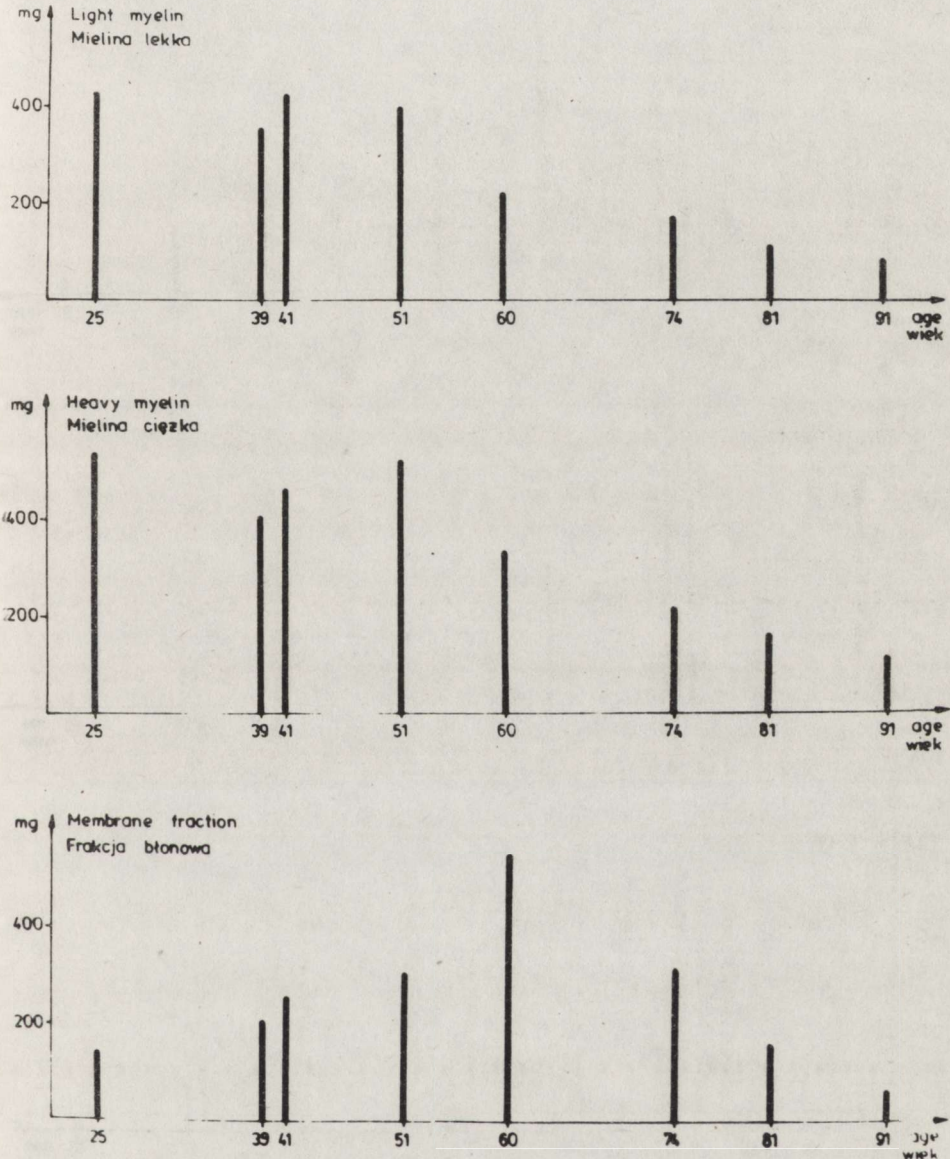


Fig. 2. Lipid content in myelin fractions in aging subjects. Results expressed as mg per 1 g of myelin

Ryc. 2. Zawartość lipidów we frakcjach mieliny w procesie starzenia. Wyniki wyrażone w mg w 1 g mieliny

The aging process influenced also the myelin phospholipids concentration, especially in the heavy myelin fraction. The decrease in phospholipids content in the 91-year-old subject was 22.9-fold versus the value at the age of 25 years. The beginning of phospholipids decline in heavy myelin appeared as early as the 5th decade of life, in light myelin later, in the 7th decade. Most "resistant" to

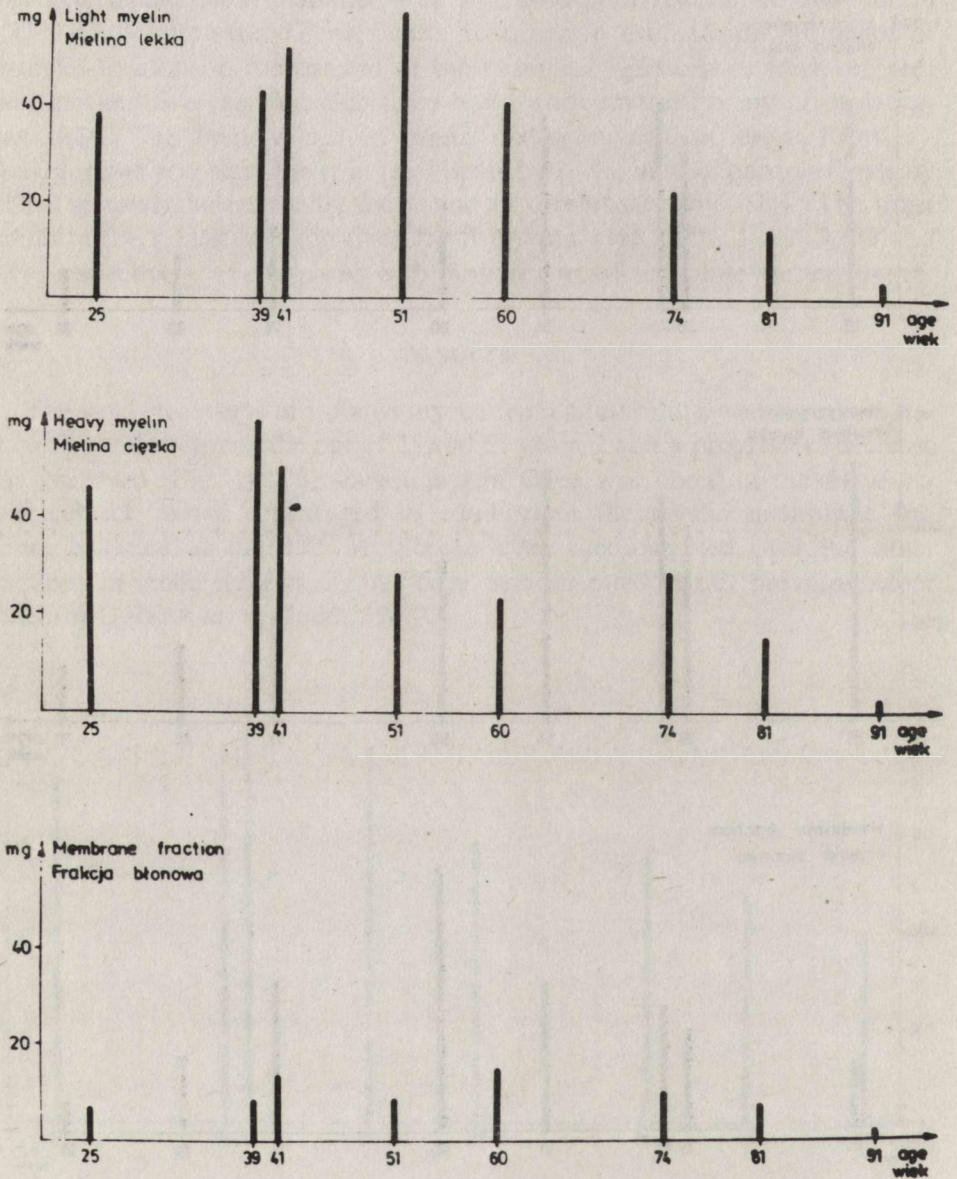


Fig. 3. Phospholipids content in myelin fractions in aging subjects. Results expressed as mg per 1 g of myelin

Ryc. 3. Zawartość fosfolipidów we frakcjach mieliny w procesie starzenia. Wyniki wyrażone w mg w 1 g mieliny

changes in aging appeared the membrane fraction where the phospholipids decrease was small and appeared very late, namely, in the 91-year-old subject (Fig. 3).

Cerebrosides did not change significantly in human brain myelin during normal aging (Fig. 4).

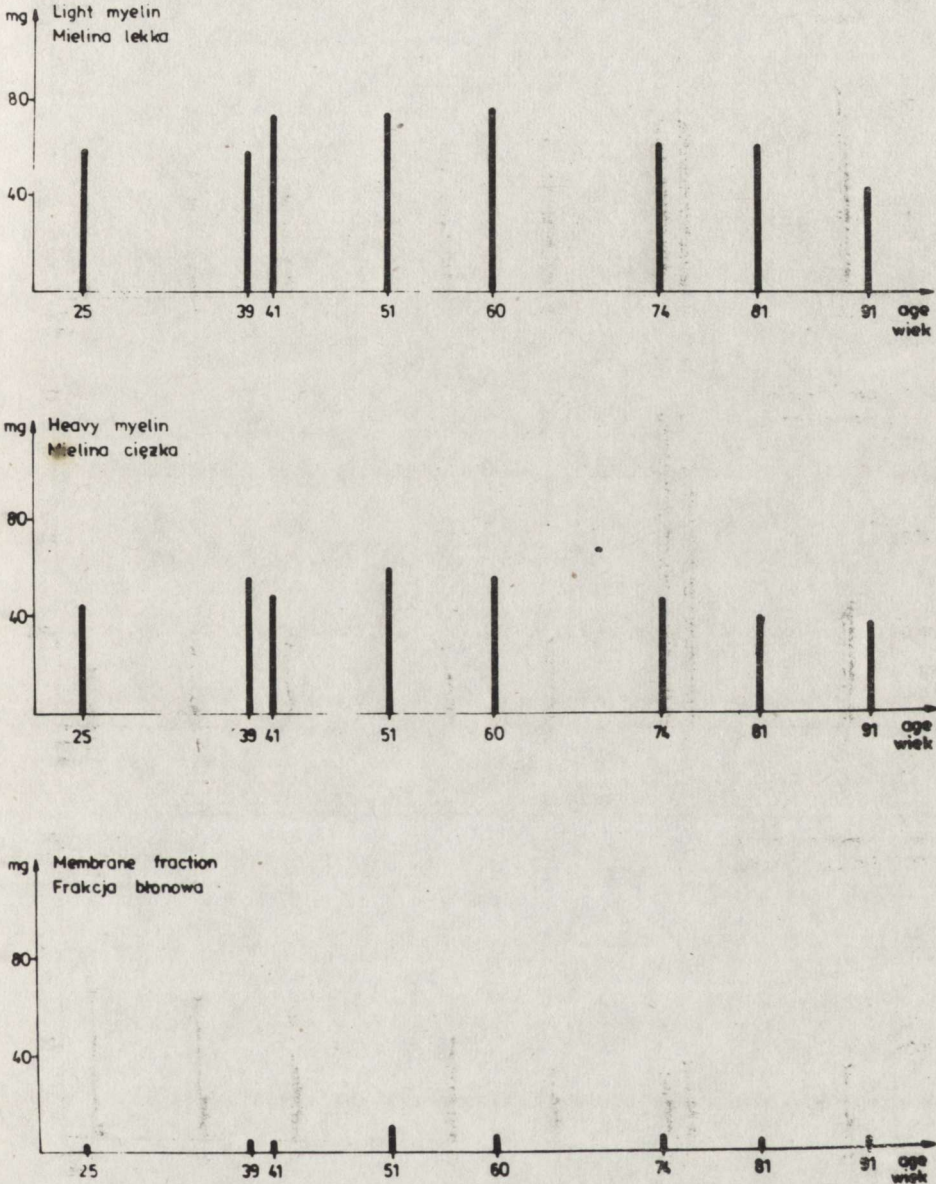


Fig. 4. Cerebrosides content in myelin fractions in aging subjects. Results expressed as mg per 1 g of myelin

Ryc. 4. Zawartość cerebrozydów we frakcjach mielinowych w procesie starzenia. Wyniki wyrażone w mg w 1 g mieliny

The distribution of cholesterol changed with age (Fig. 5). When calculated as milligram per 1g of myelin, the cholesterol content started to decline in the 5th decade of life in light and heavy myelin, afterwards no striking changes occurred. When free cholesterol is expressed as percentage of neutral lipids present in myelin fractions, a progressive rise in the myelin membrane fraction

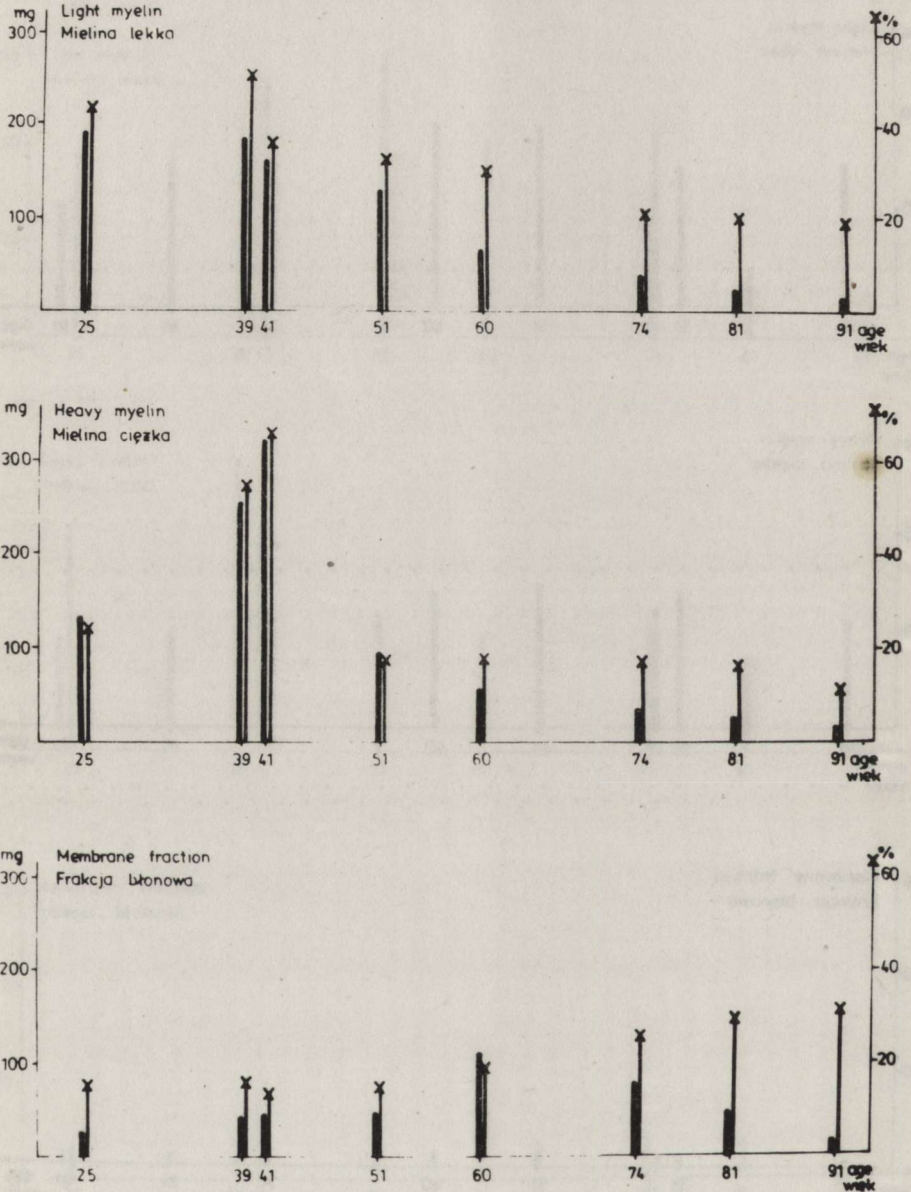


Fig. 5. Cholesterol content in myelin fractions in aging subjects. Results expressed as mg per 1 g of myelin and percentage of neutral lipid content (free form)

Ryc. 5. Zawartość cholesterolu we frakcjach mielin w procesie starzenia. Wyniki wyrażone w mg na 1 g mielin i procent lipidów obojętnych (postać wolna)

after the 5th decade of life was observed. The percentage of esterified cholesterol varied between 0.1 and 3.3 in the particular myelin fractions. No correlation between the content of esterified cholesterol and the age of the subjects was observed.

DISCUSSION

Several morphological and biochemical features, accompanying the aging process in the human brain, have already been described (Creasey, Rapoport 1985). It is known, that aging involves biochemical changes in membranes (myelin), molecules and ions. Usually, however, experimental animals are used (Gaiti et al. 1980), so far only few studies concern the normal aging process of the human brain.

The yield of isolated myelin gradually declines in old age (Berlet, Volk 1980; Berlet et al. 1982; Niebrój-Dobosz et al. 1986, 1988). The proportion of the particular myelin fractions also changes with age. In senile subjects the most "immature" myelin membrane fraction predominates over light and heavy myelin, before the 5th decade of life light myelin predominates (Niebrój-Dobosz et al. 1988). The density of the membrane fraction, when centrifuged in sucrose gradient appears to be more heterogeneous in senile subjects as compared to younger ones (Berlet et al. 1982; Niebrój-Dobosz et al. 1988).

The greater heterogeneity of myelin vesicles in old age is suggested to be the consequence of physicochemical changes (Berlet et al. 1982). No data are known as yet, however, to support this view.

In the present study the main lipid components of human brain myelin were under investigation. Only few data regarding the lipids content and their metabolism in the aging brain have been published so far. No data are available concerning the lipid composition of myelin separated into the particular myelin fractions. It is known to date that in the course of aging of the brain as neurons and myelin are lost, the total lipid content decreases (Fillerup, Mead 1967; Rouser, Yamamoto 1969; Sun, Samorajski 1972) without significant changes in the relative proportions of any of the lipid classes. The latter statement is, however, a matter of some controversy. According to Wender et al. (1987a) the lipids pattern in myelin changes due to age as regards the total phospholipids content, the majority of phospholipid fractions and cholesterol esters increase.

In the present study the progressive loss of lipid content in the course of aging of human brain myelin was comparable to the data of Fillerup and Mead (1967), and Rouser and Yamamoto (1969). Contrary, however, to the latter studies in our material some lipid classes, as phospholipids and cholesterol, decreased concomitantly and some other lipids such as cerebro-sides were nearly stable in the course of adult life. The percentage of free cholesterol increased in the membrane fraction in advanced age, but no changes in esterified cholesterol were found.

There is some evidence that the reduced level of myelin-associated lipids during normal aging results from a decrease of their synthesis. It has been demonstrated that the aging process affects the degree of water-soluble precursors (glycerol and nitrogen base) incorporation into brain phospholipids (Brunetti et al. 1979, 1983; Gaiti et al. 1981, 1982, 1986) and therefore phospholipids synthesis ceases and their content declines with age. Cerebro-sides seemed to be the best preserved lipid class in aged human brain myelin in this study, and also according to Wender et al. (1987a). This is probably the consequence of the fact that cerebro-sides are less subject to exchange and turnover than other myelin lipids (Benjamin, Smith 1977). Some acceleration in lipids catabolism with age cannot be excluded, as according to Wender et al. (1987a), higher levels of phosphatidylcholine and esterified cholesterol are present in senile people. The lipid changes in senile brains myelin are not likely to be the result of a reciprocal shift in lipid and non-lipid myelin components, as proposed by some authors (Wender et al. 1987a). No differences in myelin protein content in advanced age are observed (Berlet et al. 1982). Neither do we suppose that lipid changes in senile human myelin are solely the consequence of vascular alterations and the consequent hypoxia (Wender et al. 1987a), as the pattern of myelin lipids in senile human brain and the found after acute hypoxia in rats are similar (Wender et al. 1987b). In our opinion vascular alterations in senile subjects could be one of the contributing factors, as it is in nutritional deprivation and hormonal deficiency. All these factors, but also the progressive decrease in overall metabolism, may be responsible for slowing down of maturation of human brain myelin observed in the predominance of the most "immature" myelin fraction over the other ones, the relatively higher proportion of free cholesterol and also the greater heterogeneity of this fraction when centrifuged in sucrose gradient to equilibrium. Lipid changes, and especially the relative increase of free cholesterol, may contribute to the observed differences in density of the membrane fraction vesicles in old age.

Acknowledgement: The authors wish to express their gratitude to Professor Irena Hausmanowa-Petrusewicz for a critical review of this paper.

CZY ZMIANY W SKŁADZIE LIPIDOWYM MIELINY WPLYWAJĄ NA GĘSTOŚĆ JEJ PĘCHERZYKÓW W PROCESIE STARZENIA MÓZGU LUDZKIEGO

Streszczenie

W 8 przypadkach w wieku od 25 do 91 lat wyizolowano mielinę z substancji białej mózgu. Stwierdzono stopniowo postępujący z wiekiem spadek ilości wyizolowanej mieliny, obniżanie się ilości lipidów całkowitych i fosfolipidów, szczególnie w mielinie lekkiej i ciężkiej. W najmniej dojrzałej frakcji błonowej mieliny następował natomiast stopniowy względny wzrost wolnego cholesterolu. Poziom cerebrozydów oraz zawartość względna zestryfikowanego cholesterolu nie wykazywały zmian w procesie starzenia.

Zmiany w składzie lipidowym mieliny wynikają najprawdopodobniej z obniżonej ich syntezy w wieku starszym, co łącznie ze zmianą proporcji niektórych lipidów (względny wzrost wolnego cholesterolu) może być powodem powolniejszego dojrzewania mieliny u osób w podeszłym wieku.

REFERENCES

1. Agrawal H. C., Trotter J. L., Burton R. M., Mitchell, R. F.: Metabolic studies on myelin. Evidence for a precursor role of myelin subfraction. *Biochem J.* 1974, 140, 99–109.
2. Bartlett G. R.: Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*, 1959, 234, 466–468.
3. Benjamin J. A., Smith M. E.: Metabolism of myelin. In: *Myelin*. Ed. P. Morell. Plenum Press, New York, London, 1977, pp. 233–270.
4. Berlet H. H., Volk B.: Age related heterogeneity of myelin basic protein isolated from human brain. In: *Aging of the brain and dementia*. Eds.: L. Amaducci, A. N. Davison, P. Antuono, Raven Press, New York, 1980, 13, pp. 81–90.
5. Berlet H. H., Ilzenhöffer H., Echtenacher B., Volk B.: Old age alters density of myelin isolated from human brain: In: *Experimental Brain Research. The aging brain. Physiological and pathological aspects*. Ed.: S. Hoyer. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1982, Suppl. 5, pp. 167–174.
6. Błaszczyszyn M.: Oznaczanie cholesterolu. *Probl Lek*, 1970, 9, 219–221.
7. Brunetti M., Gaiti A., Porcellati G.: Synthesis of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine at different ages of the brain *in vitro*. *Lipids*, 1979, 14, 925–931.
8. Brunetti M., Porcellati G., Gaiti A.: Lipid changes during aging in central nervous system. In: *Molecular aspects of neurological disorders*. Eds.: L. Austin, P. L. Jeffrey, Academic Press, Paris, San Diego, San Francisco, San Paolo, Tokyo, Toronto, 1983, pp. 310–320.
9. Creasey H., Rapoport S. J.: The aging of the brain. *Ann Neurol*, 1985, 17, 1–17.
10. Fillerup D. L., Mead J. F.: The lipids of the aging human brain. *Lipids*, 1967, 2, 295–298.
11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H.: A simple method for isolation and purification of total lipids from animals tissue. *J Biol Chem*, 1957, 226, 497–509.
12. Gaiti A., Brunetti M., Sitkiewicz D., Porcellati G., Woelk H.: Lipid changes in aging brain. In: *Aging of the brain and dementia*. Eds.: L. Amaducci, A. N. Davison, P. Antuono, Raven Press, New York, 1980, 13, pp. 65–73.
13. Gaiti A., Sitkiewicz J., Brunetti M., Porcellati G.: Phospholipid metabolism in neuronal and glial cells during aging. *Neurochem Res*, 1981, 6, 13–22.
14. Gaiti A., Brunetti M., Piccinin G. L., Woelk H., Porcellati G.: The synthesis in *in vivo* of choline and ethanolamine phosphoglycerides in different brain areas during aging. *Lipids*, 1982, 17, 291–296.
15. Gaiti A., Gatti C., Puliti M., Brunetti M.: Phospholipid metabolism in aging brain. In: *Phospholipid research and the nervous system. Biochemical and molecular pharmacology*. Eds.: L. Horrocks, L. Freyn, G. Taffano, Liviano Press, Padova, 1986, pp. 225–231.
16. Hess H. H., Lewin E.: Microassay of biochemical structural components in nervous tissue. II. Method for cerebroside, proteolipids, proteins and residue proteins. *J Neurochem*, 1965, 12, 205–211.
17. Müller J., Vahar-Matiar H.: Eine chromatographische Mikromethode zur Bestimmung der Lipide in Liquor cerebrospinalis. *Z Neurol*, 1974, 206, 333–334.
18. Niebrój-Dobosz I., Rafałkowska J., Barcikowska-Litwin M.: Brain myelin in senile patients with brain infarction. *Neuropat Pol*, 1986, 24, 351–364.
19. Niebrój-Dobosz I., Wiśniewska W., Barcikowska-Litwin M.: Influence of aging on density of myelin fractions isolated from human brain's white matter. A preliminary report. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 19–25.
20. Rouser G., Yamamoto A.: Chemical architecture in the nervous system. *Lipids*. In: *Handbook of neurochemistry*. Ed.: A. Lajtha. Plenum Press, New York, 1969, 1, pp. 121–169.

21. Skipski W. P., Barclay M.: Thin-layer chromatography of lipids In: *Methods in enzymology*. Eds.: S. P. Colwick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1969, pp. 530–598.
22. Sun G. Y., Samorajski T.: Age changes in the lipids composition of whole homogenates and isolated myelin fraction of mouse brain. *J Gerontol*, 1972, 27, 10–17.
23. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Szczech J., Godlewski A.: Pattern of myelin lipids in ageing brain. *Neuropat Pol*, 1987a, 25, 235–245.
24. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Pankrac J., Talkowska D., Grochowalska A.: Effect of acute hypoxia on myelin lipids. *Neuropat Pol*, 1987b, 25, 107–115.

Authors' address: Department of Neurology, School of Medicine, Banacha 1a Str., 02–097 Warsaw, Poland.

PIOTR BOROŃ, TERESA SZPAKOWICZ, RYSZARD FARBISZEWSKI,
ROBERT FLISIAK, HENRYK NOWAK, BARBARA PYTEL, LECH ZIMNOCH

BADANIA NAD WPŁYWEM DIETY BEZBIAŁKOWEJ
I STOSOWANIA AMINOKWASÓW WIELOROZGAŁĘZIONYCH
(PREPARAT AMINOSTERIL-HEPA) NA WYBRANE WSKAŹNIKI
BIOCHEMICZNE W PRZEWLEKŁEJ DOŚWIADCZALNEJ
ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ*

Klinika Chorób Zakaźnych, Zakład Chemii Fizycznej, Zakład Anatomii
Patologicznej, Akademia Medyczna, Białystok

Patogeneza encefalopatii wątrobowej, pomimo znacznego postępu wiedzy w tym zakresie, nie jest dotychczas jednoznacznie interpretowana, z czym wiążą się również ograniczenia w wykorzystaniu patogenetycznych aspektów terapii tych ciężkich i groźnych dla życia chorego stanów chorobowych.

W różnych modelach doświadczalnych na zwierzętach z wywołaniem niewydolności wątrobowej z wtórną encefalopatią, podejmuje się próby stosowania metod terapeutycznych wpływających, między innymi, na regulację zaburzonego metabolizmu aminokwasów (Rossi-Farelli i wsp. 1982; Bugge i wsp. 1986). Zachwianie równowagi pomiędzy stężeniem aminokwasów alifatycznych i aromatycznych ze wzrostem przewagi tych ostatnich, ma stanowić jeden z czynników patogenetycznych w rozwoju encefalopatii wątrobowej (Bode, Schafer, 1985; Ferenci 1986).

Biorąc powyższe dane pod uwagę podjęto próbę oceny wpływu zastosowania diety bezbiałkowej, z równoczesnym odpowiednio zmodyfikowanym żywieniem parenteralnym, na zachowanie się wybranych wskaźników biochemicznych w przebiegu przewlekłej, doświadczalnej encefalopatii wątrobowej u szczurów. W żywieniu parenteralnym stosowano roztwory ze zwiększoną zawartością aminokwasów alifatycznych o rozgałęzionych łańcuchach (preparat Aminosteril-Hepa, firmy Fresenius, RFN).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w trzech grupach szczurów rasy Wistar, samców. Grupa I obejmowała 21 szczurów, u których wywołano doświadczalną

* Praca wykonana w ramach Problemu CPBP 06-02. II.2.2

encefalopatię wątrobową przez dwukrotne podanie dootrzewnowe roztworu tioacetamidu w dawce 187,5 mg/kg masy ciała w odstępie 24-godzinnym (własna modyfikacja). W 24 godziny po podaniu ostatniej dawki tioacetamidu rozpoczęto podawanie dootrzewnowe preparatu Aminosteril-Hepa w dawce 7,5 ml/kg dziennie, przy czym zwierzęta były na diecie bezbiałkowej. Po upływie 3, 5 i 7 dni od zakończenia podawania tioacetamidu, oznaczono wybrane wskaźniki biochemiczne w krwi i surowicy, za każdym razem u innych 7 szczurów w tej grupie.

Grupa II obejmowała 21 szczurów, u których wywołano encefalopatię wątrobową w taki sam sposób jak w grupie I. Zwierzęta tej grupy były na „normalnej diecie” tzn. 1 g białka/kg masy ciała dziennie, bez stosowania preparatu Aminosteril-Hepa. Oznaczanie parametrów biochemicznych przeprowadzono w 3, 5 i 7 dniu od zakończenia podawania tioacetamidu, za każdym razem u innych 7 szczurów w ramach tej grupy.

Grupa III obejmowała 10 szczurów, u których w 24 godziny od ostatniego podania tioacetamidu i w sposób podobny jak w grupach I i II, oznaczono wybrane wskaźniki biochemiczne.

Grupa IV kontrolna obejmująca 10 szczurów stanowiła materiał dla ustalenia wartości prawidłowych badanych wskaźników do analiz porównawczych.

Jako kryterium rozwiniętej encefalopatii wątrobowej w tym modelu badań, przyjęto za Hilgierem i Albrechtem (1984) charakterystyczne zmiany histologiczne wątroby (Nowak i wsp. 1988), manifestujące się głównie rozlanym zwyrodnieniem tłuszczowym hepatocytów, ogniskowo-rozszianą martwicą hepatocytów i ogniskowym włóknieniem oraz co najmniej dwukrotnym wzrostem wartości amoniaku we krwi i fenoli w surowicy (Hilgier, Albrecht, 1984).

W postępowaniu metodycznym uwzględniono analizę zachowania się wartości badanych wskaźników biochemicznych:

1. Poziomu amoniaku we krwi metodą kolorymetryczną przy długości fali 625 nm i odczycie za pomocą spektrokolorymetru Specol (NRD) (Fuju, Okuda, 1975).

2. Poziomu fenoli w surowicy według Kinga i Armstronga (1934),

3. Poziomu tyrozyny i fenyloalaniny w surowicy metodą spektrofotometryczną z odczytem dla tyrozyny przy długości fali 280 nm, a dla fenyloalaniny przy długości fali 260 nm, za pomocą spektrofotometru Spectromom 1950 (Węgry) (Richterich 1971).

4. Poziomu tryptofanu w surowicy według Spiesa i Chambersa 1970.

5. Poziomu azotu α -aminowego w surowicy jako wskaźnika tzw. drobin średnich, oznaczanego metodą ninhydrynową (Devenyi, Gergely 1968) w modyfikacji Farbiszewskiego i wsp. (1987). Osocze po odbiałczeniu 10% kwasem nadchlorowym, odwirowaniu i zubożeniu do pH 7,4, poddawano działaniu odczynnika ninhydrynowego. Wynik odczytywano spektrofotometrycznie przy długości fali 570 nm za pomocą Spectromom 1950 (Węgry).

Liczbowe wyniki badań poddano analizie statystycznej według testu

analizy wariancji dla wielu średnich (F) odczytując wyniki z tabeli F Snedecora dla przyjętego poziomu ufności $\alpha = 0,05$ i dla liczby stopni swobody 3 i 30, przy wartości krytycznej $F \alpha = 2,92$ (tab. 3). Przy porównywaniu z wartościami prawidłowymi wykorzystywano tekst *t*-Studenta (tab. 1 i 2) (Greń 1974).

WYNIKI

W przebiegu zastosowanego modelu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej obserwowano ponad dwukrotny, istotny statystycznie wzrost amoniaku we krwi (grupa III), w porównaniu z wartościami prawidłowymi (grupa IV) (tab. 1). Przeprowadzone postępowanie terapeutyczne, z podawaniem roztworu aminokwasów ze zwiększoną zawartością aminokwasów alifatycznych (walina, leucyna, izoleucyna) w postaci preparatu Aminosteril-Hepa, u szczurów z grupy I powodowało obniżenie poziomu amoniaku we krwi w 7 dobie, do tylko nieco wyższych wartości od normy. Podobnie zachowywał się poziom amoniaku w grupie II, w której nie stosowano preparatu Aminosteril-Hepa (tab. 1).

Poziom fenoli w surowicy u szczurów z grupy III wykazywał wartości przeszło czterokrotnie wyższe w stosunku do normy. Zastosowanie terapeutyczne preparatu Aminosteril-Hepa u szczurów z grupy I powodowało obniżenie stężenia fenoli znacznie poniżej normy już w 3 dobie. Obniżony poniżej normy poziom fenoli w surowicy utrzymywał się również w 5 i 7 dobie badania. Zastosowanie samej diety białkowej bez preparatu Aminosteril-Hepa (grupa II) wpływało w tym samym okresie badań na tendencję wzrostową, ale utrzymującą się w granicach normy w stosunku do pierwotnie wykazywanych wysokich wartości fenoli w surowicy (tab. 1).

W zakresie wartości tyrozyny w surowicy nie obserwowano istotnych zmian jej poziomu, zarówno przed, jak i w kolejnych jej oznaczeniach w trakcie leczenia preparatem Aminosteril-Hepa (tab. 2). Stężenie tego aminokwasu w surowicy zarówno w grupie I, jak i II badanych szczurów było zbliżone do normy.

Stężenie fenyloalaniny w surowicy, które w momencie wywołania encefalopatii było nieco podwyższone, również szybko powracało do normy, niezależnie od dalszego postępowania. Jednakże w 5 dniu badania u szczurów z grupy I spostrzegano przejściowe podwyższenie poziomu fenyloalaniny do wartości wyjściowej stanu encefalopatii wątrobowej (tab. 2).

Pierwotnie obniżony poziom tryptofanu w surowicy u szczurów z grupy III w stosunku do normy (grupa IV) wykazywał podwyższone wartości zarówno w grupie I, jak i II, nie przekraczając jednak w grupie szczurów leczonych preparatem Aminosteril-Hepa wartości prawidłowych. Natomiast w grupie II z pełnym pokryciem zapotrzebowania na białko w diecie, ale bez stosowania preparatu Aminosteril-Hepa, spostrzegano w 5 dobie nieistotne przekroczenie normy z późniejszą stopniową normalizacją (tab. 2).

Poziom azotu α -aminowego w surowicy (tab. 1) wykazywał w przebiegu

Tabela 1. Porównanie średnich wartości amoniaku we krwi oraz fenoli i azotu α -aminowego w surowicy szczurów doświadczalnych z wartościami prawidłowymi (grupa IV).

Table 1. Comparison of mean values of blood ammonia, serum phenols and α -amin nitrogen in experimental rats with normal values (group IV)

Grupa Group	Amoniak ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) Ammonia ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$)				Fenole ($\mu\text{mol}/1$) Phenols ($\mu\text{mol}/1$)				Azot α -aminowy ($\mu\text{mol}/1$) α -amino nitrogen ($\mu\text{mol}/1$)			
	0	3d	5d	7d	0	3d	5d	7d	0	3d	5d	7d
I	x	170,2	227,5	159,2		391,0	387,7	443,6		91,7	144,0	54,7
	SD	136,0	52,5	69,4		62,7	49,8	63,5		16,8	34,2	22,5
	t	0,843	4,480	1,244		5,400	6,390	3,580		2,540	4,810	0,351
	p	>0,40	<0,001*	>0,20		<0,001*	<0,001*	<0,005*		<0,05*	<0,001*	>0,70
II	x	143,0	213,0	160,0		251,7	536,0	562,0		141,7	121,7	129,3
	SD	53,6	45,3	34,5		82,6	111,0	32,2		21,4	16,5	85,3
	t	0,874	4,530	2,370		8,110	0,335	0,495		5,960	4,920	1,924
	p	>0,30	<0,001*	<0,05*		<0,001*	>0,70*	>0,60		<0,001*	<0,001*	>0,05
III	x	267,2				2470,0				209,6		
	SD	138,0				965,0				155,6		
	t	2,54				4,870				2,330		
	p	<0,05*				<0,001*				<0,05*		
IV	x		123,1				552,0				59,5	
	SD		16,5				37,6				26,2	

*Różnice istotne statystycznie

*Differences statistically significant

Tabela 2. Porównanie średnich wartości aminokwasów aromatycznych w surowicy w badanych grupach szczurów z wartościami prawidłowymi (grupa IV)

Table 2. Comparison of mean values of serum aromatic amino acids in experimental rats with normal values (group IV)

Grupa Group	Tyrozyna (µg/ml) Tyrosine (µg/ml)				Fenyloalanina (µg/ml) Phenylalanine (µg/ml)				Tryptofan (µg/ml) Tryptophan (µg/ml)			
	0	3d	5d	7d	0	3d	5d	7d	0	3d	5d	7d
I	x	8,03	9,01	7,82		21,9	25,1	21,3		11,4	11,8	10,3
	SD	1,8	1,7	0,85		2,8	3,5	3,7		1,8	3,9	1,9
	t	0,129	1,496	0,239		0,075	1,932	0,417		1,585	1,298	p2.600
	p	>0,80	>0,10	>0,80		>0,90	>0,05	>0,60		>0,10	>0,20	>0,025*
II	x	7,1	8,2	8,1		19,6	22,5	22,6		13,0	14,5	13,1
	SD	1,0	2,5	1,8		2,4	5,8	2,7		1,8	3,8	1,1
	t	1,682	0,286	0,491		1,962	0,202	0,453		0,612	0,883	0,121
	p	>0,10	>0,80	>0,60		>0,05	>0,80	>0,60		>0,50	>0,30	>0,90
III	x	7,5				25,2				9,3		
	SD	1,0				3,1				1,6		
	t	0,841				2,190				3,887		
	p	>0,40				<0,05*				<0,005*		
IV	x		7,9				22,0				13,0	
	SD		1,6				1,8				1,7	

*Różnice istotne statystycznie

*Differences statistically significant

doświadczalnej encefalopatii wątrobowej u szczurów z grupy III, wartości średnie 3,5 razy wyższe od normy. Stosowanie podaży białka w diecie (szczury z grupy II), powodowało stopniowe obniżenie poziomu azotu α -aminowego, ale z ustabilizowaniem go w 7 dobie jeszcze na poziomie dwukrotnie przewyższającym normę. Natomiast zastosowanie preparatu Aminosteril-Hepa (szczury z grupy I) powodowało już w 3 dobie znaczne obniżenie poziomu azotu α -aminowego z osiągnięciem w 7 dobie wartości prawidłowych.

OMÓWIENIE

W koncepcji pracy założono terapeutyczne zastosowanie mieszanek aminokwasowych typu preparat Aminosteril-Hepa z obniżoną zawartością zespołu aminokwasów aromatycznych takich jak fenyloalanina, tyrozyna i tryptofan oraz ze zwiększoną zawartością aminokwasów alifatycznych wielorozgałęzionych. W badanym modelu przewlekłej encefalopatii wątrobowej u szczurów mogłyby one ewentualnie wpływać normalizująco, względnie obniżająco, na pierwotnie znacznie podwyższone wartości badanych wskaźników biochemicznych we krwi, takich jak amoniak czy fenole, traktowanych jako biochemiczne wykładniki tego typu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej.

Przedłużony okres badań kontrolnych do 7 dni (0, 3, 5 i 7 dzień) ilustruje zróżnicowany wpływ stosowanego roztworu aminokwasów na zachowanie się amoniaku we krwi. Jego poziom po nieznacznym obniżeniu w 3 dobie uległ następnie przejściowej, lecz znamiennej zwyżce w 5 dobie, by ponownie obniżyć się w 7 dobie do wartości tylko nieco przekraczających prawidłowe (tab. 1). Podobne zachowanie się stężenia amoniaku zaobserwowano również w grupie II badanych szczurów, którym nie podawano preparatu Aminosteril-Hepa, a w diecie zastosowano podaż białka. Jednakże w tym wypadku po obserwowanej również w 5 dobie znamiennej zwyżce poziomu amoniaku, następował w 7 dobie spadek do wartości wyższych od normy i wykazujących względem niej różnice istotne statystycznie (tab. 1). W dynamice zmian stężenia amoniaku we krwi, w tej samej grupie II szczurów, najniższe wartości spostrzegano już w 3 dniu badania. Nie różniły się one, podobnie jak w przypadku grupy I, w sposób istotny od normy. Przeprowadzona pomiędzy grupami analiza wariancji dla wielu średnich wykazała różnice znamienne w 5 i 7 dobie obserwacji (tab. 3). Można by zatem sądzić, że zastosowanie terapeutyczne tego typu roztworu aminokwasów, w stosunku do porównywalnego leczenia dietetycznego z zawartością 1 g białka/kg masy ciała na dobę, pomimo obserwowanego w grupie I nieco korzystniejszego obniżenia poziomu amoniaku w 7 dobie obserwacji, nie ma istotnego wpływu różnicującego na jego zachowanie się we krwi w obu badanych grupach szczurów.

W odniesieniu do 4-krotnie wyższych wartości fenoli w surowicy w momencie ujawnienia encefalopatii wątrobowej, zastosowanie preparatu Aminosteril-Hepa doprowadzało wcześniej niż wartości amoniaku, bo już w 3 dobie badania, do wartości znamienne niższych względem normy. Istotne statystycz-

nie obniżenie wartości poniżej normy utrzymywało się w 5 i 7 dobie obserwacji tylko w grupie I, gdy tymczasem w grupie II obserwowano w tym okresie normalizację, a nawet nieznaczne przekroczenie średnich wartości prawidłowych (tab. 1). Analiza wariancji dla wielu średnich wykazała pomiędzy wszystkimi badanymi grupami różnice istotne statystycznie w 3, 5 i 7 dobie (tab. 3). Na podstawie obu analiz statystycznych można przyjąć, że zachowanie się poziomu fenoli w surowicy w obu doświadczalnych modelach terapeutycznych jest zróżnicowane i wykazuje szybszą normalizację przy stosowaniu diety z podażą białka (grupa II).

Wprowadzenie w naszych badaniach dodatkowej równoległej analizy uzyskiwanych poszczególnych aminokwasów aromatycznych (tyrozyny, fenyloalaniny, tryptofanu) oraz wartości azotu α -aminowego w surowicy, jako wykładnika tzw. drobin średnich, może poszerzać możliwości interpretacyjne patogenezy encefalopatii wątrobowej. Daje to również możliwość oceny efektów terapeutycznych ewentualnego stosowania tego typu mieszanek aminokwasów jak preparatu Aminosteril-Hepa u ludzi. Wpływ preparatu Aminosteril-Hepa, w odniesieniu do analizowanych aminokwasów aromatycznych nie odzwierciedla jednak jednoznacznie jednokierunkowych zmian w ich wartościach w surowicy badanych szczurów (tab. 2.)

Wartości poziomów tyrozyny w surowicy w kolejnych badaniach, w dniach 3, 5 i 7 były zbliżone do normy, zarówno w grupie szczurów którym podano preparat Aminosteril-Hepa, jak i w grupie szczurów tylko z podażą białka w diecie (tab. 2). Istotne statystycznie zróżnicowanie wartości na podstawie analizy wariancji dla wielu średnich obserwowano jedynie w 5 dobie obserwacji (tab. 3). Stężenie fenyloalaniny w surowicy, w stosunku do znamiennej podwyższonej jej pierwotnej wartości już począwszy od 3 doby obserwacji połączonej z terapią, zarówno w I, jak i w II grupie szczurów, wykazywało wartości nie różniące się istotnie od normy (tab. 2). Jednak analiza wariancji dla wielu średnich przeprowadzona dla stężeń fenyloalaniny wykazała istotne różnice pomiędzy badanymi grupami w 3, 5 i 7 dobie obserwacji (tab. 3). Zachowanie tryptofanu w surowicy wykazuje natomiast większe zróżnicowanie. Pierwotnie obserwowane istotne statystycznie obniżenie jego stężenia uległo w obu modelach terapeutycznych podwyższeniu do wartości nie różniących się jednak znamiennej od normy w 3 dobie leczenia (tab. 2). Jednakże wartości obserwowane w grupie szczurów, którym podawano Aminosteril-Hepa były przez cały okres obserwacji niższe od wartości w grupie II, a w 7 dobie badania zaobserwowano ich spadek do wartości znamiennej niższych od normy (tab. 2). Tymczasem w grupie II obserwowano w 5 dniu badania przejściowy wzrost stężenia tryptofanu w surowicy nie odbiegający w sposób istotny od normy i ulegający normalizacji w 7 dniu badania. Podobnie jak w przypadku fenyloalaniny analiza wariancji dla wielu średnich wykazała różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami w 3, 5 i 7 dobie obserwacji (tab. 3). Na podstawie danych można przyjąć, że zastosowanie któregośkolwiek z proponowanych doświadczalnych modeli leczenia dietetycznego nie zmienia w sposób

istotny poziomów tyrozyny i fenyloalaniny. Jednak różne zachowanie się stężeń tego ostatniego aminokwasu obserwowane w poszczególnych grupach, wykazuje cechy istotności statystycznej przy analizie wariancji dla wielu średnich (tab. 3).

Tabela 3. Analiza statystyczna w poszczególnych dobach 3, 5 i 7 badania na podstawie testu analizy wariancji dla wielu średnich

Table 3. Statistical analysis in 3rd, 5th and 7th day of examination using variance analysis for many mean values

	3 d	5 d	7 d
Amoniak Ammonia	$F = 2,88 < 2,92 = F\alpha$	$F = 4,89 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 4,00 > 2,92 = \alpha^*$
Fenole Phenols	$F = 28,9 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 22,1 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 21,95 > 2,92 = F\alpha^*$
Azot α -aminowy α -amino nitrogen	$F = 2,26 < 2,92 = F\alpha$	$F = 2,05 < 2,92 = F\alpha$	$F = 3,72 > 2,92 = F\alpha^*$
Tyrozyna Tyrosine	$F = 0,38 < 2,92 = F\alpha$	$F = 2,96 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 1,50 < 2,92 = F\alpha$
Fenyloalanina Phenylalanine	$F = 8,9 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 3,37 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 5,1 > 2,92 = F\alpha^*$
Tryptofan Tryptophan	$F = 5,22 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 3,59 > 2,92 = F\alpha^*$	$F = 9,2 > 2,92 = F\alpha^*$

*Różnice istotne statystycznie

*Differences statistically significant

Dyskutowane znaczenie patogeniczne w encefalopatii wątrobowej tzw. drobin średnich (Boroń-Kaczmarek i wsp. 1983; Marshall i wsp. 1984; Farbiszewski i wsp. 1987), których wykładnikiem biochemicznym, przy zastosowanej metodzie badania, są wartości azotu α -aminowego w surowicy, wykazuje charakterystyczną dynamikę zmian. W przyjętym modelu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej, w momencie jej ujawnienia stwierdzono w surowicy jego wysokie wartości przeszło 3,5-krotnie wyższe od normy (tab. 1).

Przy zastosowaniu preparatu Aminosteril-Hepa, stężenia azotu α -aminowego w grupie I szczurów obniżały się już w 3 dniu badań (do 91,7 $\mu\text{mol/l}$), a w 5 wykazywały tendencję wzrostową (do 144,0 $\mu\text{mol/l}$). Porównanie z wartościami prawidłowymi wykazywało w tym okresie cechy istotności statystycznej (tab. 1). Natomiast w 7 dniu poziom azotu α -aminowego obniżał się do wartości prawidłowych (tab. 1). W II grupie szczurów z podażą białka w diecie, w stosunku do wysokich wartości wyjściowych, w kolejnych badaniach, w dniach 3, 5, 7 wystąpiła tendencja do obniżenia się wartości azotu α -aminowego w surowicy, ale bez cech normalizacji. Jeszcze w 7 dniu badania jego wartość średnia była dwukrotnie wyższa od normy. Różnica ta

nie była istotna statystycznie w przeciwieństwie do wartości osiągniętych w 3 i 5 dobie badania (tab. 1). Przeprowadzenie analizy wariancji dla wielu średnich wykazało jednak znamienne zróżnicowanie zachowania się poziomów azotu α -aminowego w poszczególnych grupach właśnie w 7 dobie badania (tab. 3). W związku z tym wydaje się, że stosowanie preparatu Aminosteril-Hepa wpływa korzystniej na normalizację poziomu azotu α -aminowego niż stosowanie diety z podażą białka.

Można sądzić, że zróżnicowane kierunki metaboliczne amoniaku i fenoli w zastosowanym modelu encefalopatii wątrobowej, nie odpowiadają jednokierunkowo, na ewentualny regulujący wpływ stosowanego roztworu aminokwasów, czy też podaży białka w diecie. Bardziej może to dotyczyć zachowania się fenoli w surowicy, aniżeli amoniaku we krwi. Wpływ podaży białka w diecie na poziom fenoli w surowicy wyraża się między innymi tendencją do wykazywania w późniejszych dniach badania wyższych, a jednocześnie bardziej zbliżonych do prawidłowych wartości, aniżeli u szczurów ze stosowaniem preparatu Aminosteril-Hepa.

W odniesieniu do analizowanych aminokwasów aromatycznych nie potwierdzono w naszych badaniach spostrzeżeń Fischera (1984), Soetera i Fischera (1976) oraz Holma i wsp. (1981) o normalizującym wpływie określonych mieszanek aminokwasowych typu Aminosteril-Hepa na wartości badanych aminokwasów aromatycznych (tyrozyna, fenyloalanina, tryptofan) w surowicy. Jedynie w zakresie tryptofanu zróżnicowanie jego zachowania wykazywało istotność statystyczną (tab. 3). Wyrażało się to wyższymi jego wartościami w surowicy po zastosowaniu diety z podażą białka w późniejszych dniach badania (5 doba). Natomiast zastosowanie Aminosterilu-Hepa powodowało w 7 dobie znamienne obniżenie poziomu tryptofanu poniżej normy (tab. 2).

Wykazany przez nas fakt lepszego efektu regulacyjnego mieszanki aminokwasów typu Aminosteril-Hepa, normalizującego pierwotnie podwyższone wartości azotu α -aminowego w surowicy w końcowym okresie badania (7 dzień), w odróżnieniu od szczurów z podażą białka w diecie, jest trudny do interpretacji i wymaga dodatkowych badań z wydłużeniem czasu obserwacji zwierząt, a także odpowiednich obserwacji klinicznych. Należy zwrócić uwagę na podobne zachowanie się poziomów amoniaku i azotu α -aminowego w grupie szczurów, u których stosowano Aminosteril-Hepa. W przypadku obu parametrów obserwowano, po wstępnym obniżeniu ich poziomów w 3 dobie badania, narastanie wartości w 5 dobie badania, być może związane z podażą wspomnianego preparatu i wzrostem stężenia ciał azotowych w ustroju.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań upoważniają do sformułowania następujących opinii:

- 1) W badanym modelu doświadczalnej encefalopatii wątrobowej stosowa-

nie mieszanki aminokwasów typu Aminosteril-Hepa wywiera efekt hamujący na normalizację poziomu fenoli w surowicy, co wyraża się trwalszym obniżeniem ich poziomu poniżej normy, przy występujących wartościach powyżej normy u szczurów leczonych dietą białkową.

2) Zastosowanie preparatu Aminosteril-Hepa nie wpływa istotnie różnicująco na zachowanie się wartości tyrozyny i fenyloalaniny w surowicy badanych szczurów. Powoduje natomiast obniżenie poziomu tryptofanu w surowicy, zwłaszcza przy dłuższym jego stosowaniu.

3) Azot α -aminowy, jako wykładnik tzw. drobin średnich ulega szybciej efektowi normalizacyjno-regulacyjnemu stosowanej mieszanki aminokwasów niż po stosowaniu podaży białka w diecie.

INFLUENCE OF PROTEIN-FREE DIET AND BRANCHED-CHAIN AMINO ACIDS INFUSION (AMINOSTERIL-HEPA) ON SELECTED BIOCHEMICAL INDICES IN EXPERIMENTAL CHRONIC LIVER ENCEPHALOPATHY

Summary

The latest observations suggest that a decreased level of serum branched-chain amino acids plays a role in the pathogenesis of liver encephalopathy.

In this study we analysed the behaviour of the serum concentrations of: ammonia, phenols, α -amino nitrogen, tyrosine, phenylalanine and tryptophan in rats with thioacetamide-induced liver encephalopathy. The first group of rats was on protein-free diet and Aminosteril-Hepa (Fresenius FRG) – an amino acids solution with predominance of branched-chain amino acids. The second group of rats received a diet with 1 g/kg b. w. of protein daily. The levels of biochemical indices were analysed 0, 3, 5 and 7 days after liver encephalopathy development.

The results of our study indicate a favourable influence of infusion a branched-chain amino acids solution (Aminosteril-Hepa) on the biochemical indices, particularly phenols and α -amino nitrogen in experimental liver encephalopathy.

PIŚMIENNICTWO

1. Bode J. Ch., Schafer K.: Pathophysiology of chronic hepatic encephalopathy, *Hepatogastroenterology*, 1985, 32, 259–268.
2. Boroń-Kaczmarek A., Farbiszewski R., Szpakowicz T., Gabryel H.: Alpha-amino nitrogen in serum a relation to the behaviour of free aromatic amino acids and branched-chain amino acids in prognosis of development of liver encephalopathy. Abstracts, *Acute liver insufficiency*, Białystok, 1983, 21.
3. Bugge M., Bengtsson F., Nobin A., Holmin T., Jeppsson B., Hultberg B., Falck A., Herlin P.: Amino acids and indoleamines in the brain after infusion of branched-chain amino acids to rats with liver ischemia. *J Parenter Ent Nutrition*, 1986, 10, 474.
4. Devenyi T., Gergely I.: Analytische Methoden zur Untersuchung von Aminosäuren Peptiden und Proteinen. *Akademiai Kiado*, Budapest, 1968, 249.
5. Farbiszewski R., Gabryel H., Boroń-Kaczmarek A., Hołownia A., Sokół A.: Blood plasma peptides of rats after administration of ethanol or acetaldehyde. *Alcohol Alcohol*, 1987, 22, 41.
6. Ferenci P.: Pathogenesis of hepatic encephalopathy. Abstracts VII International Congress of Liver Diseases – Cirrhosis, Basel, 1986, 57.

7. Fischer J. E.: Treatment of hepatic encephalopathy with branched-chain amino-acids. W: Advances in hepatic encephalopathy and urea cycle disease. Red.: Kleinberger, Ferenci, Riederer, Thaler, Karger, Basel, 1984, 27.
8. Fujii S., Okuda H.: New method for estimation of various deaminases by direct colorimetric determination of ammonia. *Tokushima J Exp Med.* 1975, 141, 1
9. Greń J.: Statystyka matematyczna, modele i zadania, PWN, Warszawa, 1974.
10. Hilgier W., Albrecht J.: Poziom amoniaku oraz jego metabolitów mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej, podczas przedłużonego działania acetamidu i w okresie powrotu do normy. *Neuropat Pol.* 1984, 22, 179–184.
11. Holm E., Streibel J. P., Moller P., Hartman M.: Amino acid solutions for parenteral nutrition and for adjuvant treatment of encephalopathy in liver cirrhosis: Studies concerning 120 patients; W: Metabolism and clinical implications of branched-chain amino and ketoacids. Red.: Walser, Williamson, Elsevier, North-Holland, New York, 1981, 513.
12. King E. J., Armstrong A. R.: Microanalysis in medical biochemistry. *Can Med Assoc.* 1934, 31, 376.
13. Marshall T., Vestberg O., Williams K. M.: Effects of alcohol abuse on human serum protein revealed by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1984, 5, 122.
14. Nowak H. F., Zimnoch L., Boroń P., Farbiszewski R., Szpakowicz T., Flisiak R., Pytel B.: Badania morfologiczne nad wpływem diety bezbiałkowej i stosowania aminokwasów wielorozgałęzionych (prep. Aminosteril-Hepa firmy Fresenius) na wątrobę doświadczalnie uszkodzoną tioacetamidem. *Patol Pol.* 1988. (w druku).
15. Richterich R.: Chemia kliniczna, PZWL, Warszawa, 1971, 256.
16. Rossi-Farelli F., Freund H., Krause R., Smith A., James J. H., Castorino-Zipparo S., Fischer J. E.: Induction of coma in normal dogs by the infusion of aromatic amino acids and its prevention by the administration of branched chain amino acids. *Gastroenterology*, 1982, 83, 664.
17. Spies J. R., Chambers D. C.: *Anal Chem* 1949, 21, 1240. Za: Protein sequence determinations. Red.: S. B. Needleman, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1970.
18. Soeter P. B., Fischer J. E.: Insulin, glucagon, amino acid imbalance and hepatic encephalopathy. *Lancet.* 1976, 2, 880–882.

Adres autorów: Klinika Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej, ul. Żurawia 14, 15–540 Białystok.

HALINA KROH, HALINA WEINRAUDER

IMMUNOCYTOCHEMICAL ALPHA-1-ANTICHYMOTRYPSIN LOCALIZATION IN THE EXPERIMENTAL BRAIN TUMORS AND AT THEIR PERIPHERY

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

Alpha-1-antichymotrypsin (A-1-ACT) as a marker for human sarcomas and carcinomas is of little value due to its unspecific positive staining (Bertrand et al. 1984; Leader et al. 1987) but reliably marks macrophages and tumors of histiocytic origin (Cohen 1973; Gupta et al. 1979; Nathrath, Meister 1982; Permanetter, Meister 1984). The high content of A-1-ACT in brain tumor cells is proportional to regional proteolytic and inflammatory activity (Sawaya et al. 1987). The function of A-1-ACT being connected with a protection against neutral proteases by inhibiting fibrinolysis induced us to evaluate its presence in the peritumoral astrocytes known for their progressive and regressive alterations around neoplastic foci.

MATERIAL AND METHODS

Twenty two experimental brain tumors with surrounding nerve tissue induced in 12 Wistar rats by transplacental enthyl-nitrosourea were examined. The internal organs and one brain of an unaffected rat served as controls. The brains were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. The age of the paraffin blocks ranged from 1–14 years. The material was chosen from a larger series of central nervous system tumors of various sizes, ranging from early neoplastic proliferations to neoplasms affecting the whole hemisphere, and consisted of single or multiple tumors (up to three per brain). The tumors were histologically uniform or mixed and showed various degrees of anaplasia. They were classified according to WHO (Zülch 1979) after staining with hematoxylin-eosin, Klüver-Barrera and Gridley method for reticulin.

For immunocytochemical assessment the paraffin sections 10 μ thick were used, the procedure was that of indirect immunoperoxidase. A polyclonal

rabbit antichymotrypsin antiserum was obtained from Dacopatts (Copenhagen), dilution 1:50 and goat antirabbit IgG-F (ab₂) fragment conjugated with peroxidase from Behringwerke (Mannheim), dilution 1:20 control stainings were performed on the sections with PBS instead of antiserum.

RESULTS

Among the ten large tumors there were 5 oligodendrogliomas including one with anaplastic features. The remaining ones were mixed oligodendrogliomas-astrocytomas, three of which were anaplastic.

The five medium sized tumors were anaplastic oligodendrogliomas-astrocytomas, one astrocytoma and one uniform oligodendroglioma.

All five microtumors were oligodendrogliomas.

Two foci of early neoplastic proliferations were also studied.

The cellular expression of A-1-ACT was examined in peritumoral tissue, at the tumor margin and in the centre of the tumors.

The large oligodendrogliomas gave positive, diffuse immunostaining in the perikaryon and branched processes of large, reactive astrocytes located at the peripheral zone of the tumor, best marked among dispersed neoplastic infiltrates (Fig. 1). The number of cells and the intensity of staining varied from tumor to tumor. There were also positive cells in central areas of neoplasms, but the more dense the tumor, the less numerous the stained cells. Among the mixed cell population of oligodendrogliomas-astrocytomas the number of positively stained cells was much higher. Besides the positively staining astrocytes at the tumor periphery we encountered numerous positive tumor cells in the centre of neoplasm independent on cell density and other neoplastic features (Fig. 2). At the margin of necrotic foci a moderate number of balloon-like cells were identified as macrophages, filled with heavily staining granular material. Such cells were also dispersed haphazardly in tumor tissue. In the

Fig. 1. Immunostained reactive astrocytes in the infiltration zone of large oligodendroglioma. A-1-ACT. $\times 400$

Ryc. 1. Immunododatnie astrocyty odczynowe w strefie nacieku dużego skąpodrzewiaka. A-1-ACT. Pow. $400 \times$

Fig. 2. Immunostained astrocytic cells, also binuclear, in dense, pleomorphic neoplastic tissue. A-1-ACT. $\times 400$

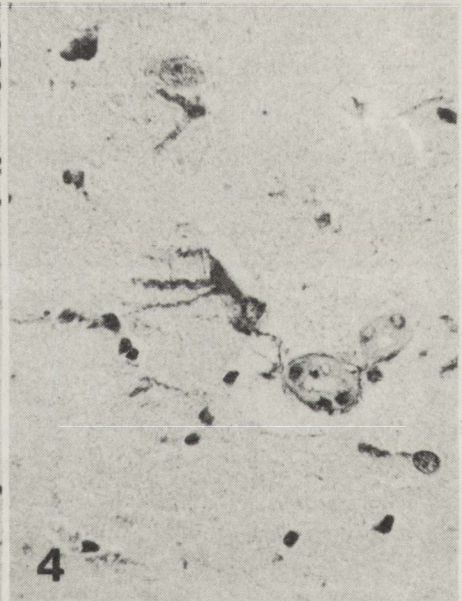
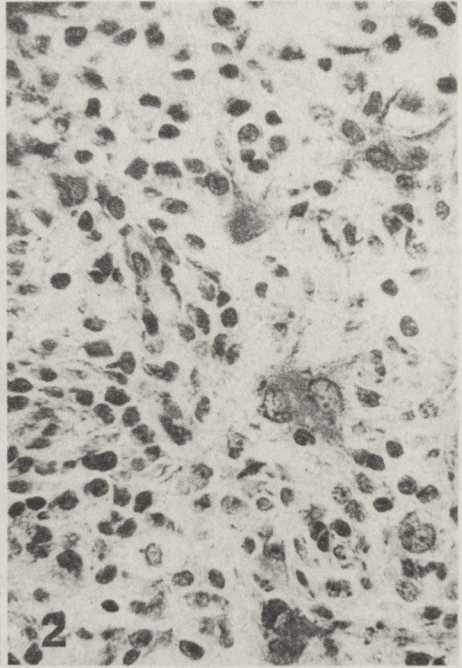
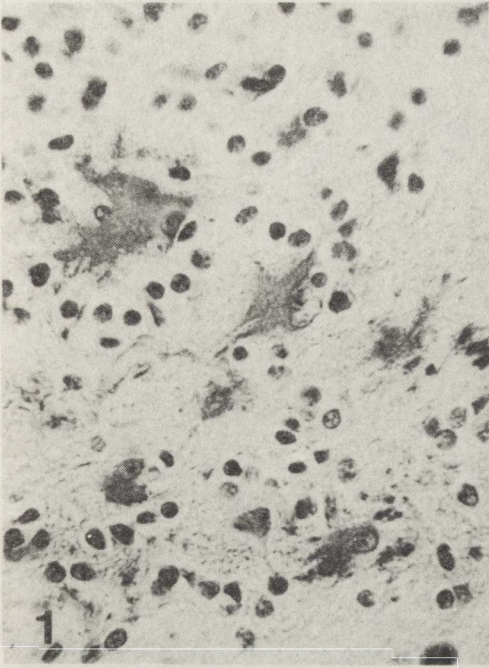
Ryc. 2. Immunododatnie komórki astrocytarne, także dwujądżrzaste w gęstym pleomorficznym nacieku nowotworowym. A-1-ACT. Pow. $400 \times$

Fig. 3. A-1-ACT cellular immunostaining outside well delineated tumor border. $\times 200$

Ryc. 3. A-1-ACT dodatnie komórki wokół ostro odgraniczonego brzegu nowotworu. Pow. $200 \times$

Fig. 4. Immunostained reactive astrocyte in peritumoral edema zone. A-1-ACT. $\times 400$

Ryc. 4. Immunododatnie astrocyty odczynowe w strefie obrzęku okołoguzowego. A-1-ACT. Pow. $400 \times$



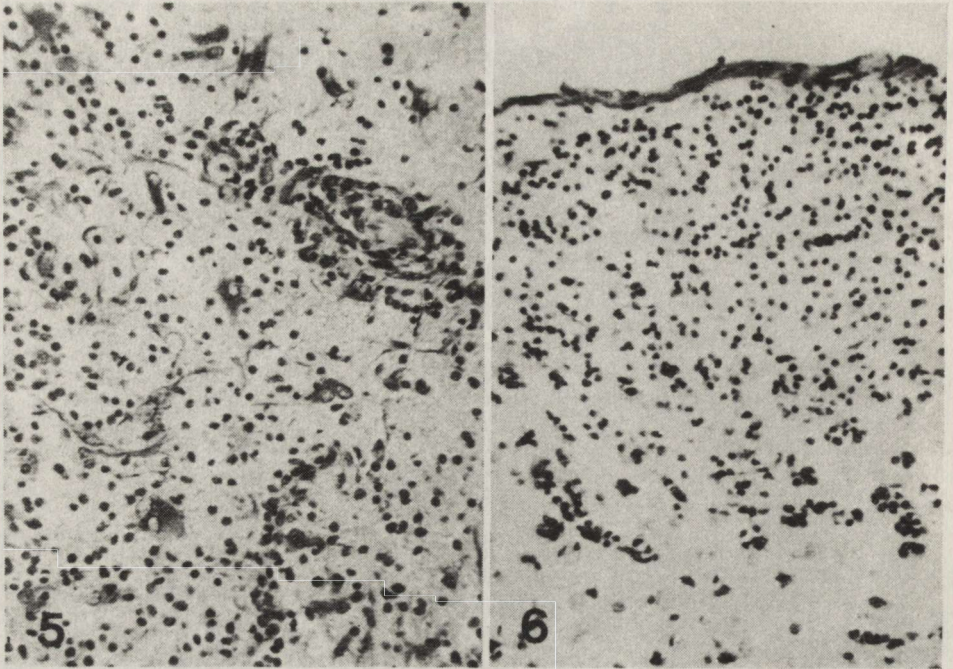


Fig. 5. Mixed glioma. A-1-ACT reaction in peripheral tumor zone. $\times 200$

Ryc. 5. Glejak mieszany. Odczyn A-1-ACT w obwodowej części nowotworu. Pow. $200 \times$

Fig. 6. Cortical oligodendroglial microtumor without cellular A-1-ACT immunostainig. $\times 200$

Ryc. 6. Korowy mikroguz typu skąpodrzewiaka bez komórkowego odczynu A-1-ACT. Pow. $200 \times$

subependymal field of the large anaplastic oligodendroglioma we noticed a layer of heavily stained astrocytes. The peritumoral expression of A-1-ACT was limited to the tissue immediately surrounding large neoplastic foci (Fig. 3). The staining of reactive, branched astrocytes at the interface of neoplasm with edematous tissue was more distinct in peritumoral white than in the gray matter. The walls of small proliferating vessels were covered by stained astrocytic end-feet (Fig. 4). Neighbouring structures such as ependymal cell layer or the glial cells of *septum pellucidum* involved in neoplastic process showed immunostaining of perikaryon and cellular processes. Only rarely was there no antigen reaction around fully developed tumors.

In medium size oligodendrogliomas-astrocytomas the cells expressing A-1-ACT were found at the tumor periphery (Fig. 5). Central areas contained some disfigured astrocytes and occasional heavily staining macrophages. Pure oligodendrogliomas exhibited stained astrocytes only at their periphery whereas the cells of an astrocytoma were stained very slightly.

In a few (4) brains with tumors of various size, the groups of diffusely stained cells were found around the vessels near and far from the neoplasm, even in the contralateral hemisphere.

Small oligodendrogliomas and areas of early neoplastic proliferation were not stained and their surrounding nervous tissue was devoid of any immunocytochemical reaction (Fig. 6). Macrophages in lung tissue which served as positive control showed intensive staining, whereas control sections with PBS as a first layer were negative.

DISCUSSION

In our study two types of A-1-ACT staining have been demonstrated: strong, granular of macrophages in the walls of necrotic foci and occasionally in neoplastic tissue, and moderate diffuse immunostaining of cells of astrocytic origin. The latter type has been noted in reactive astrocytes and their end-feet in the peritumoral zone, in distant perivascular cells and in the astrocytic component of mixed oligodendrogliomas-astrocytomas. From the methodological point of view, the A-1-ACT staining has been found most satisfactory when compared with alpha-1-antitrypsin and lysozyme (Esiri, Booss 1984). For the evaluation of changes in central nervous system antiserum against A-1-ACT has been used very rarely. Some studies were performed on the brain tissue after injury, in some inflammatory and neoplastic diseases (Esiri, Booss 1984) and in experimental glial tumors (Pilkington et al. 1985; Saggi, Pilkington 1986).

Our study confirms the specific staining of macrophages (Isaacson et al. 1981) but staining of cells of astrocytic origin, both reactive and neoplastic, seems to raise a question of glial reactivity. The staining of reactive peritumoral astrocytes with A-1-ACT antiserum corresponds to that observed by Esiri and Booss (1984) and to the immunostaining of astrocytes obtained by testing various antiprotein antisera in the zone of peritumoral edema. The reaction has been ascribed to the uptake of extravasated proteins (Oehmichen et al. 1979). The development of reactive astrocytes inside and at the margin of oligodendrogliomas presents an analogy to human tumors of the same type (Wilkinson et al. 1987).

In our material the lack of A-1-ACT staining around early neoplastic proliferations, yet without surrounding edema speaks in favour of the concept that positive immunostaining results from digestion of extravasated edema fluid. The phagocytic function of macrophages and reactive astrocytes in ENU gliomas is well documented in EM (Lantos 1974, 1975) and has been lately confirmed also in tissue culture (Watabe, Kim 1987). The cells staining positively for A-1-ACT are believe to represent phagocytosing astrocytes and macrophages in and around astrocytic tumors (Saggi, Pilkington 1986). Keeping in mind that the distinction between reactive and neoplastic astrocytes is presently impossible, some astrocytic component of mixed oligodendrogliomas-astrocytomas probably represents also digestive properties, especially that in transplantable astrocytomas the isolated cells only do present a positive reaction (Pilkington et al. 1985; Saggi, Pilkington 1986).

To our understanding, though tissue unspecific, the A-1-ACT immunostaining indicates phagocytosing function of the population of reactive astrocytes in brain edema.

IMMUNOCYTOCHEMICZNA LOKALIZACJA ALFA-1-ANTYCHYMOTRYPSYNY W DOŚWIADCZALNYCH NOWOTWORACH MÓZGU I NA ICH OBWODZIE

Streszczenie

Do badań zostały użyte skąpodrzewiaki i inne glejaki również anaplastyczne, wywołane w mózgu szczura przezłożyskowym podaniem etylnitrozomocznika. Barwienie immunocytochemiczne z zastosowaniem alfa-1-antychymotrypsyny (A-1-ACT) uwidocznilo odczynowe astrocyty wraz z ich wypustkami w okalającej tkance obrzękowej, w obrzeżu guzów, jak również w obrębie luźnego nacieku nowotworowego. Komórki nowotworowe i komórki w tkance otaczającej wczesne nacieki nowotworowe oraz mikroguzy pochodzenia skąpowypustkowego nie wykazywały odczynu immunocytologicznego, natomiast w dużych mieszanych skąpodrzewiako-gwiaździkach występowały liczne komórki immunododatnie. Makrofagi zawierały ziarnistości wybitnie A-1-ACT dodatnie. Brak komórkowego odczynu A-1-ACT wokół mikroguzów przemawia za dodatnią reakcją w astrocytach jako wynikiem fagocytozy materiału białkowego pochodzącego z okołoguzowego płynu obrzękowego.

REFERENCES

- Bertrand G., Saint-Andre J. P., Bidabe M. Cl.: Mise en evidence d'alpha-1-antichymotripsine dans les carcinomes bronchiques. Etude immunohistochemique de 31 cas. Arch Anat Cytol Pathol, 1984, 32, 5-8.
- Cohen A. B.: Interrelationships between the human alveolar macrophage and alpha-1-antitrypsin. J Clin Invest, 1973, 52, 2793-2799.
- Esitri M. M., Booss J.: Comparison of methods of identify microglial cells and macrophages in the human central nervous system. J Clin Pathol, 1984, 37, 150-156.
- Gupta P., Frost J., Geddes S., Aracil B., Davidovski F.: Morphological identification of alpha-1-antitrypsin in pulmonary macrophages. Hum Pathol, 1979, 10, 345-347.
- Isaacson P., Jones D. B., Millward-Sadler G. H., Judd M. A., Payne S.: Alpha-1-antitrypsin in human macrophages. J Clin Pathol, 1981, 34, 982-990.
- Lantos P. L.: An electron microscope study of reacting astrocytes in gliomas induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats. Acta Neuropathol (Berl), 1974, 30, 175-181.
- Lantos P. L.: Macrophages in brain tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats; an electron-microscope study. J Pathol, 1975, 116, 107-115.
- Leader M., Patel J., Collins M., Henry K.: Anti-alpha-1-antichymotrypsin staining of 104 sarcomas, 38 carcionams and 17 malignant melanomas. Am J Surg Pathol, 1987, 11, 133-139.
- Nathrath W. B. J., Meister P.: Lysozyme (Muramidase) and alpha-1-anti-chymotrypsin as immunohistochemical tumor markers. Acta Histochem [Suppl] (Jena) 1982, B.XXV, 69-72.
- Oehmichen M., Wiethölder H., Greaves M. F.: Immunological analysis of human microglia: lack of monocytic and lymphoid membrane differentiation antigens. J Neuropathol Exp Neurol, 1979, 38, 99-103.
- Permanetter W., Meister P.: Distribution of lysozyme (Muramidase) and alpha-1-antichymotrypsin in normal and neoplastic tissues. A survey. Acta Histochem (Jena) 1984, 74, 173-179.
- Pilkington G. J., Darling J. L., Lantos P. L., Thomas D. G.: Tumorigenicity of cell lines (VMDk) derived from a spontaneous murine astrocytoma. Histology, fine structure and immunocytochemistry of tumours. J Neurol Sci, 1985, 71, 145-164.

13. Saggi H., Pilkington G. J.: Immunocytochemical characterization of the A15 A5 transplantable brain tumor model in vivo. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1986, 12, 291–303.
14. Sawaya R., Zuccarello M., Highsmith R.: Alpha-1-antitrypsin in human brain tumors. *J Neurosurg*, 1987, 67, 258–262.
15. Watabe K., Kim S. U.: Phagocytosis in human astrocytes and oligodendrocytes in culture. Abstract. 63rd Annual Meeting of American Association of Neuropathologists. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987, 46, 86.
16. Wilkinson I. M. S., Anderson J. R., Holmes A. E.: Oligodendroglioma: an analysis of 42 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1987, 50, 304–312.
17. Zülch K. J.: Histological typing of tumours of the central nervous system. International Histological Classification of Tumours No 21. World Health Organization, Geneva, 1979.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

Announcement

MOLECULAR BIOLOGY OF NEUROMUSCULAR DISEASES

First Viennese Workshop

Date: December 1-2, 1989
Location: Vienna, University Institute for Medical History "Josephinum"
Organizer: Austrian Muscular Dystrophy Association, Scientific Committee.
President - Prof. E. Sluga

Corresponding

address: Wiener Medizinische Akademie
Alser Strasse 4, A-1090 Wien
phone: (Austria) 222/42 13 83-0
cables: Medacad Wien
telex: 13 47 43 medak a
fax: (Austria) 222/42 13 83 23

PROGRAM

ASPECTS OF MOLECULAR GENETICS IN MUSCULAR DYSTROPHY

Friday, December 1, 1989

1. DNA Techniques in Research and Clinical Practice

Invited Speakers:

A. M. Frischauf (UK), T. Monaco (UK), L. M. Kunkel (USA), C. Müller (FRG), J. Spona, G. Söregi (A)

2. Genetic Counselling

Round Table Discussion

T. Grimm (FRG)

Saturday, December 2, 1989

3. Therapeutic Approaches

Invited Speaker

T. A. Partridge (UK)

4. Free Communications

Zawiadomienie

BIOLOGIA MOLEKULARNA CHOROÓB NERWOWO-MIĘŚNIOWYCH

Pierwsze Wiedeńskie Spotkanie Robocze

Data: 1-2 Grudnia 1989
Miejsce: Wiedeń, Uniwersytecki Instytut Historii Medycyny „Josephinum”
Organizator: Austriackie Stowarzyszenie Dystrofii Mięśniowej Komitet Naukowy. Przewodniczący - Prof. E. Sluga

Adres
do

korespondencji: Wiener Medizinische Akademie
Alser Strasse 4, A-1090 Wien
telefon: (Austria) 222/42 13 83-0
telegraf: Medacad Wien
telex: 13 47 43 medak a
fax: (Austria) 222/42 13 83 23

PROGRAM

ASPEKTY GENETYKI MOLEKULARNEJ W DYSTROFII MIĘŚNI

Piątek, 1 Grudnia 1989

1. Techniki oznaczania DNA w badaniach i w praktyce klinicznej. Zaproszeni mówcy:

A. M. Frischauf (WB), T. Monaco (WB), L. M. Kunkel (USA), C. Müller (RFN), J. Spona, G. Söregi (A)

2. Poradnictwo genetyczne

Dyskusja Okrągłego Stołu

Moderator: T. Grimm (RFN)

Sobota, 2 Grudnia 1989

3. Aspekty terapeutyczne

Zaproszony mówca

T. A. Partridge (WB)

4. Wolne wnioski

Eugenia Tarnowska-Dziduszko, Ewa Bertrand: Clinical-morphological correlations in secondarily hemorrhagic brain infarctions.	411
Irena Niebrój-Dobosz, Janina Rafałowska, Mirosława Łukasik: Do lipid changes influence the density of aging human brain myelin	427
Piotr Boroń, Teresa Szpakowicz, Ryszard Farbiszewski, Robert Flisiak, Henryk Nowak, Barbara Pytel, Lech Zimnoch: Influence of protein-free diet and branched-chain amino acids infusion Aminosteril-Hepa on selected biochemical indices in experimental chronic liver encephalopathy	437
Halina Kuoh, Halina Weinrarder: Immunocytochemical alpha-1-antichymotrypsin localization in the experimental brain tumors and at their periphery.	449

SPIS TREŚCI

Maria Dąmbska, Piotr B. Kozłowski, Joanna H. Sher, Krystyna Wiśniewski: Nowe dane o uszkodzeniu ośrodkowego układu nerwowego w przebiegu AIDS	297
Halina Weinrauder: Immunocytochemiczna charakterystyka organotypowej hodowli mózdku przy użyciu metody kompleksu awidyna-biotyna (ABC)	311
Krystyna Renkawek, Jerzy W. Łazarewicz: Ochronny efekt działania inhibitora kanałów wapnia — nimodipiny na komórki mózdku w hodowli	323
Krystyna Renkawek, Jerzy W. Łazarewicz: Zapobieganie zmianom strukturalnym w hodowli mózdku przez nimodipinę podaną bezpośrednio po anoksji	331
Barbara Gajkowska, Roman Gadamski, Mirosław J. Mossakowski: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część II. Obraz mikroskopowo-elektronowy synaps we wczesnym okresie poniedokrwieniowym	339
Barbara Gajkowska, Anna Zaręba-Kowalska: Wpływ ischemii na ultrastrukturę układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura	367
Michał Walski, Jerzy Borowicz: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w jądrach neurosekrecyjnych podwzgórza szczura po całkowitym niedokrwieniu w sytuacji krótkotrwałej śmierci klinicznej	383
Anna Zaręba-Kowalska, Barbara Gajkowska: Wpływ ischemii na ultrastrukturę jądra olbrzymiokomórkowego u szczura	397
Eugenia Tarnowska-Dziduszko, Ewa Bertrand: Korelacje kliniczno-morfologiczne w zawałach mózgu wtórnie ukrwotoczonych	411
Irena Niebrój-Dobosz, Janina Rafałowska, Mirosława Łukasik: Czy zmiany w składzie lipidowym mieliny wpływają na gęstość jej pęcherzyków w procesie starzenia mózgu ludzkiego	427
Piotr Boroń, Teresa Szpakowicz, Ryszard Farbiszewski, Robert Flisiak, Henryk Nowak, Barbara Pytel, Lech Zimnoch: Badania nad wpływem diety bezbiałkowej i stosowania aminokwasów wielorozgałęzionych (preparat Aminosteril-Hepa) na wybrane wskaźniki biochemiczne w przewlekłej doświadczalnej encefalopatii wątrobowej	437
Halina Kroh, Halina Weinrauder: Immunocytochemiczna lokalizacja alfa-1-antychymotrypsyny w doświadczalnych nowotworach mózgu i na ich obwodzie	449

CONTENTS

Maria Dąmbska, Piotr B. Kozłowski, Joanna H. Sher, Krystyna Wiśniewski: Central nervous system in AIDS — an update	297
Halina Weinrauder: Immunocytochemical characterization of organotypic cerebellum culture by means of avidin-biotin-complex method	311
Krystyna Renkawek, Jerzy W. Łazarewicz: Protective effect of the calcium entry blocker, nimodipine on cerebellar organotypic cultures submitted to anoxia	323
Krystyna Renkawek, Jerzy W. Łazarewicz: Nimodipine applied immediately after anoxia protects cerebellar cells in culture against injury	331
Barbara Gajkowska, Roman Gadamski, Mirosław J. Mossakowski: Influence of short-term ischemia on the ultrastructure of hippocampal gyrus in Mongolian gerbils. Part II. Electron microscope picture of synapses in early postischemic period	339
Barbara Gajkowska, Anna Zaręba-Kowalska: Effect of ischemia on the ultrastructure of the rat hypothalamo-neurohypophysial system	367
Michał Walski, Jerzy Borowicz: Electron microscopic changes in neurosecretory nuclei of rat hypothalamus following global cerebral ischemia in the course of short-term clinical death	383
Anna Zaręba-Kowalska, Barbara Gajkowska: Effect of ischemia on the ultrastructure of the gigantocellular nucleus of the rat	397