

0922

C 165

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROPATHOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 27

1989

ZESZYT 4

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

292,- DJ

<http://rcin.org.pl>



# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 27

1989

ZESZYT 4

## KOMITET REDAKCYJNY

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

## PRZY WSPÓŁPRACY

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

## 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

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy 23.05.1989

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk





TERESA ZALEWSKA

## Ca<sup>2+</sup>-MEDIATED DEGRADATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM (CNS) PROTEINS

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

Brain tissue has been known for years to contain calcium-stimulated proteolytic activity (Guroff 1964). Calcium-activated neutral proteinases (CANPs), also known as calpains, have been implicated in neurobiological phenomena ranging from regeneration and synaptic plasticity to degeneration and cell death. In neurons, the potential activity of CANPs is very high — more than half of the total content of protein larger than 60 000 daltons is degraded within 15 minutes in intact retinal ganglion cell (RGC) axons, when CANP activity is maximally expressed *in vitro* (Nixon 1986). Harnessing this great proteolytic activity appears to involve at least several mechanisms, including changes in calcium concentration, interaction with the specific endogenous inhibitor, autolytic conversion of the enzymes to inactive forms, and possibly, activation of proenzymes.

The presence of multiple CANPs in RGC neurons and their greater potential activity in RGC axons as compared with adjacent glial cells imply the possibility that some of them play special roles in neuronal function (Nixon et al. 1983; Schlaepfer et al. 1984). The diverse roles proposed for calcium-activated neural proteinases thus far include activation of specific enzymes (Inoue et al. 1977; Hamon, Bourgoin 1979; Nishizuka 1984), modification of receptor binding properties (Baudry et al. 1981) and of cytoskeletal proteins and regulation of membrane-cytoskeletal interactions (Schlaepfer 1979; Siman et al. 1984; Vitto, Nixon, 1986). In addition to physiological role, calcium-activated proteolysis has also been proposed as a pathogenic factor in certain neurodegenerative disorders (Siman et al. 1985). CANP may be one of the targets of calcium ions mobilized when the cell is stimulated by various external signals.

Interest in these enzymes stems not only from their high activity in nervous tissue (Banik et al. 1983; Malik et al. 1983; Zimmermann, Schlaepfer 1984a,b), but also from their high affinity for specific endogenous substrates. Brain CANPs for example selectively cleave a protein associated with the glutamate



receptor in the rat brain (Baudry et al. 1981) and specifically modify the neurofilament protein subunit in the mouse retinal ganglion cell neurons (Nixion et al. 1983). CANPs have a restricted substrate specificity and lack general proteolytic activity. They are therefore suitable to accomplish a specific rather than a general function in the metabolic turnover of CNS proteins.

#### PROTEOLYSIS OF ENDOGENOUS SUBSTRATES BY CANPs IN CNS

CANPs cleave proteins by limited proteolysis, yielding sizable peptide fragments that may well have biological activity. Thus limited proteolysis can lead to alteration of the structure and modification of the protein properties. Activation of CANPs, therefore, can be regarded as a mechanism whereby local increase of free calcium ion is translated into an irreversible modification of target proteins such as activation and/or inactivation of their specific functions (Tab. 1).

Table 1. Limited proteolysis of endogenous substrates by CANP  
Tabela 1. Ograniczona proteoliza endogennych substratów przez CANP

Substrate Substrat	Function of CANP Funkcja CANP
Enzyme Enzym	Activation/inactivation Aktywacja/inaktywacja
Receptor protein Białko receptorowe	Increase affinity for ligands Wzrost powinowactwa ligandów
Cytoskeleton	Filament disassembly Fragmentaryzacja filamentu
Myelin membrane proteins Białka mielinowe	Involvement in myelination/demyelination processes? Udział w procesach mielinizacji/demielinizacji

#### Enzymes

Calcium-activated neutral proteinases modify enzymes in brain tissue as the result of limited proteolysis. A cyclic nucleotide-independent protein kinase (Inoue et al. 1977) as well as calcium and phospholipid-dependent protein kinase C (PKC) can be activated by CANPs (Nishizuka 1984). The activation of the latter enzyme which is established as a key enzyme in transmembrane signalling, may be of great physiological significance. The activity of tryptophan hydrolase, a regulatory enzyme in biosynthesis of serotonin, is elevated when the enzyme is reduced to a smaller molecular weight form by CANP (Hamon, Bourgoin 1979).

#### Receptor proteins

Calcium-activated neutral proteinases modify diverse types of protein receptors including steroid hormones and a neurotransmitter. It was reported



that calcium induced proteolysis of membrane components may be responsible for the expression of the glutamate receptors in the neuronal membrane. Glutamate binding was associated with concomitant breakdown of fodrin, a spectrin-like protein localized just beneath the inner surface of the neuronal membrane (Baudry et al. 1981). It is suggested that such calcium-evoked changes in the receptor number might account for the functional plasticity exhibited by hippocampal synapses after a brief burst of repetitive electrical stimulation (Baudry, Lynch 1980).

The results of our recent studies indicate that the calcium-provoked increase in ligand binding to GABA receptors also seems to be preferentially regulated by limited calcium-dependent proteolysis (Zalewska, Domańska-Janik 1989).

### *Cytoskeleton*

The term cytoskeleton is used for the intracellular fibrous network in probably all eukaryotic cells and believed to provide both structural support as well as spatial integration for the interior of cells. The main fibrillar proteins that constitute the nervous system are intermediate filaments, microfilaments and microtubules. The principal intermediate filaments of the adult central nervous system comprise three neuronal proteins — neurofilaments (NF) (reviewed by Norton, Goldman 1980; Chiu et al. 1983) and one main astrocytic protein — glial fibrillary acidic protein (GFAP) (reviewed by Eng 1980).

The high affinity of CANPs for some cytoskeletal proteins has focused particular attention on the possible importance of these enzymes in regulating the dynamics of the neuronal cytoskeleton. It has been postulated that CANPs preferentially degrade neurofilament proteins. Neurofilaments are very stable structures which move slowly (1–2 mm/day) down the axon. Upon reaching the axonal terminal, they are rapidly degraded (Lasek, Black 1977). Several proteins are degraded during axoplasmic transport (Zalewska et al. 1986). Degradation of neurofilaments is believed to be mediated by CANPs activated by calcium influxes associated with synaptic transmission. The coupling of neurofilaments degradation with functional activity at nerve endings limits the growth or elongation of the axonal cytoskeleton. When CANPs are inhibited by local injections of inhibitor, neurofilaments continue to move down the axon, producing coiled, disorganized aggregates of neurofilaments in the synaptic endings (Roots 1983).

Degradation of neurofilament protein by CANPs yields several large polypeptides (57–65K). These same fragments can be demonstrated throughout neural tissues, suggesting that these degradative fragments may be translocated retrogradely in the axon, and possibly, back to the perikarya. Fragments of NF degradation may represent components in a feed-back control mechanism for regulation of transcription and translation and for processing of NF proteins. Post-translational modification of the 145 K neurofilament protein by CANP occurs during axoplasmic transport *in vivo* (Nixon



et al. 1982, 1983, Nixon 1986) and neurofilament protein fragments have been observed in axons similar to these generated by CANP *in vitro* (Schlaepfer et al. 1984).

Glial fibrillary acidic protein has also shown to be susceptible to proteolysis mediated by calcium influx, thus indicating the presence of this enzyme in astrocytes (Schlaepfer, Zimmermann 1981; DeAmond et al. 1983). However, at present it is unclear how the degradation of the glial filament may be related to cell function.

The substrates of CANP include another cytoskeletal brain protein – spectrin (fodrin) (Siman et al. 1984). The results of Seubert et al. (1988) indicate that spectrin degradation, due to activation of calcium-dependent neutral proteinase, occurs in the dentate gyrus after denervating lesions and is an early event in the removal of terminals and spines and may also play a role in sprouting.

It was found by Sato et al. (1986) that microtubule associated proteins (MAPs) are the highest molecular weight components that co-polymerize with tubulin. These proteins promote the *in vitro* assembly of microtubules and projects from the surface of the microtubules in a periodic manner. Calcium-dependent proteolysis of MAPs was reported to be associated with loss of their ability to polymerize tubulin (Sandoval, Weber 1978). There was a good agreement between the molecular weights of intermediate degradation products of brain MAPs treated *in vitro* with CANP and the naturally occurring MAPs analogues, suggesting the action of endogenous enzyme in the cell. The action of CANP on MAPs analogues directly or through activation of protein kinase C may have some function in the regulation of cell proliferation (Nishizuka 1984).

The above data suggest that CANP may participate in the turnover of the cytoskeleton in normal and pathological states. The susceptibility of these proteins in degenerative diseases of the central and peripheral nervous system are the current major focus in the search for the pathogenesis. Massive influx of calcium has been implicated in the breakdown of neurofilaments and myelin proteins in both spinal cord injury and  $\text{CaCl}_2$ -induced myelopathy (Banik et al. 1980, 1982; Happel et al. 1981). Neurofilament breakdown occurs in an early stage of Wallerian degeneration in the central and peripheral nervous system (Schlaepfer, Micko 1978; Dahl 1981; Soifer et al. 1981). It is now widely believed that the degradation of neurofilaments and myelin proteins in spinal cord injury and Wallerian degeneration can be attributed to CANPs (Schlaepfer, Freeman 1980; Newcomb et al. 1982; Smith et al. 1984).

Activation of CANPs may represent a mechanism whereby local influxes of calcium could be translated into local disruption of the cytoskeletal framework and an alteration of the shape and configuration of the cell. *In vivo* administration of the CANPs inhibitors – leupeptin and E-64c substantially suppressed the degradation of neurofilament proteins at the site of mechanical insult and secondary axon degeneration, and facilitated the recovery of motor



functions in acute spinal cord injury in rats (Iwasaki et al. 1987). Similarly, infusion of leupeptin markedly reduced the lesion-induced spectrin degradation (Seubert et al. 1988). The above results indicate some possibility of using these inhibitors as therapeutic modalities in Wallerian degeneration and other tissue damage evoked by excessive calcium-dependent proteolysis.

### Myelin

The role of proteinases in the degradation of myelin membrane proteins has been a subject of considerable interest in relation to demyelinating processes (Smith 1977, 1980). Among the myelin membrane proteins, the myelin basic protein (MBP) is specially susceptible to the attack of proteinases and its proteolysis has been assumed as an initial step in the degradation of myelin in demyelination (Smith 1977). Recently, it was demonstrated that purified myelin contains a calcium-dependent proteinase, which mainly degrades myelin basic protein (Sato, Miyatake 1982; Sato et al. 1982). Further, Yanagisawa et al. (1983) and Tsubata and Takahashi (1989) reported that a partially purified calcium-dependent proteinase from human brain degrades selectively the basic protein in myelin. The fact that MBP was rather selectively cleaved suggests the involvement of endogenous CANP in limited proteolysis *in vivo*.

An elevated CANP activity may cause rapid destruction of MBP in such demyelinating diseases as multiple sclerosis (MS) and experimental allergic encephalomyelitis (EAE) (Banik 1979; Sato et al. 1984a). The observed increased levels of low molecular weight proteins with antigenicity to MBP detected in the cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases such as MS could have arisen from the activation of the Ca<sup>2+</sup>-dependent enzyme (Karlsson, Alling 1984).

The possible significance of the presence of myelin-associated CANP is uncertain. It may have important implications in myelination, myelin metabolism as well as demyelinating diseases. One of the physiological roles of CANP might be facilitation of the fusion of the oligodendrocyte cell membrane with the formation of multilamellar myelin structures during CNS development. The activity of enzyme changed during maturation. A reduction of total activity in the premyelin fraction and simultaneous increase of activity in myelin was observed (Zalewska, Domańska-Janik 1989). CANP-induced proteolysis of erythrocyte membrane-bound proteins is responsible for the fusion of the cell membrane, by promoting the disassembly of membrane proteins and cytoskeleton (Arkong et al. 1980).

It was also reported that myelin CANP caused the conversion of myelin-associated glycoprotein (MAG) to a smaller derivative (dMAG) (Sato et al. 1984b). In some pathological conditions such as MS a remarkable reduction of MAG compared to other myelin proteins has been observed (Johnson et al. 1986; Moller et al. 1987).

The possible explanation for the activation of myelin-associated CANPs might include the failure of enzyme regulation by the endogenous inhibitor



— calpastatin (Murachi et al. 1981), or the increased binding of enzyme from the cytosolic bulk to the myelin, due to the alteration of the charge on the myelin membrane (Moscarello et al. 1985), the increase of protein susceptibility to CANP for unknown reasons, or the increase of calcium concentration due to abnormal permeability. The latter hypothesis received experimental support — the concentration of calcium was significantly elevated in the white matter samples from brains of MS patients (Craelius et al. 1980).

The considerable (6-fold) calcium content increase in quaking mouse brain raises the possibility of the proteinase activation, and therefore amplified CANP activity in the brain of this neurological mutant. Morphological examination has revealed in the quaking CNS a reduced number of loosely compacted myelin lamellae with oligodendroglial cytoplasm separating the myelin (Wisniewski, Morell 1971; Privat et al. 1979; Omlin et al. 1980). In the quaking mutant CANP could play a role in degrading the proteins determining assembly, compaction and/or maintenance of the myelin sheath (Banik et al. 1987). The activity of myelin CANPs in the paralytic tremor (pt) rabbit brain exceeded also the activity in unaffected animals (Zalewska, Domańska-Janik 1989).

Evidence for the role of CANPs, either as initial or secondary feature in disturbances of myelination or in demyelinative processes is only circumstantial at present. In order to ascertain whether CANPs are indeed the primary cause of demyelination more information is needed on the nature of the physiological substrate(s) or the first point of attack and on mechanism by which the substrate became available to the enzyme.

#### WAPNIOWO-ZALEŻNA DEGRADACJA BIAŁEK W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

#### Streszczenie

Omówiono rolę ograniczonej proteolizy, katalizowanej przez wapniowo-zależne obojętne proteinazy, w ośrodkowym układzie nerwowym. Zależne od wapnia obojętne proteinazy charakteryzują się szczególnie wysokim powinowactwem w stosunku do białek cytoskeletonu (neurofilament) zasadowego białka mieliny i niektórych białek receptorowych.

Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że wapniowo-zależne proteinazy w ośrodkowym układzie nerwowym odgrywać mogą istotną rolę w patogenezie wielu schorzeń neurologicznych.

#### REFERENCES

1. Arkong Q. F., Botham G. M., Woodward A. W., Lucy J. A.: Calcium-activated thiol proteinase activity in the fusion of rat erythrocytes induced by benzyl alcohol. *Biochem J*, 1980, 192, 829-836.
2. Banik N. L.: The degradation of myelin basic protein by serum proteinase in experimental allergic encephalomyelitis and control rats. *Neurosci Lett*, 1979, 11, 307-312.



3. Banik N. L., Chakrabarti A. K., Gantt G., Hogan E. L.: Distribution of calcium-activated neutral proteinase activity in quaking mouse brain: a subcellular study. *Brain Res*, 1987, 435, 57–62.
4. Banik N. L., Powers J. M., Hogan E. L.: The effects of spinal cord trauma on myelin. *J. Neuropathol Exp Neurol*, 1980, 3, 232–244.
5. Banik N. L., Hogan E. L., Powers J. M., Whetstone L. J.: Degradation of neurofilaments in spinal cord injury. *Neurochem Res*, 1982, 7, 1465–1475.
6. Banik N. L., Hogan E. L., Jenkins M. G., McDonald J. K., McAlhany M. W., Sostek M. B.: Purification of a calcium activated neutral proteinase from bovine brain. *Neurochem Res*, 1983, 8, 1389–1405.
7. Baudry M., Lynch G.: Regulation of hippocampal glutamate receptors: Evidence for the involvement of a calcium activated protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77, 2298–2302.
8. Baudry M., Bundeman M. C., Smith E. K., Lynch G. S.: Micromolar calcium stimulates proteolysis and glutamate binding in rat brain synaptic membranes. *Science*, 1981, 212, 937–938.
9. Chiu F.-C., Goldman J. E., Norton W. T.: Biochemistry of neurofilaments. In: *Neurofilaments*. Ed. C. A. Marotta. University of Minnesota Press, Minneapolis, 1983, pp. 27–56.
10. Craelius W., Jacobs R. M., Jones A. O. L.: Mineral composition of brains of normal and multiple sclerosis victims. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1980, 165, 327–329.
11. Dahl D., Crosby C. J., Bignami A.: Filament protein in rat optic nerves undergoing Wallerian degeneration. *Exp Neurol*, 1981, 71, 421–430.
12. DeAmond S. J., Fajardo M., Naughton S. A., Eng L. F.: Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase: An electroblot study. *Brain Res*, 1983, 262, 275–282.
13. Eng L. F.: The glial fibrillary acidic (GFA) protein. In: *Proteins of the nervous system*. Second edition. Eds.: R. A. Branshaw, D. M. Schneider, Raven Press, New York, 1980, pp. 85–117.
14. Guroff G.: A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem*, 1964, 239, 149–155.
15. Hamon M., Bourgoin S.: Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-induced proteolytic activation of tryptophan hydrolase from the rat brain stem. *J Neurochem*, 1979, 32, 1837–1844.
16. Happel R. D., Smith K. P., Banik N. L., Powers J. M., Hogan E. L., Balentine J. D.: Ca<sup>2+</sup>-accumulation in experimental cord trauma. *Brain Res*, 1981, 211, 476–479.
17. Inoue M., Kishimoto A., Takai Y., Nishizuka Y.: Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem*, 1977, 252, 7610–7616.
18. Iwasaki Y., Yamamoto H., Iizuka H., Yamamoto T., Konno H.: Suppression of neurofilament degradation by protease inhibitors in experimental spinal cord injury. *Brain Res*, 1987, 406, 99–104.
19. Johnson D., Sato S., Quarles R. H., Inuzuka T., Brady R. O., Tourtelotte W. W.: Quantitation of the myelin-associated glycoprotein in human nervous tissue from controls and multiple sclerosis patients. *J Neurochem*, 1986, 46, 1086–1093.
20. Karlsson B., Alling C.: Molecular size of myelin basic protein immunoactivity in spinal fluid. *J Neuroimmunol*, 1984, 6, 141–150.
21. Lasek R. J., Black M. M.: How do axons stop growing? Some clues from the metabolism of the proteins in the slow component of axonal transport. In: *Mechanisms, regulating and special functions of protein synthesis in the brain*. Eds. S. Roberts, A. Lajtha, W. H. Gispen, Elsevier-North Holland Biomedical, Amsterdam, 1977, pp. 161–169.
22. Malik M. N., Fenko M. M., Iqbal K., Wiśniewski H.: Purification and characterization of two forms of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease from calf brain. *J Biol Chem*, 1983, 258, 8955–8962.
23. Moller J. R., Yanagisawa K., Brady R. O., Tourtelotte W. W., Quarles R. H.: Myelin-associated glycoprotein in multiple sclerosis lesions: a quantitative and qualitative analysis. *Ann Neurol*, 1987, 22, 469–474.
24. Moscarello M. A., Chia I.-S., Leighton D., Absolon D.: Size and surface charge properties of



- myelin vesicles from normal and disease (multiple sclerosis) brain. *J Neurochem*, 1985, 45, 415–421.
25. Murachi T., Tanaka T., Hatanaka M., Murakami T.: Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent protease (calpain) and its high molecular-weight endogenous inhibitor (calpastatin). *Adv Enzyme Regul*, 1981, 19, 407–424.
  26. Newcomb J., Glynn P., Cuzner M.: The immunological identification of brain proteins on cellulose nitrate in human demyelinating disease. *J Neurochem*, 1982, 38, 267–274.
  27. Nishizuka Y.: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 1984, 308, 693–698.
  28. Nixon R. A., Brown B. A., Marotta C. A.: Posttranslational modification of neurofilament protein during axoplasmic transport; Implications for regional specialization of CNS axons. *J Cell Biol*. 1982. 94. 150–158.
  29. Nixon R. A., Brown B. A., Marotta C. A.: Limited proteolytic modification of a neurofilament protein involves a proteinase activated by endogenous levels of calcium. *Brain Res*, 1983, 275, 384–388.
  30. Nixon R. A.: Fodrin degradation by calcium-activated neutral proteinase (CANP) in retinal ganglion cell neurons and optic glia: preferential localization of CANP activities in neurons. *J Neurosci*. 1986. 6 (5). 1264–1271.
  31. Norton W. T., Goldman J. E.: Neurofilaments. In: *Proteins of the nervous system*. Second edition. Eds.: R. A. Bradshaw, D. M. Schneider, Raven Press, New York, 1980, pp. 301–329.
  32. Omlin F. X., Bischoff A., Moor H.: Myelin and glial membrane structures in the optic nerve of normal and jimpy mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1980, 39, 215–231.
  33. Privat A., Drian M. J., Escaig J.: Jimpy mouse myelin revisited with freeze-fracture. *Acta Neuropathol*, 1979, 45, 129–131.
  34. Roots B. I.: Neurofilament accumulation induced in synapses by leupeptin. *Science*, 1983, 221, 971–972.
  35. Sandoval I. V., Weber K.: Calcium-induced inactivation of microtubule formation in brain extracts. *Eur J Biochem*, 1978, 92, 463–470.
  36. Sato S., Miyatake T.: Degradation of myelin basic protein by calcium-activated neutral protease (CANP)-like enzyme in myelin and inhibition by E-64 analogue. *Biomed Res*, 1982, 3, 461–464.
  37. Sato S., Quarles R. H., Brady R. O.: Susceptibility of the myelin-associated glycoprotein and basic protein to a neutral protease in highly purified myelin from human and rat brain. *J Neurochem*. 1982. 39. 97–105.
  38. Sato S., Nishizawa K., Nakayama T., Nakamura H., Yoshimura N., Takano E., Murachi T.: Rapid proteolysis of brain MAP-1 related cytoskeleton-associated 350 kd protein by purified calpain. *Cell Struct Funct*, 1986, 11, 153–257.
  39. Sato S., Quarles R. H., Brady R. O., Tourtelotte W. W.: Elevated neutral proteinase activity in myelin from multiple sclerosis brain. *Ann Neurol*. 1984a. 15. 264–267.
  40. Sato S., Yanagisawa K., Miyatake T.: Conversion of myelin-associated glycoprotein (MAG) to a smaller derivative by calcium-activated neutral protease (CANP)-like enzyme in myelin and inhibition by E-64 analogue. *Neurochem Res*, 1984b, 9, 629–635.
  41. Schlaepfer W. W.: Nature of mammalian neurofilaments and their breakdown by calcium. *Prog Neuropathol*, 1979, 4, 101–123.
  42. Schlaepfer W. W., Freeman L. A.: Calcium-dependent degradation of mammalian neurofilaments by soluble tissue factors from rat spinal cord. *Neuroscience*, 1980, 5, 2305–2314.
  43. Schlaepfer W. W., Micko S.: Chemical and structural changes of neurofilaments in traumatic rat sciatic nerves. *J Cell Biol*, 1978, 78, 369–378.
  44. Schlaepfer W. W., Lee C., Trojanowski J. Q., Lee V. M.-Y.: Persistence of immunoreactive neurofilament protein breakdown products in transected rat sciatic nerve. *J Neurochem*, 1984, 43, 857–864.
  45. Schlaepfer W. W., Zimmerman U.-J. P.: Calcium-mediated breakdown of glial filaments and neurofilaments in rat optic nerve and spinal cord. *Neurochem Res*. 1981. 6. 243–255.



46. Schlaepfer W. W., Zimmerman U.-J. P.: Calcium-activated proteolysis of intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci*, 1985, 455, 552–562.
47. Seubert P., Iwy G., Larson J., Lee J., Shahi K., Baudry M., Lynch G.: Lesions of entorhinal cortex produce a calpain – mediated degradation of brain spectrin in dentate gyrus. I. Biochemical studies. *Brain Res*, 1988, 459, 226–232.
48. Siman R., Baudry M., Lynch G.: Brain Fodrin: Substrate for calpain I, an endogenous calcium activated protease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81, 3572–3576.
49. Siman R., Gall C., Perlmutter L. S., Christian C., Baudry B., Lynch G.: Distribution of calpain I, an enzyme associated with degenerative activity in rat brain. *Brain Res*, 1985, 347, 399–403.
50. Smith M. E.; The role of proteolytic enzymes in demyelination in experimental allergic encephalomyelitis. *Neurochem Res* 1977, 2, 233–246.
51. Smith M. E.: Proteinase inhibitors and the suppression of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis (Davison A. N. and Cuzner M. L. eds), 1980, pp. 211–226, Academic Press, London.
52. Smith M. E., Perret V., Eng L. F.: Metabolic studies *in vitro* of the CNS cytoskeletal protein: synthesis and degradation. *Neurochem Res*, 1984, 9, 1493–1507.
53. Soifer D., Iqbal K., Czosnek H., DeMantini J., Sturman J. A., Wiśniewski H.: The degradation of neuron-specific protein during the course of Wallerian degeneration of optic and sciatic nerve. *J Neurosci*, 1981, 1, 461–470.
54. Tsubata T., Takahashi K.: Limited proteolysis of bovine myelin basic protein by calcium-dependent proteinase from bovine spinal cord. *J Biochem*, 1989, 105, 23–28.
55. Vitto A., Nixon R. A.: Calcium-activated neutral proteinase of human brain: Subunit structure and enzymatic properties of multiple molecular forms. *J Neurochem*, 1986, 47, 1039–1051.
56. Wiśniewski H., Morell P.: Quaking mouse: ultrastructural evidence for arrest of myelinogenesis. *Brain Res*, 1971, 29, 63–73.
57. Yanagisawa K., Sato S., Amaya N., Miyatake T.: Degradation of myelin basic protein by calcium-activated neutral protease (CANP) in human brain and inhibition by E-64 analogue. *Neurochem Res*, 1983, 8, 1285–1293.
58. Zalewska T., Domańska-Janik K.: Functional role of calcium-activated neutral proteinase (CANP) in the central nervous system. Submitted to *Bull of Jagiell University*, 1989.
59. Zalewska T., Kanje M., Edström A.: A calcium-activated neutral protease in the frog nervous system which degrades rapidly transported axonal protein. *Brain Res*, 1986, 381, 58–62.
60. Zimmerman U.-J. P., Schlaepfer W. W.: Multiple forms of calcium-activated protease from rat brain and muscle. *J Biol Chem*, 1984a, 259, 3210–3218.
61. Zimmerman U.-J. P., Schlaepfer W. W.: Calcium-activated neutral protease (CANP) in brain and other tissues. *Prog Neurobiol*, 1984b, 23, 63–78.

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



MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,  
EUGENIUSZ SROCZYŃSKI

## FREE FATTY ACIDS IN CEREBRAL WHITE MATTER OF SENILE RAT BRAIN\*

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Studies on cerebral white matter in senile brain have revealed several deviations in the chemical composition and metabolism of myelin as compared with that characteristic for the adult age. Changes found by us in the human frontal lobe and cerebellum involved a marked decrease of myelin yield and an increase in lysophosphatidylcholine content. In the cerebellum a decrease in sulfatide content and a slight increase of phosphatidylethanolamine were also noted (Wender et al. 1988a). The same general trend was found in the aged rat brain, however, the observed deviations were more pronounced than in humans (Horrocks 1973; Horrocks et al. 1979). In the myelin of aged rats some excess of cholesterol esters has also been noticed (Wender et al. 1988b). The marked loss of cerebrosides and sulfatides in the white matter was emphasized by England and Brun (1986) as characteristic of senile dementia of Alzheimer type, whereas Ellison (1987) stress the fall of the phosphoethanolamine level in the brain in this disease.

The alterations of protein-lipid membranes in the aging cerebral white matter resemble in many aspects the changes observed in moderate and acute hypoxia (Wender et al. 1988c). The very pronounced rise in the content of fatty acids in the brain seems to be in close connection with lipid changes of cerebral membranes in hypoxia. That is why in the continuation of our investigations on the subject of aging white matter we have performed studies of free fatty acids in senile rat brain. The problem is up till now unknown.

### MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on the material of 11 Wistar rats, sacrificed at an age above 2.5 years. The results were compared with those established in young adult animals (4–6 months old). The animals were sacrificed by

---

\* Supported by the Research Grant No 06.02.II.3.5



decapitation in a light halothane anaesthesia. The heads were immediately placed in liquid nitrogen. The white matter was isolated in a cold room at the temperature of 0°C.

#### Biochemical methods.

Free fatty acids were extracted from the cerebral white matter of Wistar rats with the mixture: iso-propylenic alcohol: n-heptane: 1N sulphuric acid, 40:10:1 vol/vol according to the techniques described by Doll and Meinertz (1960). The heptane phase containing neutral lipids was separated by the TLC method on silica gel G (Merck), using hexane:ethyl ether:glacial acetic acid, 70:30:10 vol/vol, according to the method described by Fishwick (1968) in the modification of Sroczyński and Fiedler (1978). Isolated free fatty acids were determined according to the method of Düncombe (1964).

Free fatty acids eluted from thin-layer chromatograms were methylated with diatomethane and then separated by means of gas-liquid chromatography in the Pye 104 gas chromatograph equipped with a flame ionizing detector. A 7 ft long column was filled with 15% DEGS (diethylene glycol succinate) absorbed on Gas-Chrom Q 100/1200 mesh with the use of fatty acid 17:0 as the internal standard. Column temperature 220°C, detector temperature 280°C with argon as carrier gas (30 ml/min) were applied.

Individual fatty acids were identified by comparing respective peaks on the experimental chromatograms with those obtained with the standard mixture of fatty acid-methyl esters, produced by Applied Sciences Laboratories. Quantitation of chromatograms was based on the evaluation of the respective peak areas calculated from the products of retention times and peak heights. The results were expressed in percentages at which individual fatty acids contributed to the total fatty acid content, i.e. at which the individual peak areas contributed to the total area of all peaks. From the relative values and from the total fatty acids content, absolute concentrations of individual fatty acids were calculated.

## RESULTS

Results of the performed chemical studies are presented in Tables 1 to 4. The total content of free fatty acids in the white matter of the aged rat brain was above four times higher than in young adult animals. The spectrum of free fatty acids in the cerebral white matter of aged animals, when expressed in absolute values, demonstrates an immense increase of almost all fatty acids. The presence of 24:1 fatty acid (nervonic acid), not present in white matter of young adult animals, was noted. Although both saturated and unsaturated fatty acids demonstrate an increase, the rise in the former is greater, as easily visible in the increase of the ratio of total saturated to total unsaturated fatty acids.

When the results of fatty acids studies are presented in relative values, only minor changes are visible. Most pronounced is the decrease of the percentage of 18:1 (oleic acid) in aged white matter.



Table 1. Concentration and pattern of free fatty acids in the cerebral white matter of aged rats (in mg/100 g of dry weight)

Tabela 1. Stężenie i obraz wolnych kwasów tłuszczowych istoty białej mózgu starzejących się szczurów (w mg/100 g suchej tkanki)

	Young adult rats Młode dorosłe szczury n - 10	Aged rats Starzejące się szczury n - 11
Total free fatty acids Całkowita zawartość wolnych kwasów tłuszczowych	73.1 ± 3.5	322.7 ± 39.9**
Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe		
12:0	0.2 ± 0.04	1.2* ± 0.24
14:0	1.0 ± 0.13	6.1** ± 1.15
15:0	0.4 ± 0.13	2.2** ± 0.35
16:0	16.9 ± 0.98	81.1** ± 11.62
16:1	1.0 ± 0.16	7.8 ± 2.95
17:0	0.6 ± 0.05	2.1 ± 0.69
18:0	26.2 ± 1.77	122.2** ± 22.40
18:1	22.2 ± 2.56	49.4 ± 14.12
18:2	0.4 ± 0.04	1.4** ± 0.35
18:3	0.3 ± 0.12	1.9** ± 0.36
20:0	0.4 ± 0.03	5.1* ± 1.14
20:1	0.9 ± 0.09	2.0 ± 0.39
20:2	0.1 ± 0.03	6.8* ± 1.82
20:3	0.7 ± 0.36	3.3** ± 0.46
20:4	0.5 ± 0.04	2.3* ± 0.53
20:5	0.4 ± 0.04	3.9* ± 1.16
24:0	0.9 ± 0.13	5.5** ± 1.08
24:1	0	4.0** ± 0.83
Unidentified Niezidentyfikowane	0	14.0* ± 4.90

Mean ± SEM

Średnia ± średni błąd średniej

\* Difference significant at the level  $p \leq 0.05$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0,05$

\*\* Difference significant at the level  $p \leq 0.01$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0,01$

Table 2. Total saturated and unsaturated free fatty acids in the cerebral white matter of aged rats  
(in mg/100 g of dry weight)

Tabela 2. Całkowite nasycone i nienasycone wolne kwasy tłuszczowe istoty białej mózgu  
starzejących się szczurów (w mg/100 g suchej tkanki)

Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe	Young adult rats Młode dorosłe szczury n – 10	Aged rats Starzejące się szczury n – 11
Total saturated Całkowite nasycone	46.4 ± 3.31	225.7** ± 2.80
Total unsaturated Całkowite nienasycone	26.6 ± 1.62	82.9* ± 15.77
Total monoenes unsaturated Całkowite jednonienasycone	24.1 ± 0.92	63.2 ± 15.36
Total dienes unsaturated Całkowite dwunienasycone	0.5 ± 0.03	8.2 ± 16.80
Total trienes unsaturated Całkowite trójnienasycone	1.0 ± 0.22	5.2** ± 0.78
Total tetraenes unsaturated Całkowite czteronienasycone	0.5 ± 0.04	2.3* ± 0.53
Total pentaenes unsaturated Całkowite pięcionienasycone	0.4 ± 0.07	3.9* ± 1.78
Ratio of $\frac{\text{total saturated}}{\text{total unsaturated}}$ acids	1.7 ± 0.20	2.7** ± 1.78
Stosunek $\frac{\text{sumy kwasów nasyconych}}{\text{sumy kwasów nienasyconych}}$		

Mean ± SEM

Średnia ± średni błąd średniej

\* Difference significant at the level  $p \leq 0.05$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0.05$

\*\* Difference significant at the level  $p \leq 0.01$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0.01$



Table 3. Pattern of free fatty acids in the cerebral white matter of aged rats (in % of total free fatty acids)

Tabela 3. Obraz wolnych kwasów tłuszczowych istoty białej mózgu starzejących się szczurów (w % całkowitych wolnych kwasów tłuszczowych)

	Young adult rats Młode dorosłe szczury n – 10	Aged rats Starzejące się szczury n – 11
Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe		
12:0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
14:0	1.3 ± 0.2	1.90 ± 0.1
15:0	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.1
16:0	23.1 ± 1.3	25.1 ± 1.2
16:1	1.3 ± 0.1	2.1 ± 0.6
17:0	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.1
18:0	35.8 ± 1.8	38.9 ± 1.5
18:1	30.3 ± 2.8	14.3** ± 3.7
18:2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1
18:3	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1
20:0	0.5 ± 0.1	1.5* ± 0.3
20:1	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.2
20:2	0.2 ± 0.1	2.4 ± 0.6
20:3	1.1 ± 0.5	1.1 ± 0.0
20:4	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
20:5	0.6 ± 0.1	1.5 ± 0.6
24:0	1.2 ± 0.1	1.6 ± 0.2
24:1	0	1.4** ± 0.3
Unidentified Niezidentyfikowane	0	4.1* ± 1.1

Mean ± SEM

Średnia ± średni błąd średniej

\* Difference significant at the level  $p \leq 0.05$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0.05$

\*\* Difference significant at the level  $p \leq 0.01$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0.01$

Table 4. Total saturated and unsaturated free fatty acids in the cerebral white matter of aged rats (in % of total free fatty acids)

Tabela 4. Całkowite nasycone i nienasycone wolne kwasy tłuszczowe istoty białej mózgu starzejących się szczurów (w % całkowitych wolnych kwasów tłuszczowych)

Free fatty acids Wolne kwasy tłuszczowe	Young adult rats Młode dorosłe szczury n - 10	Aged rats Starzejące się szczury n - 11
Total saturated Całkowite nasycone	63.6 ± 4.7	70.6 ± 2.4
Total unsaturated Całkowite nienasycone	36.4 ± 1.4	25.3* ± 3.2
Total monoenes unsaturated Całkowite jednonienasycone	32.9 ± 0.9	18.6* ± 3.7
Total dienes unsaturated Całkowite dwunienasycone	0.7 ± 0.1	2.8* ± 0.7
Total trienes unsaturated Całkowite trójnienasycone	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.1
Total tetraenes unsaturated Całkowite czteronienasycone	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Total pentaenes unsaturated Całkowite pięcionienasycone	0.6 ± 0.1	1.5** ± 0.6
Ratio of $\frac{\text{total saturated}}{\text{total unsaturated}}$ acids Stosunek $\frac{\text{sumy kwasów nasyconych}}{\text{sumy kwasów nienasyconych}}$	1.8 ± 3.3	2.8 ± 0.7

Mean ± SEM

Średnia ± średni błąd średniej

\* Difference significant at the level  $p \leq 0.05$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0.05$

\*\* Difference significant at the level  $p \leq 0.01$

Różnica istotna na poziomie  $p \leq 0.01$

## DISCUSSION

An increase in membrane phospholipid catabolism is the early response to many types of brain injuries including ischemia, hypoxia and convulsions. One of the important results of phospholipid breakdown is a sharp increase of the free fatty acids pool in the brain (Aveidano, Bazan 1975; Bazan 1976; Rodriguez de Turco 1983).

In postdecapitation ischemia an increase of free fatty acids content in the brain is probably one of the decisive factors, responsible for the development of irreversible lesions in the nervous tissue (Strosznajder et al. 1972; Cenedella et al. 1975). Even transient ischemia produces an increase in the pool of free fatty acids in the brain, palmitic, stearic, oleic and arachidonic acids being the main component (De Medio et al. 1980).

In our experiments performed on rats subjected to mild hypoxia, we have



noticed a sharp increase of free fatty acid content, with the spectrum deviating from the normal one (an excess of polyunsaturated fatty acids — Wender et al. 1988c).

The free fatty acid effect is also a well recognized phenomenon, elicited by electroconvulsive shock (Aveidano, Bazan 1975), drug-induced convulsions (Rodriguez de Turco 1986), and cryogenic brain injury (Bazan et al. 1984).

Quite unexpected were the findings, observed in our present studies, that in the aged rat brain free fatty acid content is also many times higher than in adult cerebral nervous tissue with preponderance of saturated fatty acids. It should be stressed that Godlewski (1989) in his studies on aged rat brain could not demonstrate any microscopically detectable signs of vasogenic injuries in the nervous tissue, such as perivascular lacunation or focal ischemic necrosis. That is why it seems improbable that the high level of free fatty acids in the aged brain should be a secondary result of vascular changes leading to hypoxia. Another argument excluding this possibility is the different spectrum of free fatty acids observed in aged rat brain and after the action of hypoxia. The former is characterized by an elevated ratio of saturated to unsaturated fatty acids, whereas after hypoxia the dominating feature is the rise of polyunsaturated fatty acids (Wender et al. 1988b). Therefore, we express the opinion that the changes observed in old rats are not a secondary result of vasculo-dependent hypoxia, but they are connected with the aging process of various membraneous structures of the white matter. However, we cannot answer which structures of the cerebral white matter rich in phospholipids are mainly affected by the degradation processes leading to the increase of free fatty acids pool.

A decreased activity of the acylation system due to energy failure may contribute to an increase of free fatty acids in pathological conditions (Pediconi et al. 1985). However, free fatty acid release, prior to the detection of measurable ATP decrease, has been reported during severe hypoxia (Gardiner et al. 1981). It seems therefore, rather probable that the enhanced activity of some phospholipases is very important in the degradation of phospholipids, leading to an accumulation of free fatty acids in the brain. The detailed events which lead to activation of phospholipases and degradation of phospholipids with aging remains up till now poorly defined.

#### CONCLUSIONS

1. Cerebral white matter of aged rat brain contains a highly increased amount of free fatty acids.
2. The pattern of free fatty acids in aged rat brain is characterized by an increase of the ratio of total saturated to total unsaturated fatty acids.
3. The raised content of free fatty acids in aged rat brain seems to be connected with primary changes of various membraneous structures of the white matter, rich in phospholipids.

WOLNE KWASY TŁUSZCZOWE ISTOTY BIAŁEJ MÓZGU  
STARZEJĄCEGO SIĘ SZCZURA

Streszczenie

Przeprowadzono badania na materiale 11 szczurów rasy Wistar w wieku około 2,5 lat. Wyniki porównano z uzyskanymi u młodych szczurów dorosłych (4–6-miesięcznych). Określono ogólną zawartość oraz obraz wolnych kwasów tłuszczowych istoty białej mózgu.

Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Istota biała mózgu starzejących się szczurów zawiera podwyższoną zawartość wolnych kwasów tłuszczowych.

2. Obraz wolnych kwasów tłuszczowych starzejących się szczurów charakteryzuje się wzrostem stosunku nasyconych do nienasyconych kwasów tłuszczowych.

3. Podwyższona zawartość wolnych kwasów tłuszczowych starzejącego się mózgu szczurów wydaje się powiązana z pierwotnymi zmianami różnych struktur błonowych istoty białej, bogatych w fosfolipidy.

REFERENCES

1. Avedano M., Bazan N.: Rapid production of diacylglycerols enriched in arachidonate during early brain ischemia. *J Neurochem*, 1975, 25, 919–920.
2. Bazan N.: Free arachidonic acid and other lipids in the nervous system during early ischemia and after electroshock. In: *Function and metabolism of phospholipids in the central and peripheral nervous system*. Eds.: G. Porcellati, L. Amaduzzi, C. Galli, Plenum Press, New York, 1976, pp. 317–335.
3. Bazan N., Politi L., Rodriguez de Turco E.: Endogenous pools of arachidonic acid-enriched membrane lipids in cryogenic brain edema. In: *Recent progress in the study and therapy of brain edema*. Eds.: K. Go, A. Baethmann, Plenum Publ Corp, New York, 1984, pp. 203–212.
4. Cenedella R., Galli C., Paoletti R.: Brain free fatty acids level in rats sacrificed by decapitation versus focused microwave irradiation. *Lipids*, 1975, 10, 210–213.
5. De Medio G., Gorecci G., Horrocks L., Łazarewicz J., Mazzari S., Porcellati G., Strosznajder J., Trovarelli G.: The effect of transient ischemia on fatty acid and lipid metabolism in the gerbil brain. *Ital J Biochem*, 1980, 29, 412–432.
6. Doll V. P., Meinertz H.: Microdetermination of long-chain fatty acids in plasma and tissues. *J Biol Chem*, 1960, 235, 2595–2599.
7. Düncombe W.: The colorimetric microdetermination of non-esterified fatty acid plasma. *Clin Chim Acta*, 1964, 9, 122–126.
8. Ellison D.: Phosphoethanolamine and ethanolamine are decreased in Alzheimer's disease and Huntington's disease. *Brain Res*, 1987, 11, 389.
9. England E., Brun A.: The white matter changes in senile dementia of Alzheimer type: neuropathological and biochemical correlates. *X Intern. Congress Neuropathol, Stockholm 1986 Abstracts p. 291*.
10. Fishwick B.: Changes in the lipids of turkey muscle during storage on chilling and freezing temperatures. *J Sci Food Agric*, 1968, 19, 440–445.
11. Gardiner M., Nilsson B., Rehncrona S., Siesjö B.: Free fatty acids in the rat brain in moderate and severe hypoxia. *J Neurochem*, 1981, 36, 1500–1505.
12. Godlewski A.: Karyo- and cytophotometric studies on oligodendroglia of aging rat brain. *Neuropat Pol*, 1989 (in press).
13. Horrocks L.: Composition and metabolism of myelin phosphoglycerides during maturation and aging. In: *Neurobiological aspects of maturation and aging*. Ed.: D. Ford, Elsevier, Amsterdam, 1973, pp. 383–395.
14. Horrocks L., Sun G., D'Amato R.: Changes in brain lipids during aging. In: *Neurobiology of aging*. Eds.: J. Ordy, K. Brizzee, Plenum Publ Corp, New York, 1979, pp. 359–367.



15. Pediconi M., Rodriguez de Turco E., Bazan N.: Reduced labeling of brain phosphatidylinositol, triacylglycerols and diacylglycerols by ( $L^{14}C$ ) arachidonic and after electroconvulsive shock. Potentiation of the effect by adrenergic drugs and comparison with palmitic acid labeling. *Neurochem Res*, 1985, 11, 217–230.
16. Rodriguez de Turco E.; Morelli de Liberti S., Bazan N.: Stimulation of free fatty acid and diacylglycerol accumulation in cerebrum and cerebellum during bicuculline-induced status epilepticus. Effect of pretreatment with  $\alpha$ -methyl-p-tyrosine and p-chorophenylalanine. *J Neurochem*, 1983, 40, 252–259.
17. Rodriguez de Turco E.: Drugs effecting membrane lipid catabolism: the brain free fatty acid effect. In: *Phospholipid research and the nervous system. Biochemical and molecular pharmacology*. Eds.: L. Horrocks, L. Freysz, G. Toffano. Fidia Research Series, Liviana Press, 1986, vol. 4, pp. 57–66.
18. Sroczyński E., Fiedler A.: Ocena stopnia zjełczenia tłuszczu drobiowego. *Przem Spoż*, 1978, 11, 420–421.
19. Strosznajder J., Gromek A., Łazarewicz J.: Wpływ niedokrwienia na zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu świnek morskich. *Neuropatol Pol*, 1972, 10, 447–455.
20. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Szczech J., Godlewski A.: Myelin lipids in human ageing brain. *Chem Pathol*, 1988a (in press).
21. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Talkowska D., Pankrac J.: Myelin lipids in senile rat brain. *Neuropat Pol*, 1988b 26 (in press).
22. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żórawski A., Sroczyński E., Grochowalska A.: Effect of moderate hypoxia on content and pattern of free fatty acids in cerebral white matter. *Neuropat Pol*, 1988c, 26, 39–47.

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

ANTONI GODLEWSKI

## KARYO- AND CYTOPHOTOMETRIC STUDIES ON THE OLIGODENDROGLIA OF AGEING RAT BRAIN

Laboratory of Neuropathology, Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

Ageing processes occurring in the central nervous system (CNS) belong to the most intensively studied events in contemporary neurological sciences. There is a fast progress in the understanding of changes in the morphology and function and in biochemical and genetical events that occur in the ageing neurocytes. Much less has been done for elucidating the events occurring in the white matter of the ageing brain. In the literature there are only few reports dealing with this problem (Iwanowski 1984; England, Brun 1986).

Earlier studies from our Department, dealing with ageing processes in the CNS have revealed considerable structural changes in the myelin sheaths (Goncerzewicz et al. 1989), compositional changes in the phospholipid content of the myelin fraction (Wender et al. 1987a), an increase and evident spherical transformation trait of the oligodendroglia (Wender et al. 1987b). In the here presented paper we are dealing with the oligodendroglial morphology of the white matter of the ageing rat brain.

### MATERIAL AND METHODS

The investigations were conducted on Wistar rats of either sex. Each age group: the controls (4 months old rats) and 2- and 2.5-year-old rats consisted of 8 animals. The rats were kept under identical routine laboratory conditions. When needed for morphological examinations, the animals were exsanguinated under ethyl ether anesthesia by means of heart puncture, and the brains were instantly removed from their cranial vaults and fixed in Baker's solution at 4°C. After fixation — the brains were embedded in paraffin and then cut into slices 7 µm thick. The so obtained sections were deparaffinized and thereafter subjected to acid hydrolysis in 1N HCl at 37°C for 3.5 hrs to be followed by staining according to Feulgen (Krygier-Stojałowska 1982).

Karyo- and cytophotometric determinations of the oligodendroglia of the *corpus callosum*, of the *fimbria hippocampi* and of the cerebellar white matter were carried out by means of on automatic Morphoquant scanning micro-



scope, VEB Carl-Zeiss Jena, GRD, coupled to a KSR 4100 computer (Agadshanian et al. 1977; Voss et al. 1979). Monochromatic light, 560 nm in wavelength was used. The following parameters of the actual state, size and shape of the nuclear chromatin of the oligodendroglia were evaluated:

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

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

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

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

EXTS — sum of extinctions of all points of the examined object expressed in working units used in cytophotometry;

KOMP — index determining compactness of nuclear chromatin;

ZNTR — index determining rate of chromatin concentration around centre of the nucleus.

Measurements from 300 cell nuclei in each brain structure were subjected to evaluation. The individual results from each experimental group were summarized and statistically compared by means of the nonparametric test of inter-class incompatibility of Kolmogorov-Smirnov (Greń 1982). An incompatibility of more than 95% between the individual classes under evaluation was accepted as statistically significant (probability level  $\leq 0.05$ ).

## RESULTS

The results of our karyo- and cytophotometric examinations are presented in Table 1.

The dimensions of the nuclei of oligodendroglial cells of all brain structures under investigation from rats aged 2.5 years — as compared with the 4-month-old animals — were significantly decreased, as could be demonstrated by the decreased KONL (Fig. 1) and KOFL (Fig. 2) indices. The oligodendroglial nuclei from rats aged 2 years did not show any changes with respect to the parameters. It also should be pointed out that in the "old age group" — the dispersions of the cytophotometric parameters around the individual means were markedly smaller than in the control and 2-year-old animals (Fig. 1 and 2).

The oligodendroglial nuclei of 2.5-year-old rats showed not only a decrease in size, but also a definite change of their shape, i.e. a rounding of their (Krygier-Stojałkowska et al. 1980; Kulczycki et al. 1982). The results of cytophotometric determinations of DNA in preparations stained by the method of Feulgen may be influenced by age-dependent changes in the compactness of the nuclear chromatin (ratio of eu- and heterochromatin), that

Table 1. Results of the karyo- and cytophotometric investigations of the white matter oligodendroglia of the rat

Tabela 1. Wyniki badań kario- i cytotometrycznych oligodendrogleju istoty białej mózgu szczura

Brain region/age Okolica/wiek	Value Wartość	KONL	KOFL	FOFA	DMVH	EXTS	KOMP	ZNTR
Corpus callosum Spoidło wielkie								
Control Kontrola	$\bar{x} \pm SD$	77 ± 7	209 ± 33	146 ± 10	76 ± 11	59 ± 11	63 ± 3	77 ± 9
	min	51	95	126	41	23	45	48
	max	96	288	197	100	94	75	100
2 years 2 lata	$\bar{x} \pm SD$	77 ± 6	208 ± 31	144 ± 9	76 ± 11	64 ± 11	62 ± 3	77 ± 8
	min	56	108	126	42	24	51	41
	max	100	296	191	96	101	73	96
	p <	ns	ns	0.001	ns	0.001	ns	ns
2.5 years 2,5 lat	$\bar{x} \pm SD$	74 ± 6	192 ± 28	144 ± 10	79 ± 9	71 ± 9	69 ± 4	78 ± 8
	min	55	102	124	53	35	51	32
	max	103	283	194	100	119	85	98
	p <	0.001	0.001	0.03	0.001	0.001	0.001	0.01
Fimbria hippocampi Strzępek hipokampa								
Control Kontrola	$\bar{x} \pm SD$	76 ± 6	205 ± 30	142 ± 8	80 ± 8	65 ± 8	62 ± 3	79 ± 7
	min	54	110	126	48	23	44	48
	max	103	293	195	100	106	75	100
2 years 2 lata	$\bar{x} \pm SD$	75 ± 6	198 ± 28	143 ± 8	79 ± 9	66 ± 8	62 ± 3	77 ± 8
	min	57	121	125	51	39	49	43
	max	100	283	192	100	94	74	98
	p <	ns	0.001	ns	ns	ns	ns	0.001
2.5 years 2,5 lat	$\bar{x} \pm SD$	72 ± 5	186 ± 24	141 ± 8	83 ± 8	71 ± 7	68 ± 4	78 ± 7
	min	53	113	124	58	47	52	51
	max	98	293	193	100	122	80	95
	p <	0.001	0.001	ns	0.001	0.001	0.001	ns



Brain region/age Okolica/wiek	Value Wartość	KONL	KOFL	FOFA	DMVH	EXTS	KOMP	ZNTR
Cerebellar white matter Istota biała mózdzku								
Control Kontrola	$\bar{x} \pm SD$	75 ± 7	195 ± 33	145 ± 11	77 ± 10	60 ± 10	65 ± 5	75 ± 10
	min	55	113	124	42	23	49	29
	max	99	300	194	96	94	82	99
2 years 2 lata	$\bar{x} \pm SD$	76 ± 6	202 ± 28	143 ± 8	79 ± 10	68 ± 8	65 ± 4	77 ± 8
	min	57	123	127	46	37	52	35
	max	100	294	187	100	102	82	99
	p <	ns	0.05	0.001	ns	0.001	ns	0.01
2.5 years 2,5 lat	$\bar{x} \pm SD$	69 ± 6	180 ± 28	143 ± 9	79 ± 9	71 ± 9	68 ± 4	79 ± 8
	min	50	101	124	43	46	52	45
	max	90	275	191	100	125	80	100
	p <	0.001	0.001	0.02	0.03	0.001	0.001	0.001

Explanations:  $\bar{x}$  – mean, SD – standard deviation of the mean, min – minimal value, max – maximal value, p – probability level of significance of differences between control and old aged animals.

Objaśnienia:  $\bar{x}$  – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe, min – wartość minimalna, max – wartość maksymalna, p – poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy grupą kontrolną a zwierzętami starymi.

1

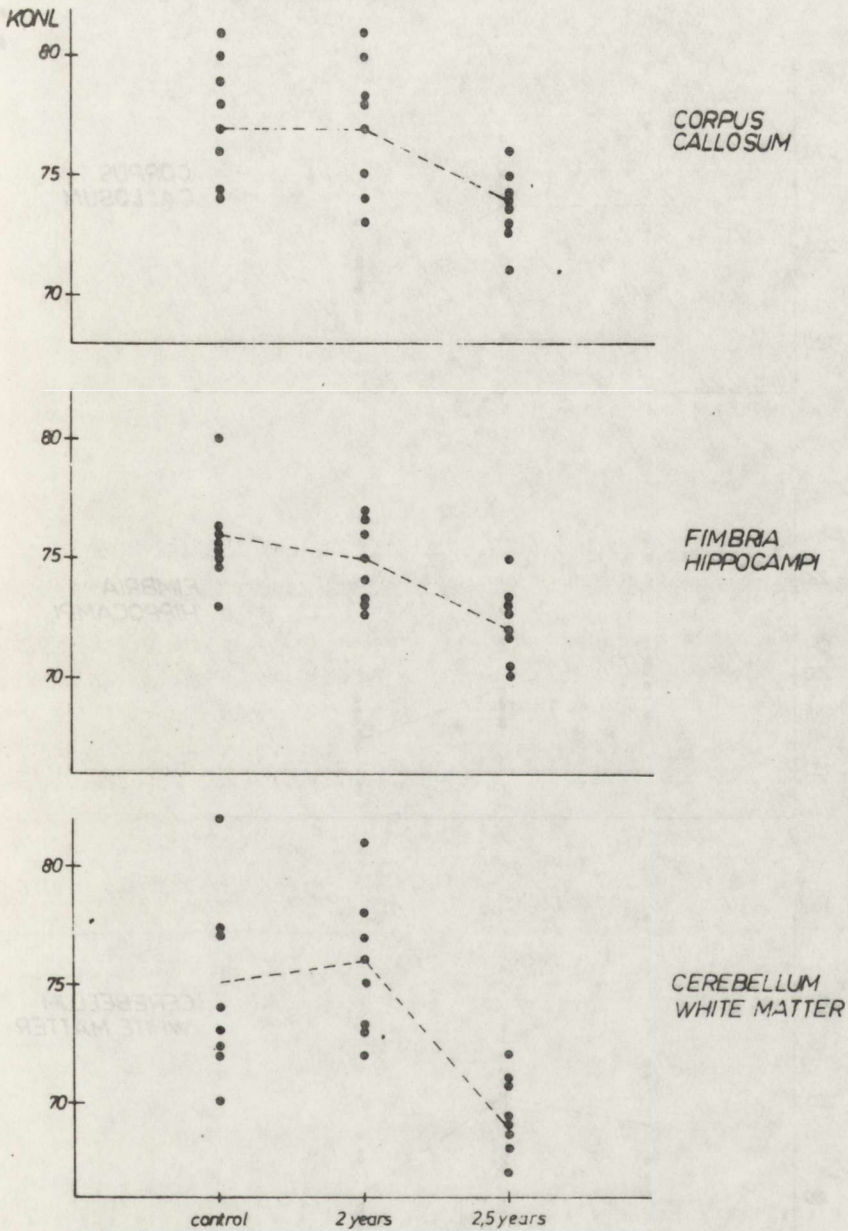


Fig. 1. The length of nuclei contour (KONL) ● — mean of determinations from 300 cell nuclei pertaining to a single animal, --- mean of determinations from all animals in a given age group  
 Ryc. 1. Długość obwodu przekroju jądra komórkowego (KONL) ● — wartość średnia pomiarów 300 jąder komórkowych pojedynczego zwierzęcia, --- wartość średnia pomiarów wszystkich zwierząt z danej grupy wiekowej



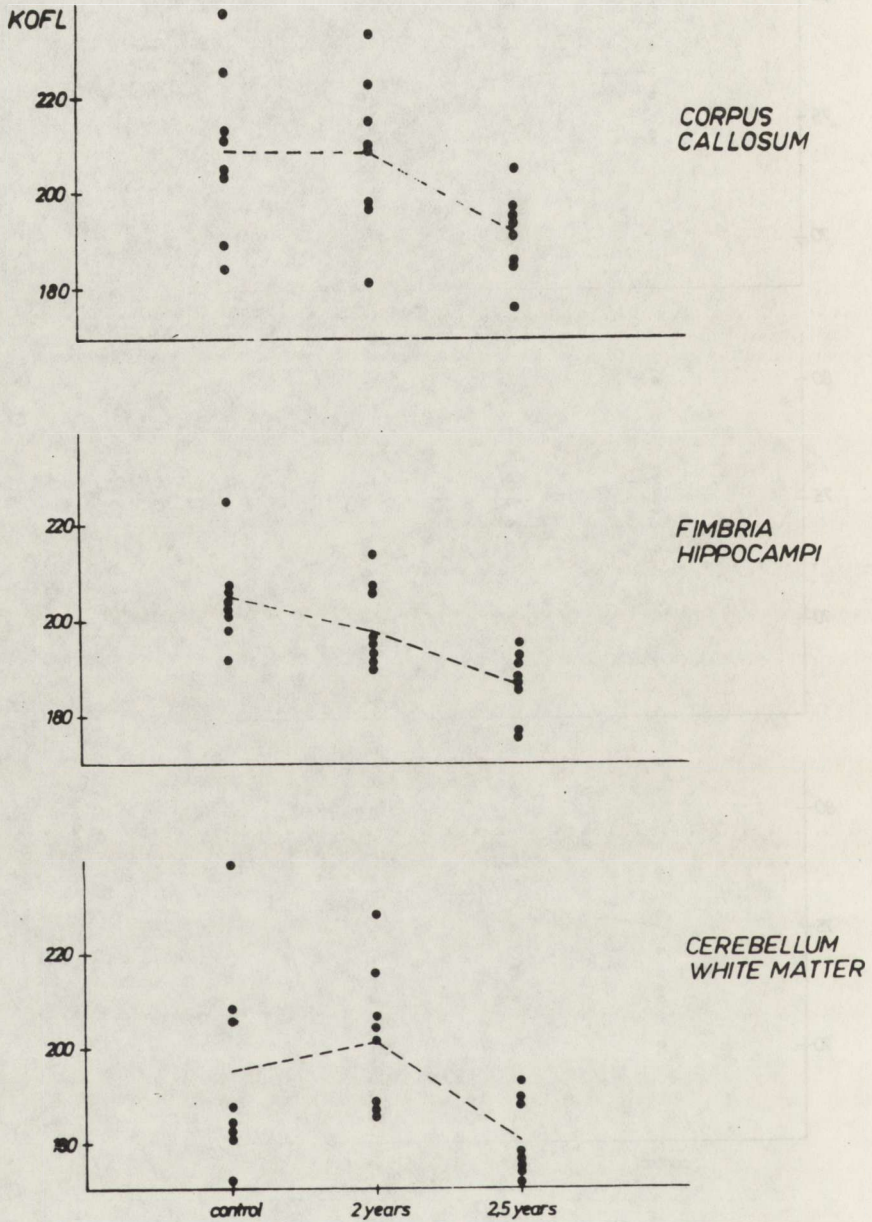


Fig. 2. The area within the nuclei contour (KOFL) (explanation as in Fig. 1)  
 Ryc. 2. Pole powierzchni przekroju jądra komórkowego (KOFL). Objasnienia jak na ryc. 1

3

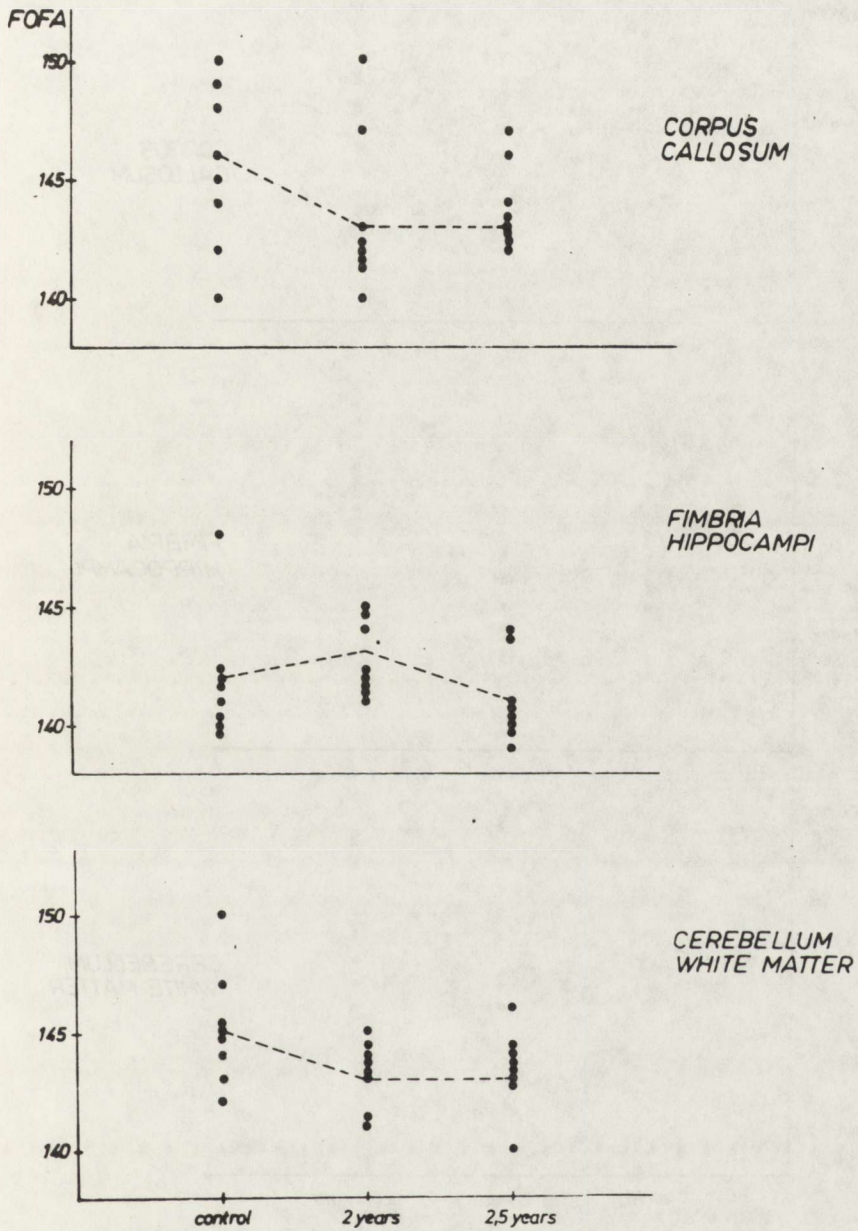


Fig. 3. Shape index (FOFA) (explanation as in Fig. 1)

Ryc. 3. Współczynnik kształtu (FOFA). Objasnienia jak na ryc. 1



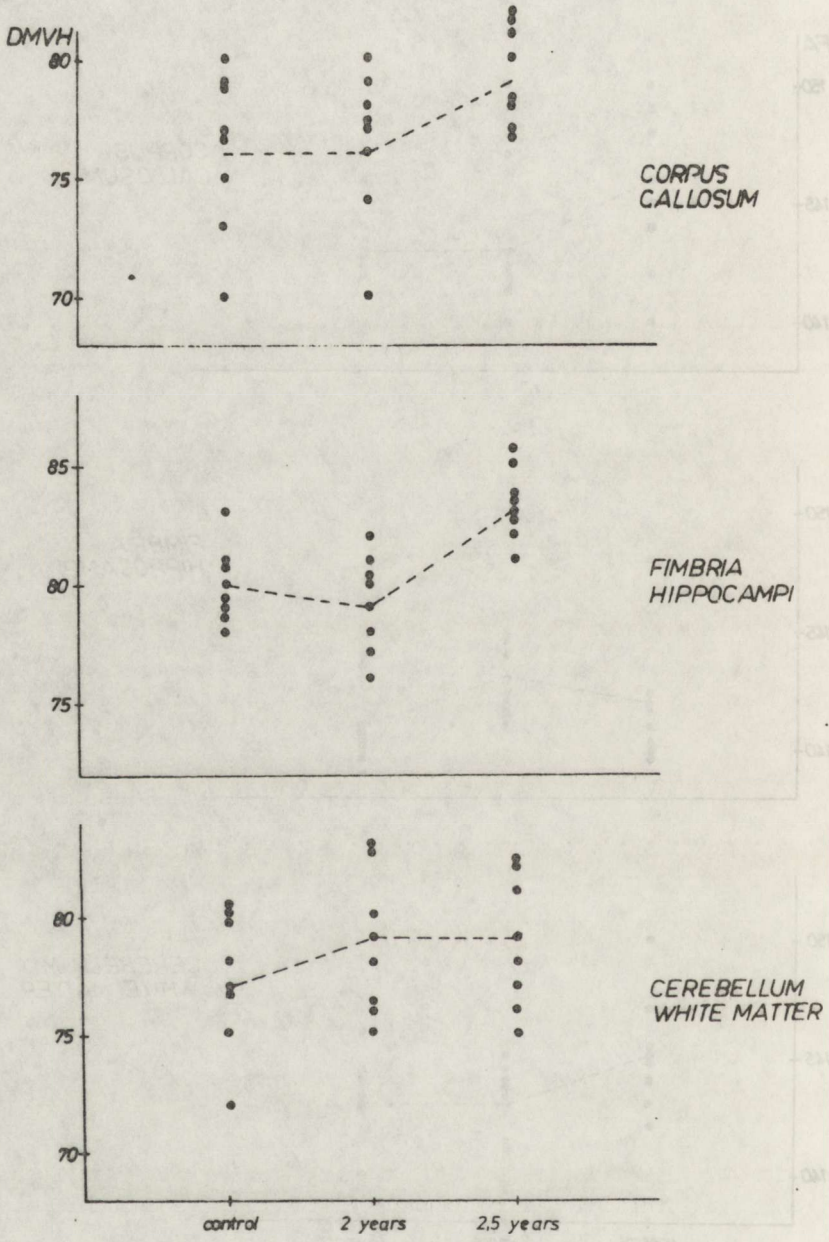


Fig. 4. Cell elongation index (DMVH) (explanation as in Fig. 1)  
 Ryc. 4. Współczynnik wydłużenia (DMVH). Objaśnienia jak na ryc. 1

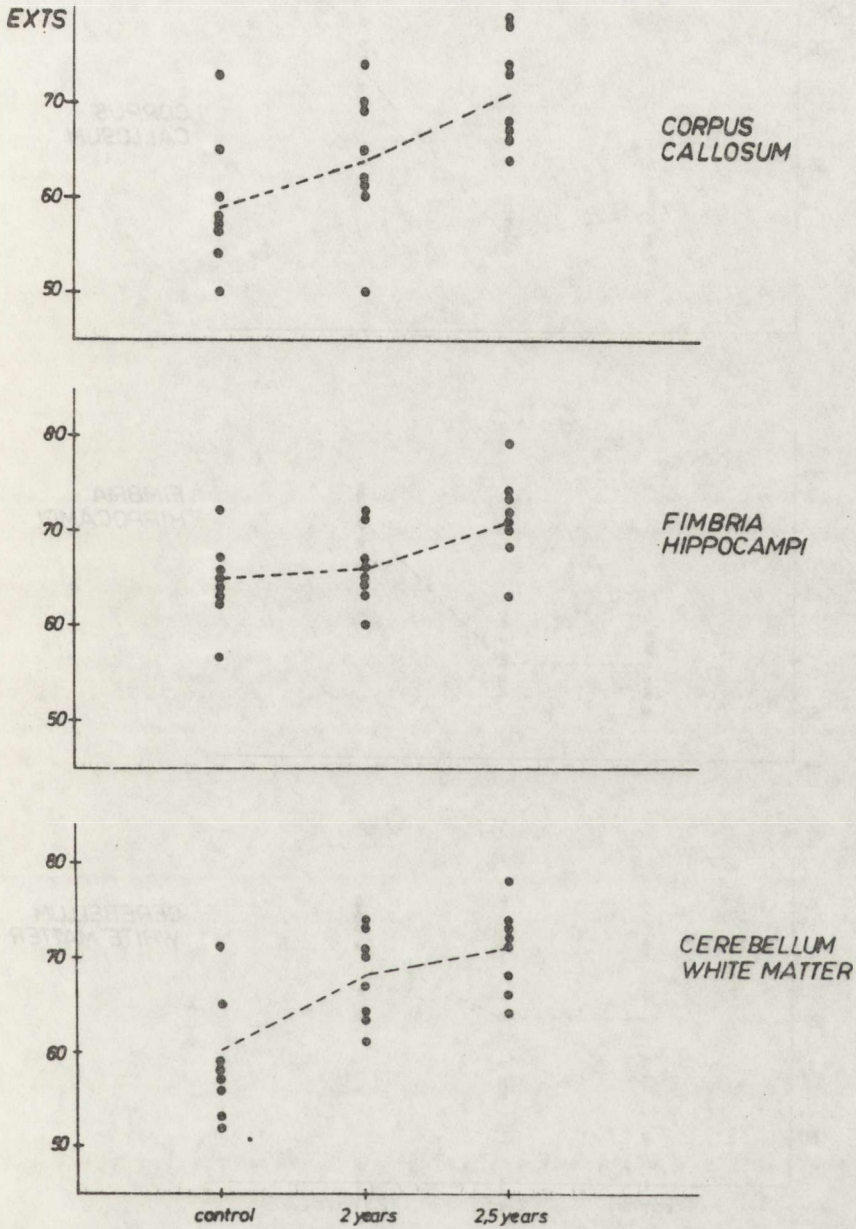


Fig. 5. Extinction coefficients (EXTS) (explanation as in Fig. 1)

Ryc. 5. Suma ekstynkcji (EXTS). objaśnienia jak na ryc. 1



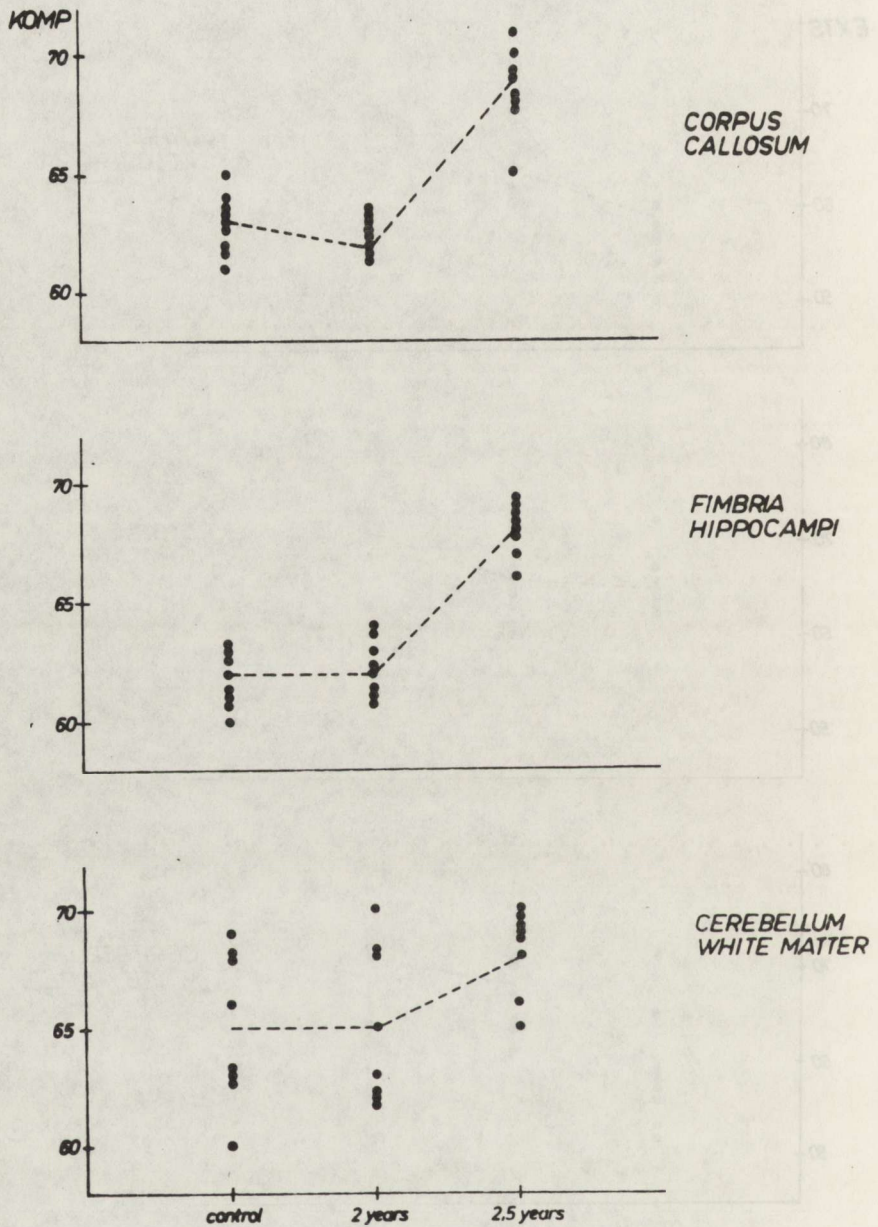


Fig. 6. Nuclear chromatin compactness index (KOMP) (explanation as in Fig. 1)

Ryc. 6. Współczynnik zbitości chromatyiny jądrowej (KOMP). Objaśnienia jak na ryc. 1

7

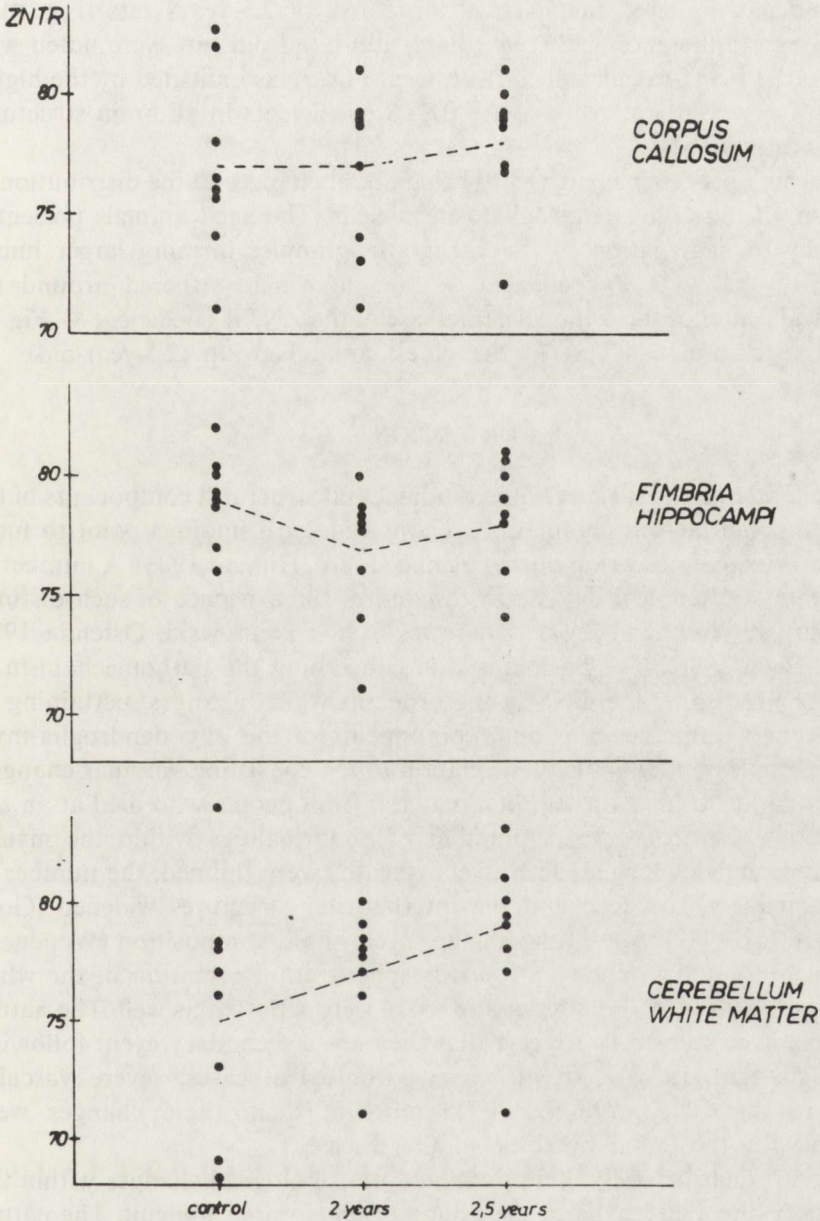


Fig. 7. Index of nuclear chromatin compactness in the geometrical center of the nucleus (ZNTR) (explanation as in Fig. 1)

Ryc. 7. Współczynnik centryczności ułożenia chromatyny jądrowej (ZNTR). Objasnienia jak na ryc. 1



boundaries. This change is reflected by the decrease of the FOFA (Fig. 3) index (significance holds true the *corpus callosum* and cerebellar white matter of 2- and 2.5-year-old animals) and by the increase of the DMVH index. The latter was significantly altered in all brain structures of 2.5-year-old rats (Fig. 4).

The largest differences between young, adult and old rats were noted with respect to the EXTS coefficient of the nuclei (Fig. 5), as indicated by the highly significant ( $p < 0.001$ ) increase of the EXTS coefficients in all brain structures under investigation.

The ageing process has proved to bring about changes in the distribution of chromatin all over oligodendroglial cell nucleus. The aged animals presented a tendency to aggregation of the chromatin granules forming larger lumps (increase of the KOMP coefficient — Fig. 6) which gathered around the geometrical center of the cell nuclei (increase of the ZNTR coefficient — Fig. 7). These changes are seen best in the oldest animal group (2.5-year-old).

#### DISCUSSION

The oligodendroglia is one of the fundamental structural components of the glia-myelin-axial neuron complex. Psychopathological findings point to functional disturbances occurring during ageing (Jolles, Hijman 1983). A number of experimental and clinical data seem to confirm the existence of such disturbances (Taraszewska et al. 1971; Iwanowski 1984; Iwanowski, Ostenda 1974; England, Brun 1986). The basic question concerning the pathomechanism of the ageing process in the CNS is the order in which changes, pertaining to ageing occur within the individual components of the oligodendroglia-myelin-axon complex and what is their relation to the coexisting vascular changes.

In our earlier studies on autptic material from people who died at an age above 70, we have observed a number of abnormalities within the myelin sheaths and oligodendroglia. The myelin sheaths were thinned, the number of myelin lamellae — reduced and the interlamellar structures widened (Goncarzewicz et al. 1989). Alterations of the myelin lipid composition (Wender et al. 1987a, 1988) and a tendency towards spheric transformation of the white matter oligodendroglia (Wender et al. 1987b) were reported as well. The nature of these changes seemed to suggest that they are a secondary event following vascular changes. In fact, in all these pathological cases, severe vascular changes in the CNS were found, in most of them these changes were responsible for the lethal outcome of the disease.

The interpretation of the here presented morphological changes within the white matter oligodendroglia in the ageing brain is rather difficult. The nature of the observed changes is quite different from those found in the autptic material. The oligodendroglia of autptic human material and of the ageing rat brain had only one change in common, i.e. the increase of the EXTS coefficient. Increased concentrations of DNA in neuronal and glial cells of aged humans and experimental animals have been reported for many years (Bregnard et al.

may alter the susceptibility of the DNA molecule to acid hydrolysis (Mittermayer et al. 1971; Duijndan, Van Duijn 1975).

The observed changes in the ageing rat brain seem to resemble primary retrogressive changes and not secondary vasogenic ones. It should be stressed that in our material of aged rats — we were unable to demonstrate microscopically detectable signs of vasogenic injuries in the nervous tissue, such as perivascular lacunisation, focal ischaemic necrosis etc.

### CONCLUSIONS

1. In the course of ageing of the rat CNS, oligodendroglial cell nuclei of the white matter decrease in size and their contours become rounded.
2. The ageing process in the rat cerebral white matter manifests itself in increased values of the EXTS of oligodendroglial cell nuclei and in changes of the compactness of chromatin granules.
3. The observed cyto- and karyophotometric changes are more pronounced in 2.5-year-old animals than in 2-year rats, but different brain structures were affected by similar changes.
4. The described karyo- and cytophotometric changes suggest a primary nature of the events occurring in the oligodendroglia of the ageing rat brain.

### BADANIA KARIO- I CYTOFOTOMETRYCZNE OLIGODENDROGLEJU STARZEJĄCEGO SIĘ MÓZGU SZCZURA

#### Streszczenie

Przeprowadzono badania morfometryczne jąder komórkowych oligodendrogleju istoty białej mózgow starych szczurów w wieku 2 i 2,5 lat. Pomiary kario- i cytofotometryczne wykonano za pomocą automatycznego analizatora obrazów mikroskopowych Morphoquant na preparatach barwionych metodą Feulgena. W mózgach zwierząt starych stwierdzono, w porównaniu ze szczurami kontrolnymi (4-miesięcznymi) zmniejszenie i zaokrąglenie jąder komórkowych oligodendrogleju, wzrost sumy ekstynkcji oraz zmiany w stanie skupienia chromatyny jądrowej. Powyższe zmiany były podobne w różnych częściach mózgowia; były wyraźniejsze u zwierząt 2,5-letnich niż 2-letnich. Sugerują one pierwotny charakter uszkodzeń oligodendrogleju w starzejącym się mózgu szczura.

#### REFERENCES

1. Agadshanian S., Döpel P., Gretscher P., Witsack W.: Morphoquant — ein automatischer Mikroskopbildanalysator des VEB Carl Zeiss Jena. *Jenauer Rundsch.* 1977, 22, 270–274.
2. Bregnard A., Knusel A., Kuenzle C. C.: Are all the neuronal nuclei polyploid? *Histochemistry*, 1975, 43, 59–61.
3. Duijndan W. A. L., Van Duijn P.: The influence of chromatin compactness on the stoichiometry of the Feulgen-Schiff procedure studied in model films. II. Investigations on films containing condensed or swollen erythrocyte nuclei. *J Histochem Cytochem*, 1975, 23, 891–900.



4. England E., Brun A.: The white matter changes in senile dementia of Alzheimer type: Neuropathological ad biochemical correlates. X Intern. Congr. Neuropathology. Abstracts, Stockholm, 1986, 291.
5. Goncerzewicz A., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Wender M., Hejduk-Hantke H., Szczech J., Godlewski A.: White matter of the aging brain. *Funct Neurol*, 1989, (in press).
6. Greń J.: *Statystyka matematyczna. Modele i zadania*. PWN, Warszawa 1982.
7. Iwanowski L.: Myelin in the senile rat brain. *Neuropat Pol*, 1984, 22, 219–223.
8. Iwanowski L., Ostenda M.: Ultrastructural changes in the brain capillaries of old age. *Alternveränderungen des zentralen Nervensystems. Material der 4 Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR*. Mülhausen, 1974, 121–122.
9. Jolles J., Hijman R.: The neuropsychology of aging and dementia. In: *Aging and the brain*. Eds.: W. H. Gispen, J. Traber, Elsevier Science Publishing B. V., Amsterdam, Oxford, New York, 1983, 227–250.
10. Krygier-Stojałowska A.: *Zasady cytofotometrii*. In: *Topochemiczne metody badania komórek i tkanek*. PWN, Warszawa, 1982, 114–134.
11. Krygier-Stojałowska A., Kulczycki J., Madej M., Nowacki P., Honczarenko K.: Zmiany ilościowe DNA i białek zasadowych histonów w jądrach komórek nerwowych i glejowych mózgowia szczurów w różnym wieku. *Neuropat Pol*, 1980, 18, 97–106.
12. Kulczycki J., Krygier-Stojałowska A., Jaszczak K., Honczarenko K., Nowacki P., Madej M.: Deoxyribonucleoproteins in neurons and glial cells in the brain of mice at different age. *Neuropat Pol*, 1982, 20, 365–376.
13. Mittermayer Ch., Madreiter N., Lederer B., Sandritter W.: Differential acid hydrolysis of euchromatin and heterochromatin. *Biochemical, histochemical and morphological studies*. *Beitr Pathol*, 1971, 143, 157–171.
14. Taraszewska A., Lewicka-Wysocka H., Nozdryn-Plotnicki B.: Analiza neuropatologiczna zmian u psów starczych z nowotworami narządów wewnętrznych. *Neuropat Pol*, 1971, 9, 219–230.
15. Voss K., Neumann E., Witsack W.: "Universelles Programmsystem" für den automatischen Mikroskopbildanalysator Morphoquant. *Jenauer Rundsch*, 1979, 24, 167–169.
16. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Stanisławska J., Szczech J., Godlewski P.: Pattern of myelin lipids in the ageing brain. *Neuropat Pol*, 1987a, 25, 235–245.
17. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Szczech J., Godlewski A.: Myelin lipids in human ageing brain. *Neurochem Pathol*, 1988, 121–130.
18. Wender M., Godlewski A., Szczech J.: Oligodendroglia in the ageing human brain. *Neuropat Pol*, 1987b, 25, 461–472.

Author's address: Laboratory of Neuropathology, Department of Neurology, School of Medicine, 49 Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland

JERZY WĘGIEL, ELŻBIETA MEDYŃSKA, WOJCIECH DZIEDZIAK,  
WALENTYNA SZIRKOWIEC-GMURCZYK, JERZY DYMECKI

## MORFOLOGICZNA OCENA SKŁADNIKÓW TKANKOWYCH I KOMÓRKOWYCH PRĄŻKOWIA, GAŁKI BLADEJ I ISTOTY CZARNEJ SZCZURA 7-DNIOWEGO

Zakład Neuropatologii i Zakład Genetyki Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

Częstość występowania choroby Parkinsona jest dosyć duża i od czasów fundamentalnych prac Hornykiewicza (1963) znane jest jej podłoże biochemiczne. Niemniej zakres zmian morfologicznych pozostawia nadal wiele niejasności. Wiadomo, że osiowym objawem jest zwyrodnienie neuronów części zbitej istoty czarnej (SN), której polem projekcyjnym jest prążkowie, jednakże charakter i nasilenie zmian w prążkowie jest różnie interpretowane przez różnych autorów. Jedni uważają, że zmiany w prążkowie mają charakter wyłącznie czynnościowy i nie znajdują istotnych zmian morfologicznych, jakościowych ani ilościowych (Dom i wsp. 1973; Bottcher 1975). Inni, jak Bugiani i wsp. (1980) w badaniach cytometrycznych wykazali w chorobie Parkinsona ubytki neuronów w prążkowie.

Najczęściej stosowanym modelem doświadczalnym parkinsonizmu jest elektrokoagulacyjne lub chemiczne uszkodzenie komórek warstwy zbitej istoty czarnej, w następstwie czego dochodzi do spadku zawartości dopaminy (DA) w prążkowie (Ungerstedt 1971; Hökfelt i wsp. 1973). Powoduje to również odnerwienie dopaminergiczne komórek prążkowie, które może być uwidocznione, między innymi, metodą immunocytochemiczną, w której manifestuje się brakiem immunoreaktywności hydroksylazy tyrozynowej (Freund i wsp. 1985).

Pomimo licznych prac nad doświadczalnymi modelami parkinsonizmu brak w piśmiennictwie ilościowego opracowania zmian w różnych typach neuronów prążkowie w wyniku uszkodzenia istoty czarnej. Nie ma również jednolitej i powszechnie akceptowanej klasyfikacji komórek nerwowych prążkowie oraz zgodności co do jego strukturalno-czynnościowej organizacji. Niektórzy autorzy wyróżniają w prążkowie liczną populację neuronów małych



oraz mniej liczną neuronów dużych (Namba 1957, Bugiani i wsp. 1978; 1980). Inni wyróżniają neurony małe, duże i olbrzymie (Mori 1966), jeszcze inni dzielą neurony prążkowiec na małe, średnie i olbrzymie (Mensah, Deadwyler 1974; Pasik i wsp. 1976; Dimova i wsp. 1980). Nie ma jednoznacznych dowodów, które z tych neuronów należą ściśle do układu nigrostriatalnego tzn. odbierają bodźce od neuronów części zbitej SN, które pełnią rolę interneuronów prawdopodobnie acetylocholinergicznym (Hornykiewicz 1982), a które z nich należą do układu striatonigralnego i przekazują bodźce gabaergiczne (GABA) z prążkowiec do neuronów istoty czarnej (Hajdu i wsp. 1973; Grafova 1975; Pasik i wsp. 1976).

Ostatnie lata przyniosły ożywienie zainteresowania doświadczalnymi modelami parkinsonizmu w związku z klinicznymi próbami wyrównania niedoboru DA w prążkowiec przez wszczepianie do niego komórek produkujących ten neurotransmitter. Dla obiektywnej oceny wpływu przeszczepu na prążkowiec, odnerwione na skutek zniszczenia SN, konieczna jest gruntowna znajomość składu tkankowego i komórkowego prążkowiec u zwierząt zdrowych, a następnie po zniszczeniu istoty czarnej oraz po transplantacji. Warunkiem obiektywnej oceny ilościowej elementów strukturalnych prążkowiec, jak również innych badanych struktur mózgowych, jest opracowanie takiego sposobu pobierania materiału, który zapewniłby precyzyjne i porównywalne wykonanie pomiarów w ściśle określonej i zawsze tej samej strefie badanej struktury.

Za zadanie postawiliśmy sobie przeprowadzenie analizy składu tkankowego struktury mózgowej, którą wszczepia się, tzn. istoty czarnej oraz struktury, która przeszczep przyjmuje, tj. prążkowiec. Celem naszych badań było więc opracowanie techniki przygotowania i pobierania materiału do oceny ilościowej, jak również opracowanie metod morfometrycznej oceny badanych struktur. Ponadto — morfometryczna ocena składników tkankowych i komórkowych jądra ogoniastego — skorupy, gałki bladej oraz istoty czarnej (części zbitej, siatkowatej i bocznej), jak również ocena rozkładu i wielkości komórek nerwowych prążkowiec szczura 7-dniowego. Jest to etap wstępny w planowanym cyklu badań biomorfozy mózgu szczura w różnych okresach rozwoju.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na szczurach wsobnych szczepu Wistar WAG Albino. Szczury samce przeznaczone do badań biomorfozy pochodziły z miotów zmniejszanych do połowy przez usunięcie samic, co zapewniało większą unifikację warunków żywienia i rozwoju.

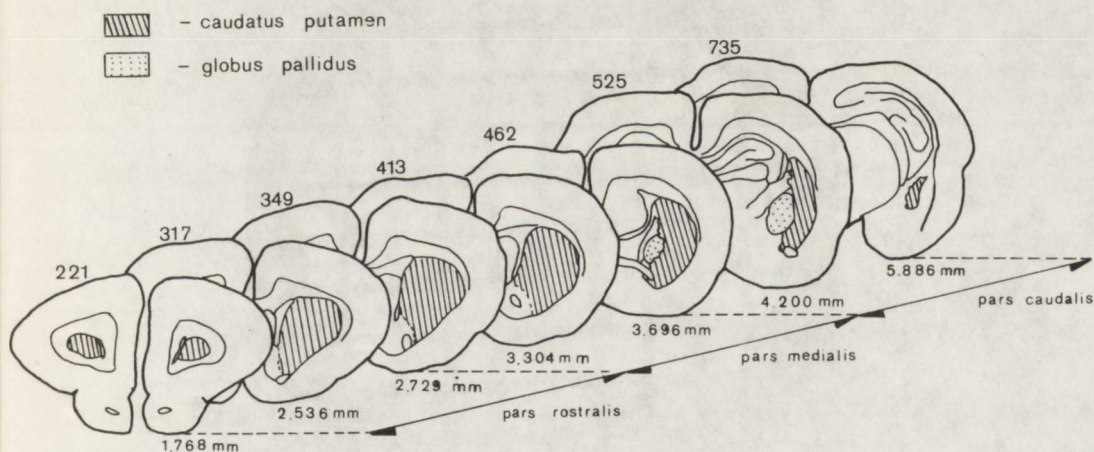
Materiał przeznaczony do badań ilościowych w mikroskopie świetlnym pobrano od 5 zwierząt w wieku 7 dni. Zwierzęta dekapitowano, mózgi utrwalano w 8% roztworze zobojetnionego formaldehydu przez 2 doby. Odwadniano w szeregu alkoholi o rosnącym stężeniu i prześwietlano w benzoianie metylu. Mózgi zatopione w parafinie krojono seryjnie w płaszczyźnie

czołowej na skrawki o grubości 8  $\mu\text{m}$ . Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną oraz metodą Klüvera – Barrery.

Pomiary na poziomie mikroskopu świetlnego przeprowadzono dla trzech badanych struktur: jądra ogoniastego-skorupy, gałki bladej i istoty czarnej. Szczegółowe pomiary składu tkankowego i komórkowego wykonano na skrawkach reprezentatywnych dla poszczególnych badanych struktur, wybranych na podstawie wcześniejszych pomiarów objętości tych struktur, wykonanych na tym samym materiale (Węgiel i wsp. 1989). U szczurów 7-dniowych część przednią jądra ogoniastego-skorupy reprezentował skrawek odległy od końca opuszki węchowej o 2,536 mm, część środkową skrawek odległy o 3,304 mm od końca opuszki i część tylną skrawek odległy o 4,200 mm od opuszek węchowych (ryc. 1). Pomiary tkankowe i komórkowe gałki bladej wykonano na skrawku odległym o 4,200 mm od węchomózgowia, czyli od końca opuszki węchowej, zapewniającym maksymalny przekrój tej struktury (ryc. 1).

Ocenę ilościową istoty czarnej przeprowadzono na 6 skrawkach odległych od końca opuszki węchowej o 6,640 mm, 6,896 mm, 7,144 mm, 7,400 mm, 7,568 mm i 7,784 mm, oddzielnie dla części zbitej, siatkowatej i bocznej (ryc. 2).

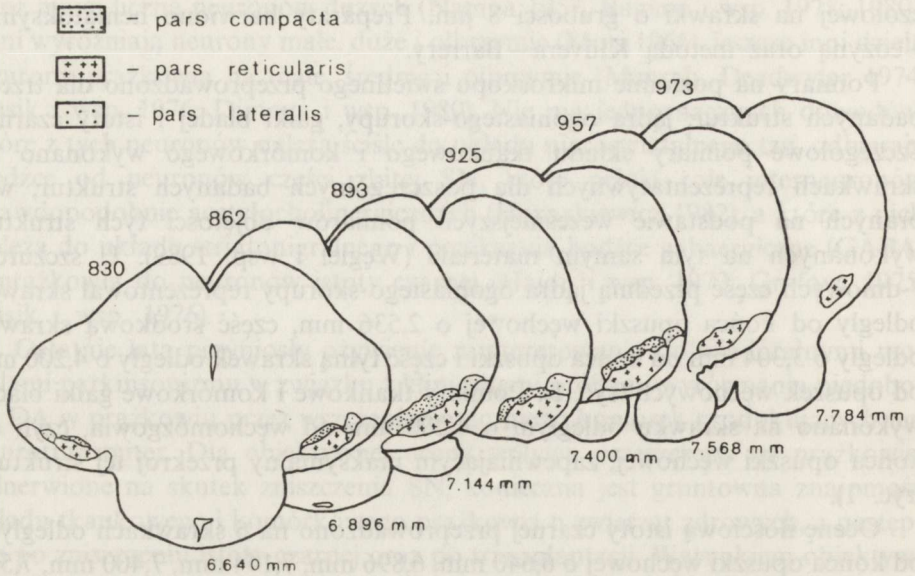
Pomiary przeprowadzono w obrębie prawej półkuli mózgu przy powiększeniu 1280 $\times$ , przy zastosowaniu półautomatycznego analizatora obrazów MOP – AM03 firmy KONTRON. Obraz mikroskopowy rzutowany był na arkusz papieru, powierzchnia pola pomiarowego po powiększeniu wynosiła 15,386 mm<sup>2</sup>. Rzeczywista powierzchnia pola testowego wynosiła 0.0093908 mm<sup>2</sup>. Dla standaryzacji rozmieszczenia pól testowych na całym przekroju



Ryc. 1. Kształt, wielkość i topografia jądra ogoniastego-skorupy i gałki bladej szczura 7-dniowego na skrawkach seryjnych. U góry podano numer seryjnego skrawka, u dołu – odległość od końca opuszek węchowych (mm)

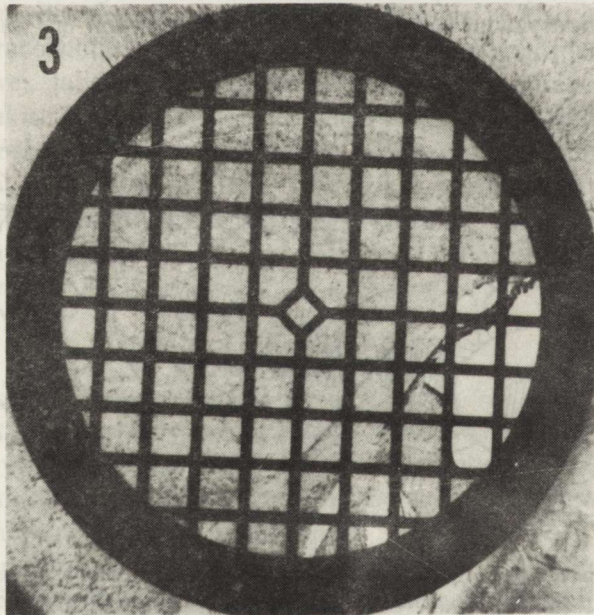
Fig. 1. Shape, size and topography of caudate-putamen and globus pallidus in 7-day-old rat on serial sections. The number of section in the upper part of the picture, the distance from the end of olfactory bulbs (mm) in the lower one





Ryc. 2. Kształt, wielkość i topografia poszczególnych części istoty czarnej szczura 7-dniowego na skrawkach seryjnych. U góry podano numer seryjnego skrawka, u dołu — odległość od końca opuszek węchowych (mm)

Fig. 2. Shape, size and topography of various parts of substantia nigra in 7-day-old rat on serial sections. The number of section in the upper part of the picture, the distance from the end of olfactory bulbs (mm) in the lower one



Ryc. 3. Siatka do standaryzacji pól pomiarowych umieszczona pod szkiełkiem nakrywkowym na preparacie obejmującym jądro ogoniaste-skorupę. Pow. 22 ×

Fig. 3. The grid for standarization of measured fields placed under the cover glass on the specimen caudate-putamen. × 22

badanych struktur posłużono się siatkami nośnymi do skrawków, używanymi w mikroskopii elektronowej (średnica 3 mm, 60 pełnych kwadratowych otworów). Pomiar wykonywano standardowo w lewym górnym rogu kwadratu. Siatka stwarzała regularny układ współrzędnych zapewniających identyfikację odpowiadających sobie pól u każdego z pięciu badanych zwierząt (ryc. 3). W części przedniej jądra ogoniastego-skorupy wykonano pomiary w 43 polach testowych, w części środkowej w 53, a w tylnej w 28 polach (łącznie w 124 polach u 1 szczura, a w 620 polach u 5 szczurów). W gałce bladej oceniono 75 pól testowych, w części zbitej istoty czarnej 65 pól, w siatkowej 51, a w bocznej 12 pól.

## WYNIKI

### Analiza morfometryczna składu tkankowego i komórkowego prążkowie, gałki bladej i istoty czarnej

Analiza morfometryczna przeprowadzona oddzielnie w części przedniej, środkowej i tylnej prążkowie wykazała, że objętość naczyń jest w trzech częściach zbliżona i wynosi 0,62; 0,77 i 0,72% objętości jądra ogoniastego-skorupy. Objętość neuropilu wynosi odpowiednio 83,37; 80,20 i 84,72%. Rzadko występujące komórki nerwowe olbrzymie stanowią tylko 0,09% objętości części przedniej, 0,24% części środkowej i 0,05% części tylnej prążkowie. Pozostałe komórki nerwowe w części przedniej, środkowej i tylnej zajmują odpowiednio 11,03; 12,59 i 9,62% objętości, a komórki gleju tylko 3,26; 3,96 i 3,32% objętości prążkowie (ryc. 4).

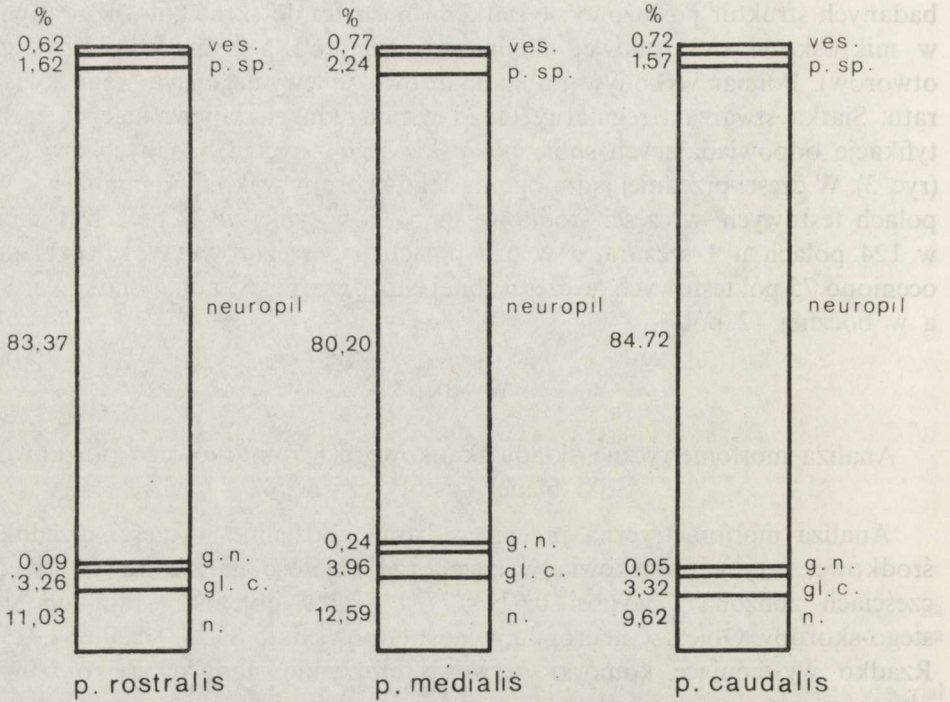
Analiza morfometryczna składu tkankowego i komórkowego gałki bladej (ryc. 5) wykazała, że naczynia zajmują 0,57% objętości, neuropil stanowi 88,8%. Objętość komórek nerwowych wynosi 6,93%, a gleju 2,16% (ryc. 6).

Badania ilościowe składu tkankowego i komórkowego istoty czarnej (ryc. 7) poszczególnych jej części wykazały, że struktury te są ubogo unaczynione – naczynia stanowią 0,29% objętości części zbitej, 0,34% części siatkowatej i 0,76% części bocznej. Neuropil stanowi 83,1% części zbitej, 91,7% części siatkowatej i 85,0% części bocznej. Glej jest składnikiem najmniej zmiennym – stanowi około 2,2% objętości każdej z trzech części istoty czarnej. Komórki nerwowe stanowią 13,6% objętości części zbitej, 11,39 części bocznej, a tylko 5,27% części siatkowatej (ryc. 8).

### Analiza morfometryczna rozmieszczenia i wielkości komórek nerwowych w części przedniej, środkowej i tylnej prążkowie

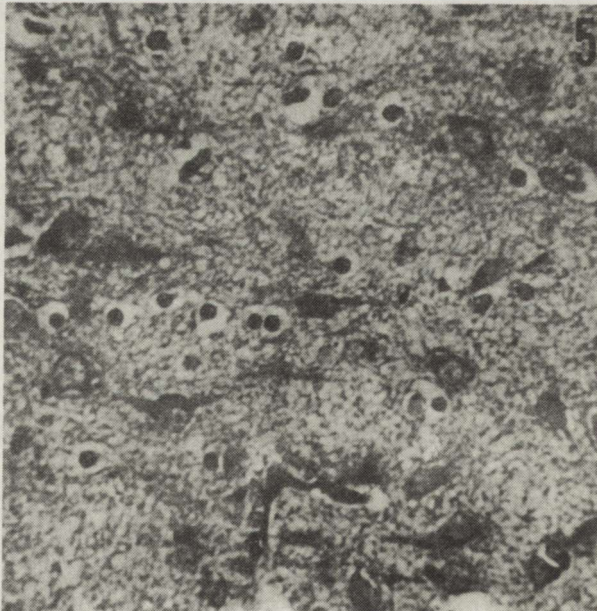
U szczurów 7-dniowych rozróżnienie w mikroskopie świetlnym komórek nerwowych małych, średnich i dużych (wg własnej terminologii) było niemożliwe, dlatego też wszystkie komórki nerwowe liczono razem, jedynie komórki nerwowe olbrzymie mogły zostać wyraźnie odróżnione. Przeprowadzone przez nas badania rozkładu komórek w części przedniej, środkowej i tylnej jądra ogoniastego-skorupy wykazują niejednorodność tej struktury. Gęstość komó-





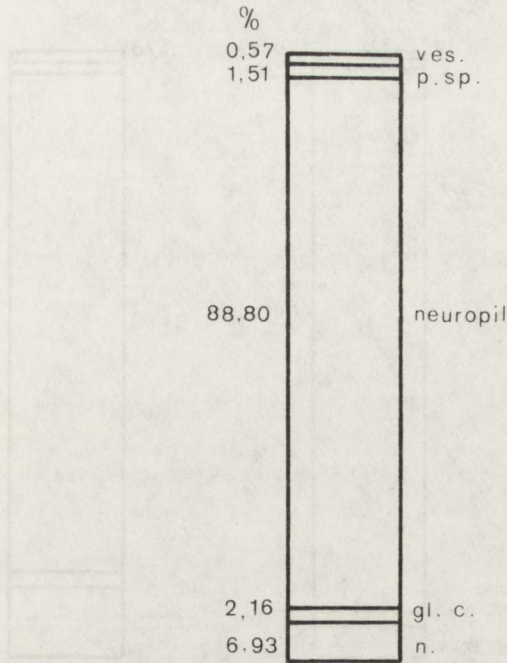
Ryc. 4. Skład tkankowy i komórkowy części przedniej, środkowej i tylnej jądra ogoniastego-skorupy (w procentach); ves. — naczynia, p.sp. — przestrzeń okołonacyniowa, g.n. — neurony olbrzymie, gl.c. — komórki glejowe, n. — neurony

Fig. 4. Tissue and cell composition of anterior, medial and posterior part of caudate-putamen (in percentages); ves. — vessels, p.sp. — perivascular space, g.n. — giant neurons, gl.c. — glial cells, n. — neurons



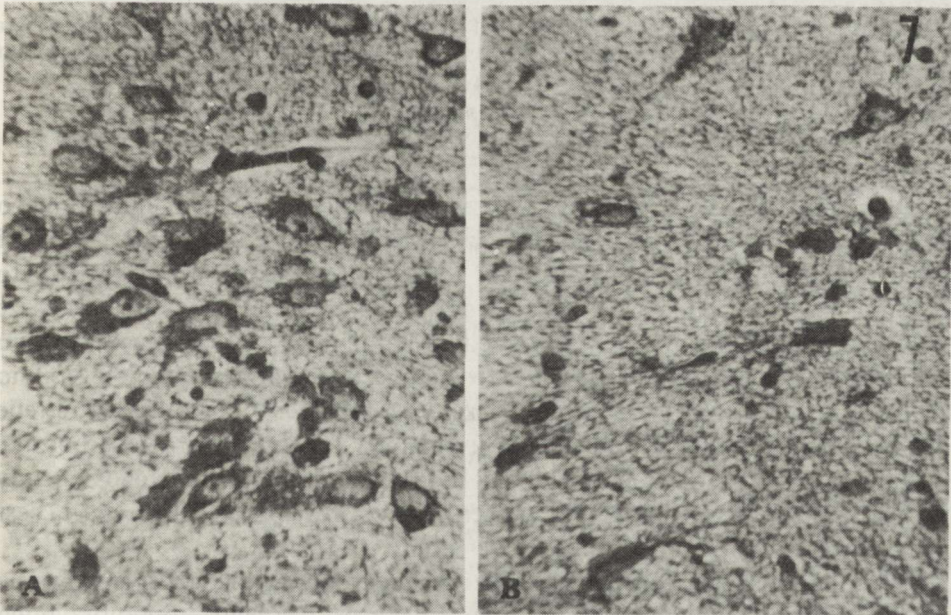
Ryc. 5. Obraz mikroskopowy gałki bladej. Klüver—Barrera. Pow. 400 ×

Fig. 5. Microscopic picture of globus pallidus. Klüver—Barrera. × 400



Ryc. 6. Skład tkankowy i komórkowy gałki bladej (w procentach); ves. — naczynia, p.sp. — przestrzeń okołonacyniowa, gl.c. — komórki glejowe, n. — neurony

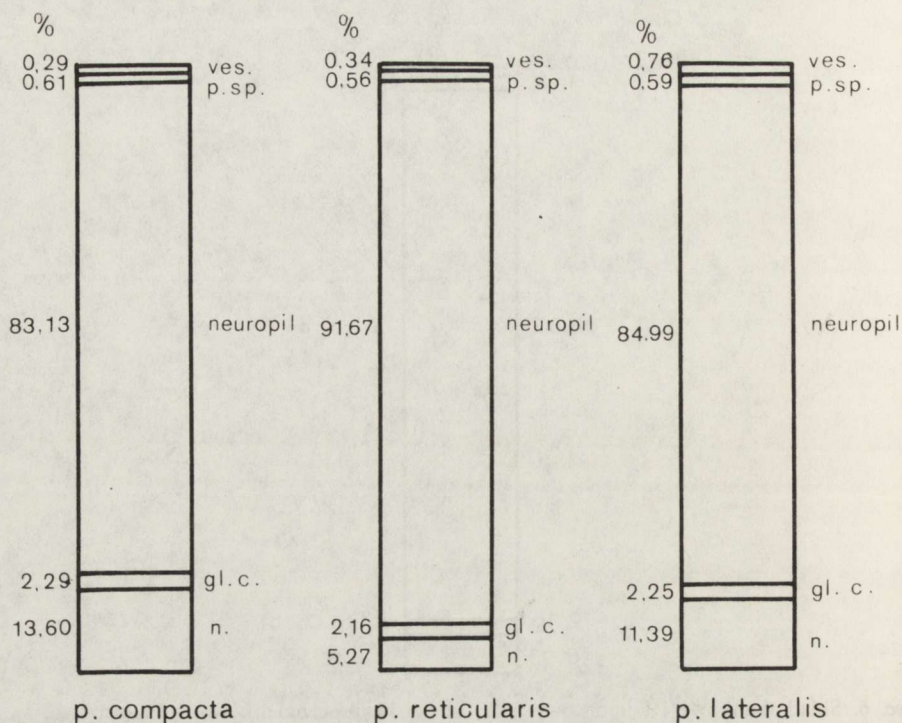
Fig. 6. Tissue and cell composition of pallidum (in percentages); ves. — vessels, p.sp. — perivascular space, gl.c. — glial cells, n. — neurons



Ryc. 7. Obraz mikroskopowy istoty czarnej. A — warstwa zbita, B — warstwa siatkowata. Klüver-Barrera. Pow. 400 ×

Fig. 7. Microscopical picture of substantia nigra. A — compact zone, B — reticular zone. Klüver-Barrera. ×400





Ryc. 8. Skład tkankowy i komórkowy części zbitej, siatkowatej i bocznej istoty czarnej wyrażony w procentach; ves. — naczynia, p.sp. — przestrzeń okołonaczyniowa, gl.c. — komórki glejowe, n. — neurony

Fig. 8. Tissue and cell composition of compact, reticular and lateral zones of substantia nigra expressed in percentages; ves. — vessels, p.sp. — perivascular space, gl.c. — glial cells, n. — neurons

rek nerwowych jest największa w części środkowej (2236/1 mm<sup>2</sup>), nieco mniejsza w części przedniej (2129/1 mm<sup>2</sup>), a zdecydowanie najmniejsza w części tylnej (1842/1 mm<sup>2</sup>) (ryc. 9). Różnice w gęstości komórek nerwowych wykryto również na osi od komór ku stronie bocznej. Badania ilościowe wykazały, że w strefie przykomorowej części przedniej prążkowiec w 1 polu testowym znajdują się średnio 32 komórki, a w strefie bocznej dwa razy mniej — średnio 14 komórek (ryc. 9). Podobnie w części środkowej prążkowiec, w strefie przykomorowej znajdują się średnio 32 komórki nerwowe, a w strefie bocznej średnio 17 komórek (ryc. 9). W części środkowej jądra ogoniastego-skorupy różnice te są dostrzegalne nawet w ocenie jakościowej (ryc. 10). Cecha ta jest nieuchwytna w części tylnej.

Badania ilościowe prążkowiec wykazały bardzo wyraźne zróżnicowanie strefowe występowania neuronów olbrzymich. Stosunek neuronów olbrzymich do pozostałych komórek nerwowych w części przedniej wynosił 1:268, w części środkowej 1:147 i w części tylnej 1:545. Nierównomierne rozmieszczenie

		<b>dorsalis</b>								
		12	14	*18	18	22		<b>paraventricularis</b>		
		17	17	18	16	*19	28			
<b>lateralis</b>		14	18	*18	*19	20	20		30	32
		**15	**13	*16	*16	21	19		29	32
		11	17	16	15	*18	*21		24	32
		14	17	26	21	24				
				20	20	34				

2129 - całkowita liczba neuronów/mm<sup>2</sup>  
 - total number of neurons/mm<sup>2</sup>

**Pars Rostralis**

		<b>ventralis</b>						
		20	20	18	22	23	29	
		*18	*18	20	*18	*24	38	32
		**18	*19	*14	*19	20	29	39
		**16	*17	***15	*17	*17	21	38
		**18	*18	20	18	23	23	28
		*13	**18	*18	*23	25	23	30
		17	19	***19	**22	*28	31	30
				11	18	22	19	16

2236 - całkowita liczba neuronów/mm<sup>2</sup>  
 - total number of neurons/mm<sup>2</sup>

**Pars Medialis**

					21	19	17	
					15	12	15	16
					14	17	15	11
					14	18	17	
					13	18	18	
					15	*15	17	
					*15	19	22	
					26	20	23	
					16	25		

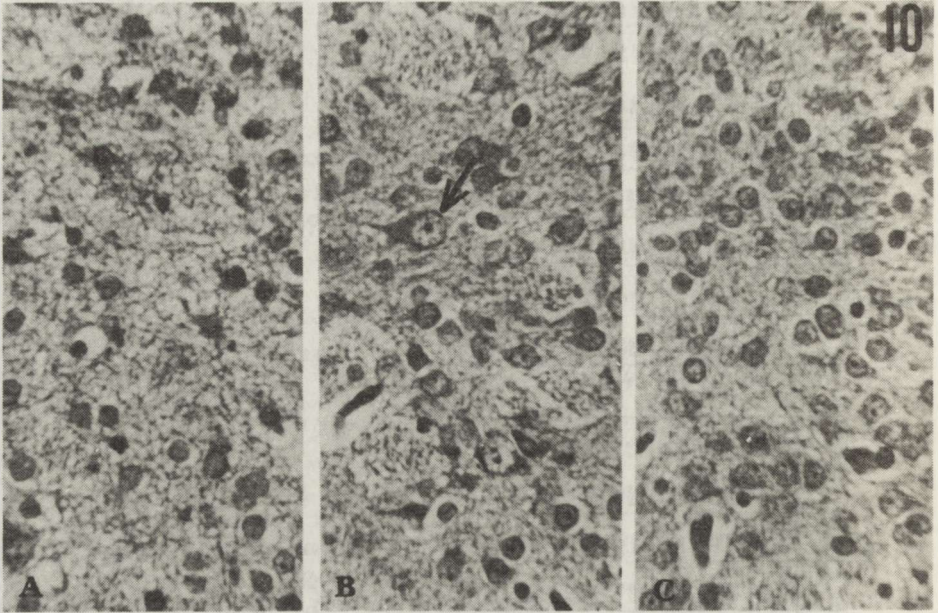
1842 - całkowita liczba neuronów/mm<sup>2</sup>  
 - total number of neurons/mm<sup>2</sup>

**Pars Caudalis**

Ryc. 9. Rozmieszczenie i liczba neuronów w części przedniej, środkowej i tylnej jądra ogoniasatego-skorupy. Każda gwiazdka oznacza jeden neuron olbrzymi

Fig. 9. Distribution and number of neurons in anterior, medial and posterior parts of caudate-putamen. Every star designates one giant neuron





Ryc. 10. Strefowe rozmieszczenie neuronów w środkowej części jądra ogoniastego-skorupy. A – strefa boczna, B – środkowa, C – przykomorowa. Strzałka oznacza neuron olbrzymi. Klüver–Barrera. Pow. 400 ×

Fig. 10. Zonal distribution of neurons in medial part of caudate-putamen. A – lateral zone, B – medial zone, C – periventricular zone. Arrow indicates giant neuron. Klüver–Barrera. × 400

		<b>dorsalis</b>								
					<b>64,7</b>	<b>63,8</b>	<b>62,8</b>			
			<b>64,6</b>	<b>64,2</b>	<b>63,0</b>	<b>65,3</b>	<b>62,8</b>	<b>62,2</b>		
		<b>64,7</b>	<b>63,0</b>	<b>62,5</b>	<b>65,3</b>	<b>62,8</b>	<b>62,8</b>	<b>61,6</b>		
<b>lateralis</b>		<b>63,5</b>	<b>65,7</b>	<b>64,2</b>	<b>62,8</b>	<b>62,9</b>	<b>62,8</b>	<b>60,9</b>		<b>para - ventricu- laris</b>
			<b>65,3</b>	<b>63,7</b>	<b>61,8</b>	<b>62,7</b>	<b>62,7</b>	<b>62,8</b>	<b>61,6</b>	
				<b>63,7</b>	<b>62,9</b>	<b>62,8</b>	<b>62,3</b>	<b>62,2</b>		
						<b>62,8</b>	<b>61,7</b>	<b>60,8</b>		
		<b>ventralis</b>								

Ryc. 11. Średnie wielkości pola powierzchni przekroju neuronów w części środkowej jądra ogoniastego-skorupy w  $\mu\text{m}^2$

Fig. 11. Average fields of neurons (in  $\mu\text{m}^2$ ) in medial part of caudate-putamen



neuronów olbrzymich jest uchwytne w ściśle wystandaryzowanych warunkach badań ilościowych również w kierunku od komór ku strefie bocznej. W strefie przyśrodkowej, najbliższej komór nie występują one wcale. Liczba ich jest największa w strefie bocznej (ryc. 9).

Oceniono również pole powierzchni przekroju komórek nerwowych w części środkowej jądra ogoniastego-skorupy. Komórki najmniejsze występują w strefie brzuszno-przyśrodkowej. Pole powierzchni przekroju tych neuronów wynosi średnio  $61,6-61,7 \mu\text{m}^2$ . Wartość ta wzrasta ku stronie grzbietowej prążkowiec do  $63,7 \mu\text{m}^2$ , a także ku stronie bocznej i wynosi  $64,1 \mu\text{m}^2$  (ryc. 11).

#### OMÓWIENIE

W *neostriatum* człowieka Brockhaus (1942), Namba (1957) oraz Tabuchi (1969) ujawnili różnice w rozmieszczeniu komórek nerwowych, a także w ich wielkości, co uzasadniało podział tej struktury na części: boczną, tylną, przyśrodkową i kilka innych mniej wyróżniających się części. Przeprowadzone przez nas badania rozkładu komórek w części przedniej, środkowej i tylnej jądra ogoniastego-skorupy z uwzględnieniem strefy przykomorowej, bocznej, grzbietowej i brzusznej również wykazały jej niejednorodność u szczura 7-dniowego. Struktura ta wykazuje zróżnicowanie strefowe pola powierzchni przekroju komórek nerwowych. W strefie przyśrodkowo-brzusznej znajdują się komórki nerwowe najmniejsze. To strefowe zróżnicowanie rozkładu gęstości komórek i ich wielkości wiąże się prawdopodobnie z kierunkiem migracji komórek namnażających się w strefie przykomorowej i wędrujących w czasie swego rozwoju w kierunku bocznym i grzbietowym. Można więc przypuszczać, że kierunek migracji komórek nerwowych małych, średnich i dużych jest odkomorowy, podczas gdy neurony olbrzymie, które występują głównie w strefie bocznej, a nie występują wcale w strefie przykomorowej, wnikają do prążkowiec od strony bocznej, tzn. od kory mózgu.

W prążkowiec szczura (Dimova i wsp. 1980), podobnie jak w prążkowiec człowieka, neurony olbrzymie występują nielicznie. Stosunek liczby neuronów olbrzymich do wszystkich komórek nerwowych określono u człowieka na 1:50 (Namba 1957; Treff 1964), 1:20 (Peele 1961), 1:270 (Tabuchi 1969), 1:102 (Bugiani 1980). Można sądzić, że duże różnice w ocenie tego wskaźnika wynikają, między innymi, z odmiennej klasyfikacji wielkości komórek nerwowych, a także z dużego zróżnicowania strefowego w obrębie prążkowiec człowieka. W naszym materiale stosunek ten wynosił w części przedniej, środkowej i tylnej prążkowiec odpowiednio 1:268, 1:147, 1:545.

Według Bugianiego i wsp. (1978, 1980) stosunek neuronów olbrzymich do reszty neuronów prążkowiec posiada pewną wartość diagnostyczną. Może on wyjaśniać patomechanizm niektórych procesów patologicznych, a także szczególności organizacji układu nigrostriatalnego. Tylko bardzo ściśle przestrzeganie standardu krojenia i oceny ilościowej pozwala na racjonalne posługiwanie się tym wskaźnikiem w normie i w warunkach patologicznych, Bugiani i wsp.



(1978, 1980) sądzą, że małe komórki nerwowe prążkowania tworzą wraz z neuronami bardzo dużymi odrębne jednostki anatomiczno-czynnościowe. Małe komórki nerwowe prążkowania otrzymują połączenia z istoty czarnej, same natomiast sięgają swymi wypustkami do neuronów bardzo dużych, które komunikują się przez szlak striatonigralny z istotą czarną. W procesie starzenia liczba wszystkich komórek nerwowych prążkowania maleje równomiernie i wartość wskaźnika nie zmienia się istotnie (Bugiani i wsp. 1978). Można sądzić, że zmianom wstecznym ulegają całe kompleksy komórek związanych z neuronami bardzo dużymi. W chorobie Parkinsona według Bugianiego i wsp. (1980) zmniejsza się liczba neuronów bardzo dużych i pozostałych komórek nerwowych, ale stosunek ich się zmienia z 1:102 na 1:148. Wskaźnik ten świadczy o szybszej redukcji liczby neuronów olbrzymich. Wobec braku nowych połączeń nerwowych, funkcja komórek, które przetrwały musi również ulec zaburzeniu. Również badania frakcji objętości struktur tkankowych i komórkowych potwierdzają istnienie różnic w obrębie prążkowania szczura. Wszelkie więc studia jakościowe i ilościowe w normie i w stanach patologicznych powinny uwzględniać te różnicowania.

Objętość istoty czarnej w prawej półkuli mózgu szczura 7-dniowego wynosi  $0,4556 \text{ mm}^3$ , przy czym część zbita zajmuje  $0,15149 \text{ mm}^3$  (33,25%) objętości istoty czarnej, część siatkowata  $0,2700 \text{ mm}^3$  (59,28%), a boczna  $0,03398 \text{ mm}^3$  (7,46%) (Węgiel i wsp. 1989). Badania morfometryczne wykazały, że komórki nerwowe zajmują 13,6% objętości części zbitej, co stanowi  $0,020602 \text{ mm}^3$ . W tym więc wieku życia szczura objętość komórek nerwowych warstwy zbitej istoty czarnej w  $1 \text{ mm}^3$  jest znikoma, jeszcze mniejsza w materiale z istoty czarnej pochodzącym od płodu. Uwzględnienie tych obserwacji przez eksperymentatorów posługujących się przeszczepami istoty czarnej może sprzyjać racjonalizacji teoretycznych podstaw eksperymentu, wyboru właściwego materiału i metod.

#### WNIOSKI

1. Badania morfometryczne składu tkankowego i komórkowego jądra ogoniastego-skorupy (części przedniej, środkowej i tylnej) szczura 7-dniowego wykazały niejednorodność tej struktury pod względem liczebności i wielkości komórek nerwowych. Zaobserwowano różnice strefowe, które powinny być uwzględnione w badaniach jakościowych i ilościowych zmian w warunkach patologicznych.

2. Różnicowanie strefowe rozkładu gęstości i wielkości komórek nerwowych prążkowania przypuszczalnie wynika z tego, że w czasie rozwoju kierunek migracji neuronów małych, średnich i dużych jest odkomorowy, podczas gdy neurony olbrzymie wnikają do prążkowania od kory mózgu.

3. Neurony olbrzymie występują ze zmienną częstością w stosunku do pozostałych neuronów prążkowania w jego przedniej, środkowej i tylnej części, co świadczy o zmiennej liczbie kompleksów tworzonych przez te komórki z innymi neuronami prążkowania.

MORPHOMETRIC EVALUATION OF TISSUE AND CELL COMPOSITION  
OF CAUDATE-PUTAMEN, PALLIDUM AND SUBSTANTIA NIGRA  
IN 7-DAY-OLD RAT

Summary

The aim of the study was the morphometric evaluation of tissue and cell composition of brain structures which are involved into transplantation in experimental model of parkinsonism in the rat — substantia nigra as the implanted structure and caudate-putamen as the host structure into which the graft is placed. Three parts of caudate-putamen (anterior, medial and posterior), three parts of substantia nigra (compact, reticular and lateral) as well as pallidum were investigated in 7-day-old rat.

It was found that the density of nerve cells is highest in medial part (2236/1 mm<sup>2</sup>), lower in anterior part (2129/1 mm<sup>2</sup>) and the lowest in posterior one (1842/1 mm<sup>2</sup>). The number of giant neurons in relation to the rest of neurons in anterior, medial and posterior parts of caudate-putamen was 1:268, 1:147 and 1:545 respectively. This indicates that the numbers of complexes formed by giant neurons with other neurons vary depending on the area of this brain structure. The zonal differences in distribution and size of neurons in caudate-putamen should be taken in account in qualitative and quantitative studies.

PIŚMIENNICTWO

1. Bottcher J.: Morphology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*, 1975, 52, suppl. 62.
2. Brockhaus H.: Zur feineren Anatomie des Septum und des Striatum. *J Psychol*, 1942, 51, 1—56.
3. Bugiani D., Salvarani S., Perdelli F., Moncardi G. L., Leonardi S.: Nerve cell loss with aging in the putamen. *Eur Neurol*, 1978, 17, 289—291.
4. Bugiani O., Perdelli S., Salvarini S., Leonardi S., Mancardi G.: Loss of striatal neurons in Parkinson's disease: a cytometric study. *Eur Neurol*, 1980, 19, 339—344.
5. Dimova R., Vuillet J., Seite R.: Study of the rat neostriatum using a combined Golgi-electron microscope technique and serial sections. *Neuroscience*, 1980, 5, 9.1581—1596.
6. Dom R., Baro F., Brucher J. M.: A cytometric study of the putamen in different types of Huntington's chorea. W: *Huntington's chorea 1872—1972*. Red: A. Barbeau. *Adv Neurol*, 1973, 1, 369—385.
7. Freund T. F., Bolam J. P., Björklund A., Stenevi V., Dunnet B., Powell J. F., Smith A. D.: Efferent synaptic connections of grafted dopaminergic neurons reinnervating the host neostriatum: a tyrosine hydroxylase immunocytochemical study. *J Neurosci*, 1985, 5, 603—616.
8. Grafova I.: The identification of striatal and pallidal neurons projecting to the substantia nigra. An experimental study by means of retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res*, 1975, 91, 286—291.
9. Hajdu F., Hassler R., Bak I. J.: Electron microscopic study of the substantia nigra and the striato-nigral projection in the rat. *Z Zellforsch*, 1973, 146, 207—221.
10. Hökfelt T., Ungerstedt U.: Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurons: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigro-striatal dopamine system. *Brain Res*, 1973, 60, 269—297.
11. Hornykiewicz O.: Topography and behaviour of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in substantia nigra of normal and Parkinsonian patients. *Wien Klin Wschr*, 1963, 75, 309—362.
12. Hornykiewicz O.: Parkinson's disease. W: *Disorders of neurohumoral transmission*. Red.: T. J. Crow. Academic Press, London, 1982, 121—143.



13. Mensah P., Deadwyler S.: The caudate nucleus of the rat: cell types and the demonstration of a commissural system. *J Anat*, 1974, 117, 2, 281–293.
14. Mori S.: Some observations on the fine structure of the corpus striatum of the rat brain. *Z Zellforsch*, 1966, 70, 461–488.
15. Namba M.: Zytoarchitektonische Untersuchungen am Striatum. *J Hirnforsch*, 1957, 3, 24–48.
16. Pasik P., Pasik T., Di Figlia M.: Quantitative aspects of neuronal organisation in the neostriatum of the Macaque monkey. W: *The basal ganglia*. Red: M. D. Yahr. Raven Press, New York, 1976, 57–90.
17. Peelle T. L.: *The neuroanatomic basis for clinical neurology*. McGraw Hill, New York, 1961, 395–430.
18. Tabuchi K.: Zytoarchitektonische Untersuchungen des Corpus striatum beim Menschen. *J Hirnforsch*, 1969, 11, 325–332.
19. Treff W. M.: Numerische und Volumenzelldichte in Caudatum mediale: mit besondere Berücksichtigung des quantitativen Auswertungsfehlers bei Zellzählung. W: *Topics in basic neurology*. Red.: A. Bergman, J. Shade. *Prog Brain Res*, Elsevier, Amsterdam, 1964, 6, 139–146.
20. Ungerstedt U.: Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiol Scand (suppl.)*, 1971, 367, 1–48.
21. Węgiel J., Medyńska E., Dziędział W., Szirkowiec-Gmurczyk W., Dymecki J.: Wpływ techniki histologicznej na objętość i masę niektórych struktur mózgu szczura we wczesnym okresie jego życia. *Neuropat Pol*. 1989, 27 (w druku).

Adres autorów: Zakład Neuropatologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

GRAŻYNA SZUMAŃSKA, ROMAN GADAMSKI,  
MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

## AKTYWNOŚĆ CYKLAZY ADENYLOWEJ W ZAKOŃCZENIACH SYNAPTYCZNYCH ODCINKA CA<sub>1</sub> ROGU AMONA U CHOMIKA MONGOLSKIEGO

Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Opracowanie technik cytochemicznych ujawniających aktywność hormonalnie zależnej cykazy adenylowej (AC) w tkankach zwierzęcych (Reik i wsp. 1970) dało początek licznym badaniom, dotyczącym jej swoistości (Howwell, Whitfield 1972; Lemay, Jarett 1975; Cutler, Cristian 1980), lokalizacji komórkowej (Schultze i wsp. 1977; Vorbrodtt i wsp. 1977, 1984; Recharadt, Härkönen 1977; Panula, Recharadt 1979; Szumańska i wsp. 1984; Recharadt, Hervonen 1986) oraz hormonalnej stymulacji (Kebabian i wsp. 1972; Recharadt, Härkönen 1977; Panula 1980; Recharadt, Hervonen 1986; Madison, Nicoll 1988). Związana z błonami komórkowymi AC, pełniąc funkcję receptora katalizuje przemianę adenylozotryjfosforanu (ATP) do cyklicznego 3', 5'-monofosforanu (cAMP), odgrywającego rolę wewnątrzkomórkowego mediatora (second messenger). Wyznacza to kluczową rolę tego enzymu w receptorowo zależnej regulacji czynności komórek (Sutherland, Rall 1960). Jego aktywność stymulowana jest przez szereg czynników, między innymi przez noradrenalinę (Huang i wsp. 1971), dopaminę (Kebabian i wsp. 1972) oraz przez forskolinę (Seamon i wsp. 1981).

Ośrodkowy układ nerwowy należy do najbogatszych w AC narządów ustroju zwierzęcego (von Hungen i wsp. 1974). Jednakże ujawnienie jej aktywności w strukturach mózgu napotyka na szereg trudności metodycznych, związanych przede wszystkim z hamującym oddziaływaniem utrwalaczy i jonów metali ciężkich stosowanych w technice mikroskopowo-elektronowej. Z tym też zapewne związane są kontrowersje w interpretacji uzyskiwanych wyników.

W ostatnich latach opracowano metody ultrahistochemiczne pozwalające na ujawnianie aktywności AC w strukturach ośrodkowego układu nerwowego. Jej obecność wykazano zarówno w synapsach i błonach włókien nerwowych (Greengard i wsp. 1972; Recharadt, Härkönen 1977), jak i w elementach sieci naczyniowej mózgu (Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodtt i wsp. 1984). Stwier-



dzono ponadto głębokie nieprawidłowości w aktywności enzymu w ścianach naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnych stanach patologicznych przebiegających z zaburzeniami mechanizmów bariery krew – mózg (Szumańska, Mossakowski 1985; Szumańska i wsp. 1988).

Wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona w warunkach niedokrwienia przodomózgowia u chomików mongolskich i szczurów (Kirino 1982; Kirino i wsp. 1984) i jego prawdopodobny związek z ekscytotoksycznym działaniem neuroprzebiegów aminokwasowych (Pulsinelli 1985; Suzuki i wsp. 1985) zwróciły uwagę na ewentualne zmiany w stanie synaps w tej części zakrętu hipokampa. Obecność nieprawidłowości w ich obrazie ultrastrukturalnym w warunkach niedokrwienia mózgu sugerują badania Mossakowskiego i wsp. (1989), poświęcone analizie dynamiki mikroskopowo-elektronowych uszkodzeń sektora CA<sub>1</sub> u chomików mongolskich. Skłoniło to do systematycznej oceny obrazu mikroskopowo-elektronowego synaps sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona, pochodzących z różnych komórek położonych w różnych warstwach tego odcinka zakrętu hipokampa. Badania dotyczyły zarówno zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym, jak i tych, u których wywoływano przemijające niedokrwienie przodomózgowia (Gajkowska i wsp. 1988, 1989). Wydawało się celowe ich uzupełnienie histochemiczną analizą aktywności synaptycznej AC tego obszaru zakrętu hipokampa. Z prac de Robertisa i wsp. (1967) wiadomo, iż AC związana jest swoiście z frakcją zakończeń nerwowych. W niniejszej pracy podjęto cytochemiczną analizę aktywności enzymu u zwierząt nie poddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dorosłych chomikach mongolskich, samcach. Reakcję cytochemiczną ujawniającą aktywność AC przeprowadzono według metody opisanej przez Recharadt i Härkönen (1977) udoskonalonej przez Recharadt i Hervonen (1985), stosując własną modyfikację medium inkubacyjnego (Szumańska i wsp. 1984).

Użyte do badań zwierzęta podzielono na dwie grupy. W grupie pierwszej chomiki mongolskie uśmiercano przez dekapitację. Mózgowia wyjmowane natychmiast z jamy czaszki, oziębiano na lodzie, zanurzano w roztworze Krebsa – Ringera z dodatkiem glukozy (K – R – G) i krojono w płaszczyźnie czołowej na bloki grubości około 2 mm. Następnie z odcinka CA<sub>1</sub> grzbietowej części zakrętu hipokampa pobierano pod kontrolą lupy prostopadłościanny obejmujące jego poszczególne warstwy. Zwierzęta grupy drugiej uśmiercano przez zastosowanie krótkotrwałej przezsercowej perfuzji roztworem K – R – G, pH 8,3. Wykonanie perfuzji miało na celu wypłukanie krwi z łożyska naczyniowego. Z mózgow zwierząt tej grupy pobierano identyczne bloki tkankowe jak w przypadku zwierząt dekapitowanych.

Preparatyka histochemiczna pobranego materiału tkankowego obejmowa-



ła trzy kolejno po sobie następujące etapy: stymulacji (preinkubacja), utrwalania i właściwej inkubacji. Preinkubację przeprowadzono (20 min w temp. pokojowej) w roztworze K-R-G, zbuforowanym do pH 8,3 z dodatkiem aktywatorów: chlorowodoru dopaminy (3 mM) bądź chlorowodoru noradrenaliny (0,1 mM) lub też forskoliny w stężeniu końcowym  $10^{-4}$ . Części bloków tkankowych nie poddawano w ogóle stymulacji przy użyciu żadnego z wyżej wymienionych aktywatorów, w celu wykazania tzw. aktywności podstawowej (basal activity). Utrwalanie przeprowadzono przez immersję bloczków tkankowych w świeżo przygotowanym roztworze 1% paraformaldehydu w K-R-G zbuforowanym do pH 8,3. Po utrwalaniu (5 min w temp. pokojowej) były one przemywane przez 30 min w trzech zmianach roztworu K-R-G, a następnie poddawane inkubacji w dwóch różnych roztworach inkubacyjnych. Precypitatem pierwszego był kobalt, a drugiego stront. W pierwszym przypadku płyn inkubacyjny zawierał: bufor Trisma, pH 8,3 – 50 mmol/l,  $MgCl_2$  – 3 mmol/l,  $CaCl_2$  – 8 mmol/l, sól sodową 5'adenylyl-imido-dwufosforanu (AMP-PNP) – 0,5 mmol/l, teofilinę 10 mmol/l i  $Co(NO_3)_2$  – 3 mmol/l. Roztwór inkubacyjny był przezroczysty i zabarwiony lekko różowo. W przypadku drugim płyn inkubacyjny zawierał te same składniki, poza azotanem kobaltu, który zastąpiono chlorkiem strontu ( $SrCl_2 \cdot 6 H_2O$ ) – 10 mmol/l. Był on następnie przekształcany pod wpływem octanu ołowiu w widoczny w obrazie mikroskopowo-elektronowym fosforan ołowiu. Końcowe pH obu płynów inkubacyjnych doprowadzono do 8,5–8,8, a inkubację prowadzono w temperaturze pokojowej przez 60 do 120 min. Kontrole swoistości odczynu histochemicznego wykonywano inkubując materiał bez substratu i bez aktywatorów oraz stosując  $\beta$ -glicerofosforan sodu zamiast właściwego substratu (AMP-PNP). Po inkubacji, bloczki tkankowe płukano, utrwalano w 1% czterotlenku osmu, odwadniano w roztworach etanolu o wzrastającym stężeniu i tlenku propylenu oraz zatapiano w Eponie. Z bloczków tkankowych zatopionych w Eponie skrawano skrawki półcienkie i barwiono je błękitem toluidyny. Przy użyciu mikroskopu świetlnego określano w nich poszczególne warstwy zakrętu hipokampa i według nich odpowiednio trymowano bloczki tkankowe. Uzyskano w ten sposób skrawki ultracienkie pochodzące z 5 kolejnych warstw hipokampa, tj.: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiale*, *stratum lacunosum-moleculare* i *stratum moleculare*. Skrawki nakładano na siatki, kontrastowano w roztworze octanu uranylu lub nie podbarwiano w ogóle. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym Joel 100 C.

#### WYNIKI

Obserwacje bogatego materiału wykorzystanego do badań wskazują, że aktywność AC ograniczona jest do struktur neuropilu, przede wszystkim do błon dendrytów i zakończeń aksonalnych tworzących kolbki synaptyczne. Synaptyczna lokalizacja AC nie wykazuje różnic w poszczególnych warstwach



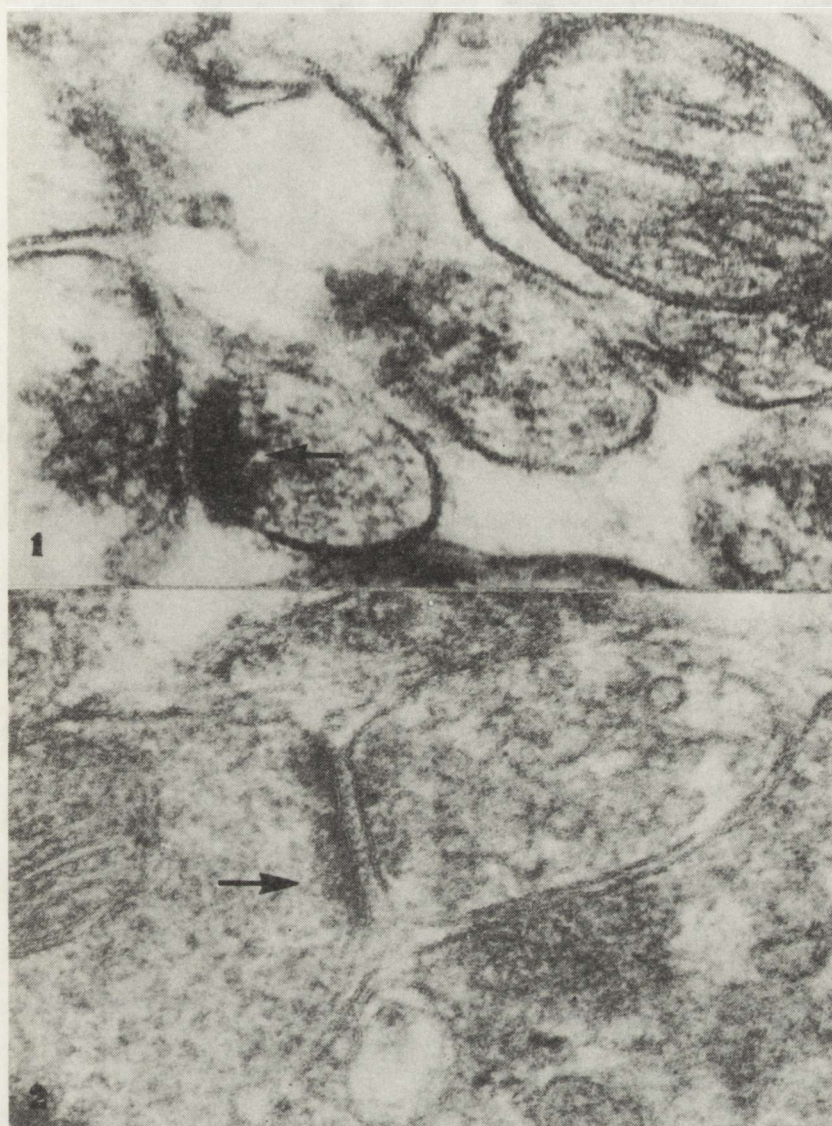
sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona. Nagromadzenie produktu końcowego reakcji enzymatycznej i jego rozmieszczenie nie wiąże się również z morfologiczną strukturą synaps. Jest ono identyczne w synapsach symetrycznych i asymetrycznych. Intensywność odczynu oraz jego cytologiczna lokalizacja w złączu synaptycznym wykazuje natomiast wyraźną zależność od zastosowanego aktywatora reakcji histochemicznej, a także w pewnym stopniu od rodzaju metalu (stront *versus* kobalt) użytego w adaptacji techniki histochemicznej do celów mikroskopii elektronowej.

Dopaminozależna AC ujawniana przy zastosowaniu azotanu kobaltu, wykazuje linijne rozmieszczenie aktywności w obszarze postsynaptycznym licznych, różnej wielkości styków synaptycznych, występujących we wszystkich pięciu warstwach zakrętu hipokampa (ryc. 1). Dendryty z zaznaczoną błonową aktywnością enzymu związane są ściśle z zakończeniami aksonalnymi. Na charakter aktywności nie wpływa różnorodność morfologiczna pęcherzyków synaptycznych zawartych w zakończeniach aksonalnych, ani zróżnicowanie ich ilości i rozmieszczenia (pęcherzyki okrągłe i spłaszczone, rozproszone lub groniasto zagęszczone w pobliżu błony presynaptycznej). Morfologicznie różnorodne synapsy charakteryzują się wspólnym wzorcem obrazu histochemicznego, wyrażającym się silną aktywnością enzymatyczną w błonach postsynaptycznych i w ich otoczeniu. Zwraca uwagę fakt, że znaczny odsetek synaps nie wykazuje w ogóle reakcji histochemicznej lub jedynie śladową. Mitochondria nie zawierają produktów odczynu histochemicznego, co stanowi zresztą jedno z kryteriów jego swoistości (ryc. 1, 2).

W materiale, w którym dla ujawnienia AC zamiast kobaltu stosowano chlorek strontu, stwierdzano, że stymulowana dopaminą aktywność enzymu występuje nie tylko w obszarze postsynaptycznym lecz również w błonie presynaptycznej oraz w szczelinie synaptycznej. W tym przypadku obok błonowej lokalizacji enzymu spotyka się jego aktywność wewnątrzkomórkową. Wypustki komórek nerwowych, przede wszystkim dendryty, zawierają różnej wielkości ziarnistości produktu reakcji enzymatycznej, nie związane z żadnymi upostaciowanymi strukturami cytoplazmatycznymi (ryc. 3). Przy zastosowaniu tej techniki histochemicznej obserwuje się niekiedy aktywność AC w błonach podstawnych i w mięśniówce drobnych naczyń krwionośnych.

W przypadku AC, stymulowanej przez noradrenalinę i ujawnianej przy użyciu zarówno jonów kobaltu, jak i strontu, produkt reakcji enzymatycznej gromadzi się wyłącznie w postsynaptycznych błonach synaps. Nie spotyka się go nigdy w błonach presynaptycznych. Jednakże stwierdza się tu często obrazy, w których końcowy produkt odczynu widoczny jest w postaci elektro-nowo-gęstych ziarnistości związanych z błonami dużych wypustek nerwowych poza miejscami styków synaptycznych (ryc. 4). Ogólnie można stwierdzić, że noradrenalina bardziej niż dopamina stymuluje aktywność AC zlokalizowaną w błonach wypustek komórek nerwowych poza obszarami synaptycznymi, w neuropilu wszystkich warstw kory amonalnej. Zastosowanie związków strontu dla ujawnienia w obrazach mikroskopowo-elektronowych aktywności





Ryc. 1. *Stratum oriens*. Aktywność cyklazy adenylowej (AC) widoczna w błonie postsynaptycznej (strzałka). Mitochondria bez odczynu. Stymulacja dopaminą. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 60000 ×

Fig. 1. *Stratum oriens*. Electron microscopic demonstration of dopamine-stimulated adenylate cyclase (AC) activity in the postsynaptic membrane (arrow). No reaction in mitochondrium. Cobalt method. × 60000

Ryc. 2. *Stratum radiatum*. Aktywność dopaminozależnej AC w obszarze postsynaptycznym (strzałka). Skrawek nie podbarwiany. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 50000 ×

Fig. 2. *Stratum radiatum*. Electron microscopic demonstration of dopamine-stimulated AC in the postsynaptic thickening (arrow). No poststaining. Cobalt method. × 50000



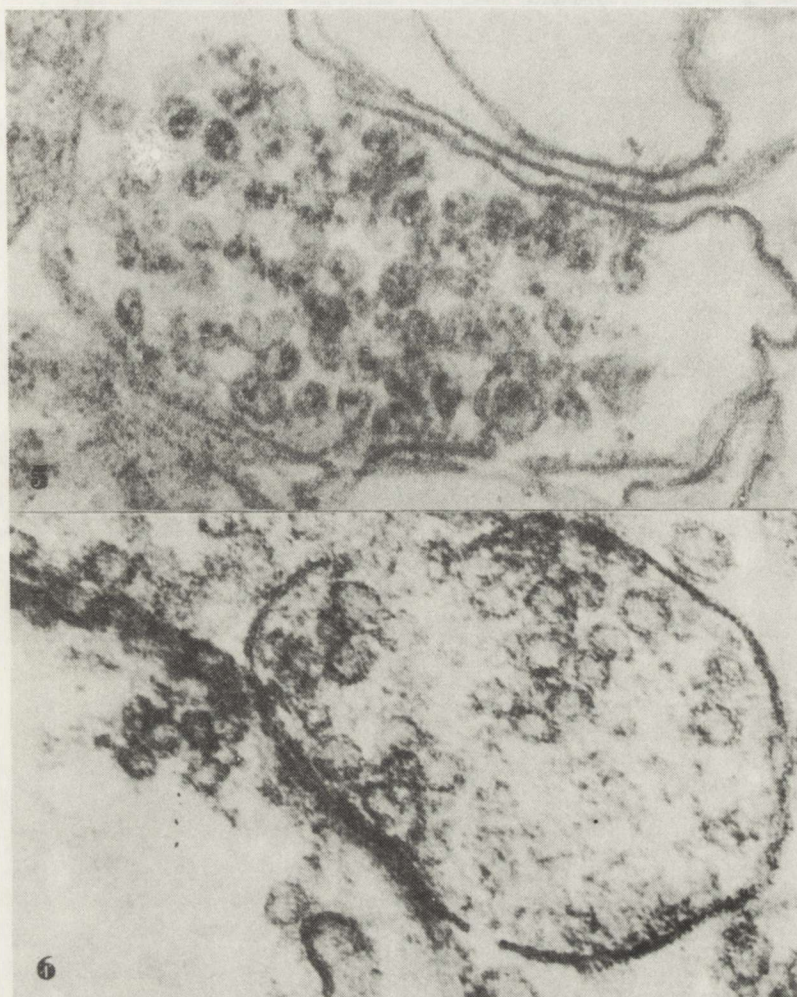


Ryc. 3. *Stratum lacunosum-moleculare*. Nierównomiernie rozłożona, silna aktywność cytoplazmatycznej AC w dendrycie. Stymulacja dopamina. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 30000 ×

Fig. 3. *Stratum lacunosum-moleculare*. Electron microscopic demonstration of dopamine stimulated AC. Strong irregularly distributed reaction product in dendrite. Stront method. × 30000

Ryc. 4. *Stratum pyramidale*. Noradrenalinozależna AC. Produkt reakcji w postaci ciemnych zagęszczeń skupionych na błonie włókna nerwowego (strzałki). Widoczne zakończenie aksonu (Ax) z pęcherzykami synaptycznymi pozbawionymi aktywności enzymatycznej. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 40000 ×

Fig. 4. *Stratum pyramidale*. Electron microscopic demonstration of norepinephrine-stimulated AC. Only scanty stront precipitates (arrow) are seen on the nerve fiber membranes. Axon terminal (Ax) contains synaptic vesicles without enzyme activity. Stront method. × 40000



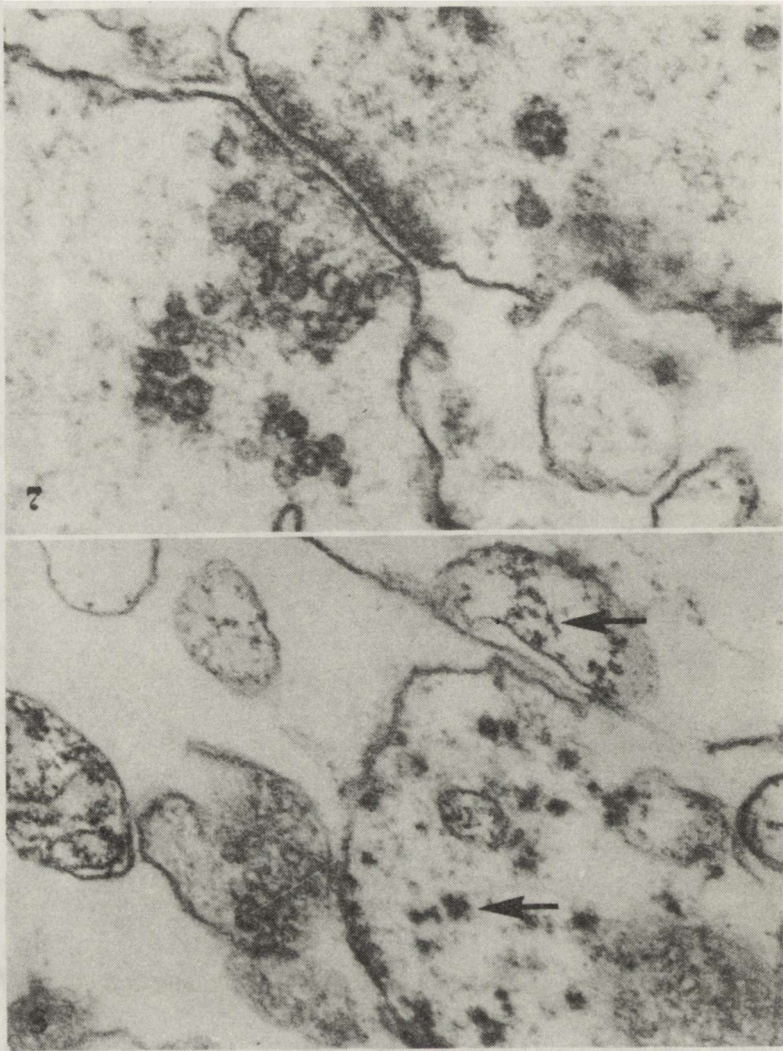
Ryc. 5. *Stratum moleculare*. Aktywność AC w pęcherzykach synaptycznych. Stymulacja noradrenalina. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 100000 ×

Fig. 5. *Stratum moleculare*. Norepinephrine-stimulated AC activity in synaptic vesicles. Stront method. ×100000

Ryc. 6. *Stratum oriens*. Związana z błonami synaptycznymi, forskolinozależna AC skupiona głównie w obszarze postsynaptycznym. Płyn inkubacyjny II (stront). Pow. 60000 ×

Fig. 6. *Stratum oriens*. Electron microscopic demonstration of forskolin-stimulated AC activity is present in the postsynaptic region. Stront method. ×60000





Ryc. 7. *Stratum pyramidale*. Kolbka synaptyczna. Forskolinozależna AC zlokalizowana w błonie synaptycznej oraz w pęcherzykach synaptycznych. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 40000 ×

Fig. 7. *Stratum pyramidale*. Electron microscopic demonstration of synaptic cleft. Forscolin-stimulated AC activity is localized in the postsynaptic membranes and synaptic vesicles. Cobalt method. ×40000

Ryc. 8. *Stratum moleculare*. Inkubacja bez aktywatora (basal activity). Aktywność AC w postaci ziarnistości rozmieszczonych w cytoplazmie dyndrytów (strzałka). W obu błonach synapsy nie stwierdza się aktywności enzymatycznej. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 60000 ×

Fig. 8. *Stratum moleculare*. Electron microscopic demonstration of basal activity of AC in the form of dark precipitations in the dendrite cytoplasm (arrow). Synaptic membranes are non reactive. Cobalt method. ×60000





Ryc. 9. *Stratum pyramidale*. Kontrola odczynu histochemicznego. Inkubacja bez substratu. Brak reakcji histochemicznej w strukturach neuropilu. Płyn inkubacyjny I (kobalt). Pow. 40000 ×

Fig. 9. *Stratum pyramidale*. Control of histochemical reaction. Incubation without substrate. No reaction products in the neuropil. Cobalt method. ×40000

noradrenalinozależnej AC prowadzi niekiedy do nagromadzenia ziarnistych złogów produktu końcowego reakcji w pęcherzykach synaptycznych (ryc. 5), zjawiska nie spotykanego przy aktywacji dopaminą. Nie można jednakże wykluczyć nieswoistości tego procesu, podobnie jak w przypadku odczynu ujawnianego niekiedy w zmienionych mitochondriach i lizosomach. Przy zastosowaniu noradrenaliny jako aktywatora enzymu nie stwierdzano wykładników jego aktywności w elementach strukturalnych ścian naczyń.

Forskolina, trzeci z zastosowanych stymulatorów AC, powoduje słabszą niż dopamina i noradrenalina aktywację odczynu histochemicznego. Przy użyciu soli obu metali ciężkich końcowy produkt reakcji enzymatycznej wiąże się ze strukturami błonowymi synaps (ryc. 6), głównie z błoną postsynaptyczną (ryc. 7), widoczny jest jednak również i w błonach presynaptycznych. Intensywność odczynu cytochemicznego przy zastosowaniu forskoliny w obszarze postsynaptycznym jest ogólnie słabsza niż przy zastosowaniu stymulacji tak dopaminą, jak i noradrenalina. Przy użyciu strontu w reakcji stymulowanej forskoliną, drobne ziarnistości produktu końcowego reakcji gromadzą się również w niektórych mitochondriach dendrytów zawartych w neuropilu. Elementy strukturalne ścian naczyń krwionośnych nie wykazują aktywności enzymatycznej.

W materiale tkankowym przygotowanym do badań mikroskopowo-elektronowych bez preinkubacji w którymkolwiek ze stosowanych stymulatorów AC, ukierunkowanym na ujawnienie jej tzw. aktywności podstawowej (basal activity) stwierdza się nagromadzenie elektronowo-gęstych ziarnistości produ-



ktu końcowego reakcji luźno rozsianych w cytoplazmie pojedynczych wypustek nerwowych (ryc. 8). Intensywność odczynu jest jednak znacznie słabsza niż w przypadku dopaminozależnej AC występującej w tej samej lokalizacji komórkowej. Aktywność podstawowa enzymu nie występuje natomiast w obszarze styków synaptycznych.

Swoistość odczynu histochemicznego potwierdzają obrazy wykazujące brak aktywności AC przy przeprowadzaniu reakcji bez swoistego substratu lub przy jego zastąpieniu  $\beta$ -glicerofosforanem (ryc. 9).

#### OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowana metoda cytochemicznego wykrywania aktywności synaptycznej AC pozwala na stosunkowo precyzyjną jej lokalizację w poszczególnych elementach strukturalnych odcinka  $CA_1$  zakrętu hipokampa, wyróżniającego się szczególnym bogactwem połączeń synaptycznych i ich zróżnicowaniem strukturalnym, a także różnorodnością źródeł komórkowych. Na podkreślenie zasługują również odmienności czynnościowe, wyrażające się bogactwem układów neurotransmitterowych występujących w tym właśnie obszarze ośrodkowego układu nerwowego (Wieraszo, 1983).

Istotne trudności w interpretacji obrazów ultracytochemicznych związane są ze źle zachowaną strukturą tkanki, co stanowi następstwo skomplikowanej, długotrwałej i wieloetapowej obróbki materiału. Szczególnie istotnym etapem procedury histochemicznej jest stymulacja aktywności AC przez tkankowo swoiste hormony lub neurotransmitery (Kebabian i wsp. 1972; Schultze i wsp. 1977; Rechartt, Härkönen 1977; Panula, Rechartt 1979; Rechartt, Hervonen 1986). Jej niezbędność wynika przede wszystkim z faktu bardzo znacznego, nierzadko całkowitego hamowania aktywności enzymu przez substancje utrwalające oraz sole metali ciężkich, stosowane w preparatyce histochemicznej i mikroskopowo-elektronowej. Mechanizm stymulującego działania poszczególnych aktywatorów jest odmienny. Naturalnymi aktywatorami enzymu są zastosowane w naszych badaniach neurotransmitery dopamina i noradrenalina. Z wczesnych prac Sutherlanda i Ralla (1960) oraz Reika i współautorów (1970) wiadomo, iż przekaźniki te uwalniane z kolbki synaptycznej wnikają do szczeliny synaptycznej i wiążą się z receptorem położonym w błonie postsynaptycznej, którym jest właśnie AC, aktywująca proces tworzenia cyklicznego AMP/cAMP z wysokoenergetycznego ATP. Wyizolowany w 1981 r. przez Seamona i wsp. dwuterpen-forskolina oddziałuje bezpośrednio na kompleks enzymatyczny AC, złożony z podjednostki katalizującej i wiążącej nukleotydy guanylowy.

Porównanie obrazów histochemicznych uzyskanych przy zastosowaniu trzech aktywatorów aktywności mózgowej AC pozwoliło na ocenę ich wpływu na intensywność odczynu oraz jego rozmieszczenie w kolbkach synaptycznych, dendrytach, wypustkach osiowych i innych elementach neuropilu. Obrazy



uzyskiwane przy zastosowaniu poszczególnych aktywatorów różnią się między sobą, nie na tyle jednak, aby niemożliwe było określenie ich wspólnego wzorca. Ogólny histochemiczny obraz aktywności enzymu jest jednak wypadkową obrazów uzyskiwanych przy użyciu różnych aktywatorów. Na ich podstawie należy stwierdzić, iż aktywność AC w badanym odcinku zakrętu hipokampa jest ograniczona do wyżej wymienionych elementów strukturalnych neuropilu. Nie wykazano natomiast jej obecności w perykarionach komórek nerwowych, w komórkach glejowych ani też w śródbłonkach naczyń krwionośnych. Jedynie dopaminozależna AC wykazywała nieznaczną aktywność w błonach podstawnych i w mięśniówce stosunkowo nielicznych naczyń.

Nie wykazano różnic w intensywności ani w rozmieszczeniu aktywności AC w synapsach zlokalizowanych w różnych warstwach zakrętu hipokampa. Zasluguje to tym bardziej na uwagę, iż w poszczególnych warstwach sektora CA<sub>1</sub> rozmieszczone są synapsy pochodzące z odmiennych źródeł komórkowych i zawierające różne neuroprzekaźniki (Andersen i wsp. 1963, 1966). Podobnie nie znalazły odzwierciedlenia w obrazie aktywności enzymu różnice w strukturze morfologicznej synaps. Jednakowe jego rozmieszczenie i identyczna intensywność dotyczyły synaps symetrycznych i asymetrycznych. Według do dziś akceptowanej koncepcji Graya (1969) synapsy symetryczne, określane mianem synaps typu I, odpowiadają synapsom pobudzającym, podczas gdy asymetryczne, zaliczane do typu II, stanowią synapsy hamujące. W tym kontekście uznać należy, iż czynnościowe zróżnicowanie synaps w sektorze CA<sub>1</sub> rogu Amona nie jest związane z odmiennościami histochemicznymi obrazu aktywności AC. Porównanie obrazów uzyskanych w naszych badaniach przy zastosowaniu wszystkich stymulatorów aktywności enzymu, ze spostrzeżeniami Rechardt i Härkönen (1977) oraz Panula i Rechardt (1979) może wskazywać, iż aktywność AC w mózgu chomika mongolskiego jest ogólnie słabsza niż w ośrodkowym układzie nerwowym szczurów. Podobne różnice międzygatunkowe stwierdzono już uprzednio, wykazując wyższą aktywność enzymu w sieci naczyniowej mózgu szczura niż myszy (Vorbrodt i wsp. 1984). Nie można wykluczyć, że różnice te wskazują na gatunkową swoistość enzymu.

Wykazana w naszych badaniach dopamino-, noradrenalino- i forskolinozależna AC związana była przede wszystkim z błonami postsynaptycznymi, a w mniejszym stopniu z błonami dendrytycznymi poza obszarami zespołów synaptycznych. Zgodne jest to z wcześniejszymi spostrzeżeniami innych autorów. Rechardt i Hervonen (1986) wykazali, że AC związana z neurotransmisją zlokalizowana jest postsynaptycznie. Greengard i wsp. (1972) stwierdzili, że aktywność AC występuje w synapsach zawierających receptory dopaminowe (w jądrze ogoniastym) i noradrenalinowe (w korze mózgu).

Mniej jednoznaczna, a interpretacyjnie trudniejsza jest sprawa presynaptycznej lokalizacji aktywności AC, spostrzeganej przez nas przy stymulacji enzymu zarówno dopaminą, jak i forskoliną. Analiza własnego materiału wskazuje, że występowała ona głównie wówczas, gdy dla uwidocznienia



końcowego produktu reakcji enzymatycznej stosowano jony strontu. Szereg autorów, w tym Lemay i Jarett (1975) oraz Schultze i wsp. (1977), kwestionowało zasadność używania soli ołowiu oraz strontu w histochemii AC ze względu na ich hamujące oddziaływanie na aktywność enzymu oraz możliwość związanej z tym jej nieswoistej lokalizacji. Większość autorów prowadzących histochemiczne badania nad aktywnością AC w ośrodkowym układzie nerwowym przy zastosowaniu soli strontu (Schultze i wsp. 1977; Vorbrodt 1977; Cutler 1983), strontu i kobaltu (Recharadt, Härkönen 1977; Szumańska i wsp. 1984; Vorbrodt i wsp. 1984) lub cezu (Recharadt, Hervonen 1985, 1986) zgadza się, iż nie ma uniwersalnej jednej metody dla ujawnienia bardzo obfitej zawartości enzymu w tkance nerwowej. Niezbędne jest dla celów porównawczych równoległe stosowanie kilku metod. Recharadt i Hervonen (1986) przypuszczają, iż presynaptyczna lokalizacja aktywności AC stwierdzana przez nich przy stymulacji enzymu przez toksynę cholery mogła być uwarunkowana zjawiskiem „feedback” receptorów neurotransmiterowych, bądź też czynnościowo modulowana przez kompleksy synaptyczne, zawierające zespolenia akso-aksonalne. Nie można wykluczyć takiej możliwości i w naszym materiale.

Na odrębną uwagę zasługuje stosunkowo duży odsetek nieaktywnych synaps, spostrzeganych w naszym materiale. Być może jest to zjawisko związane z ich stanem czynnościowym. Nie można jednakże wykluczyć hamującego wpływu soli metali ciężkich stosowanych w preparatyce histochemicznej.

Podstawowa aktywność (basal activity) AC w naszym materiale związana była wyłącznie z wypustkami dendrytycznymi i nie występowała w miejscach styków synaptycznych. Podobnie Panula i Recharadt (1979) wykazali, iż w neostriatum szczurów niestymulowana aktywność AC występowała w dendrytach bez związku z zakończeniami synaptycznymi.

Czynnikiem obniżającym w sposób istotny jakość obrazów morfologicznych w przedstawionym przez nas materiale było stosowanie perfuzji roztworem K-R-G, mającej na celu wypłukanie krwi z łożyska naczyniowego mózgu. Wykonywanie tego zabiegu, zalecanego przez Recharadt (1988) uwarunkowane jest tym, iż wysoka aktywność endogennej peroksydazy zawartej w morfotycznych elementach krwi silnie hamuje aktywność synaptycznej AC. Ograniczenie zastosowania katalazy (wybiórczego inhibitora endogennej peroksydazy) zastąpiono perfuzją układu naczyniowego, traktowaną jako *sui generis* kontrola swoistości odczynu histochemicznego. Porównanie obrazów uzyskiwanych z materiału zwierząt perfundowanych i dekapitowanych, nie wykazywało jednakże uchwytnych różnic w intensywności i rozmieszczeniu reakcji.

Pomimo przedstawionych powyżej ograniczeń metodycznych i interpretacyjnych wydaje się, iż badanie aktywności AC w odcinku CA<sub>1</sub> zakrętu hipokampa w warunkach niedokrwienia, będzie mogło stanowić istotny element w ocenie mechanizmów patogenetycznych wybiórczego uszkodzenia komórek nerwowych w tej strukturze mózgu.



ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON ADENYLATE CYCLASE (AC) ACTIVITY  
IN THE CA<sub>1</sub> SECTOR OF AMMON'S HORN IN MONGOLIAN GERBIL

## Summary

Adenylate cyclase activity, stimulated by dopamine, norepinephrine and forskolin, was demonstrated histochemically in electron microscopy of the CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn in Mongolian gerbil. Cobalt and stront were used as precipitating agents. The reaction product located in the synapses was mostly associated with the postsynaptic membranes. It was also present in the plasma membrane of some nerve fibers. There were no differences in the enzyme activity in particular layers of Ammon's horn as well as between symmetric and asymmetric types of synapses. The intensity of the reaction product depended mostly on the stimulator used.

## PIŚMIENNICTWO

1. Andersen A., Blachstad B., Lømo 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 Y.: Recurrent inhibition in the hippocampus with identification of the inhibitory cell and its synapses. *Nature*, 1963, 198, 540–542.
3. Cutler L. S., Cristian C. P.: Cytochemical localization of adenylate cyclase. *J Histochem Cytochem*, 1980, 28, 62–65.
4. Cutler L. S.: Cytochemical methods for the localization of adenylate cyclase. *J Histochem Cytochem*, 1983, 31, 85–93.
5. De Robertis E., Arnair G. R. D. L., Alberici M., Butcher R. W., Sutherland E. W.: Subcellular distribution of adenyl cyclase and cyclic phosphodiesterase in rat brain cortex. *J Biol Chem*, 1967, 242, 3487–3493.
6. Gajkowska B., Gadamski R., Wawrzyniak E.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na zmiany w ultrastrukturze zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część I. Ultrastrukturalna charakterystyka odcinka CA<sub>1</sub> rogu Amona ze szczególnym uwzględnieniem obrazu połączeń synaptycznych. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 455–476.
7. Gajkowska B., Gadamski R., Mossakowski M. J.: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomika mongolskiego. II. Rola synaps w regulacji poniedokrwiennych procesów patologicznych. *Neuropat Pol*, 1989, 27, 339–366.
8. Gray E. G.: Electron microscopy of excitatory and inhibitory synapses. A brief review. W: *Mechanism of synaptic transmission*. Red.: K. Akert, P. G. Wasser. *Progr Brain Res*, Elsevier, Amsterdam, 1969, 31, 141–172.
9. Greengard P., McAfee D. A., Keibian J. W.: On the mechanism of action of cyclic AMP and its role in synaptic transmission. W: *Advances in cyclic nucleotide research*. Red.: P. Greengard, G. A. Robinson. Raven Press, New York, 1972, vol. 1, pp 355–373.
10. Huang M., Shimizu J., Daly J.: Regulation of adenosine cyclic 3-, 5-phosphate formation in cerebral cortical slices. *Mol Pharmacol*, 1971, 7, 155–162.
11. Hoowell S. L., Whitfield M.: Cytochemical localization of adenylate cyclase activity in rat islets of Langergans. *J Histochem Cytochem*, 1972, 20, 873–879.
12. Keibian J. W., Petzold G. L., Greengard P.: Dopamine – sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the “dopamine receptor”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69, 2145–2149.
13. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982, 239, 57–69.
14. Kirino T., Tamura A., Sano K.: Delayed neuronal death in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 64, 139–147.
15. Lemay A., Jarett L.: Pitfalls in the use of lead nitrate for the histochemical demonstration of adenylate cyclase activity. *J Cell Biol*, 1975, 65, 39–50.



16. Madison D. V., Nicoll R. A.: Norepinephrine decreases synaptic inhibition in the rat hippocampus. *Brain*, 1988, 442, 131–138.
17. Mossakowski M. J., Gajkowska B., Tsitsishvili A.: Ultrastructure of neurons from the CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn in short-term cerebral ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat Pol*, 1989, 27, 39–53.
18. Panula P., Rechart L.: Ultrastructural demonstration of adenylate cyclase activity in the rat neostriatum. *Neurosciences*, 1979, 4, 779–788.
19. Panula P.: Light and electron microscopical and histochemical study on the rat neostriatum *in vivo* and *in vitro*. Academic dissertation, Medical Faculty of the University of Helsinki, 1980.
20. Pulsinelli W. A.: Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 29–37.
21. Rechart L., Härkönen M.: Electron microscopical demonstration of adenylate cyclase activity in nervous tissue. *Histochemistry*, 1977, 51, 113–119.
22. Rechart L., Hervonen L.: Cytochemical demonstration of adenylate cyclase activity with cesium. *Histochemistry*, 1985, 82, 501–505.
23. Rechart L., Hervonen H.: Histochemical localization of adenylate cyclase in nervous tissue. W: *Neurohistochemistry: Modern methods and applications*, Alan R Liss Inc, 1986, 443–452.
24. Rechart L.: 1988 – konsultacja.
25. Reik L., Petzold G. L., Higgins J. A., Greengard P., Barnett R. J.: Hormone sensitive adenyl cyclase: cytochemical localization in the rat liver, *Science*, 1970, 168, 382–384.
26. Schultze W., Hinterberg W., Krause E. G., Janiszewski S.: Problems of the cytochemical demonstration of adenylate cyclase. *Acta Histochem Cytochem*, 1977, 10, 371–378.
27. Seamon K. B., Padgett W., Daly J. W.: Forskoline: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 78, 3363.
28. Sutherland E. W., Rall T. W.: Relation of adenosine-3'-5'-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones. *Pharmacol Rev*, 1960, 12, 265.
29. Suzuki R., Yamaguchi T., Inaba V., Wagner H. G.: Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res*, 1985, 63, 59–68.
30. Szumańska G., Palkama A., Lehtosalo J. I., Uusitalo H.: Adenylate cyclase in the microvessels of the rat brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 62, 219–224.
31. Szumańska G., Mossakowski M. J.: Aktywność cyklazy adenylowej i fosfatazy zasadowej w naczyniach mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganowym. *Neuropat Pol*, 1985, 23, 297–314.
32. Szumańska G., Mossakowski M. J., Januszewski S.: Zmiany aktywności fosfatazy zasadowej i cyklazy adenylowej w sieci naczyniowej mózgu w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 335.
33. Von Hungen K., Roberts S., Hill D. F.: Development and regional variations in neurotransmitter sensitive adenylate cyclase system in cell-free preparations from rat brain. *J Neurochem*, 1974, 22, 811–819.
34. Vorbrod A., Szumańska G., Dobrogowska D. H.: Cytochemical studies of adenylate cyclase in the choroid plexus and brain vessels of rat and mouse. *J Histochem Cytochem*, 1984, 32, 275–284.
35. Vorbrod A., Knowiński M., Solter D., Koprowski H.: Ultrastructural cytochemistry of membrane-bound phosphatases in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, 1977, 55, 117–134.
36. Wieraszkowski 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 1983, s. 4–12.

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

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI, WOJCIECH HILGIER

## EICOSANOIDS IN RAT BRAIN AND PLASMA AFTER RESUSCITATION FROM CLINICAL DEATH

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

There has been increased interest in the role of arachidonic acid metabolites in cerebral ischemia. Since prostaglandins (PG's), thromboxanes (Tx's) and leukotrienes are not stored in mammalian tissues, the rate-limiting step for their synthesis is the release of arachidonic acid from membrane phospholipids through the activation of phospholipase A<sub>2</sub> (Wolfe 1982). The recent results indicate that arachidonic acid is predominantly liberated from inositol-containing phospholipids by phospholipase C, and by the diglyceride lipase and monoglyceride lipase system rather than from phosphatidylcholine or phosphatidylethanolamine by phospholipase A<sub>2</sub> during the early period of ischemia (Abe et al. 1987). Cerebral ischemia in gerbils produces increased brain content of free arachidonate (Rehncrona et al. 1982; Abe et al. 1987), but only small changes occur in the level of brain PG's because depletion of tissue oxygen limits arachidonic acid conversion to PG endoperoxides by cyclo-oxygenase, a step requiring molecular oxygen (Lands 1979; Gaudet et al. 1980). In the postischemic period during reperfusion a large accumulation of arachidonic acid metabolites in the brain was observed (Gaudet, Levine 1979; Gaudet et al. 1980; Kempinski et al. 1987; Minamisawa et al. 1988). Re-establishment of cerebral blood flow (CBF) restores tissue oxygen and permits the conversion of arachidonic acid to PG's and leukotrienes. Some of these products are deleterious for recovery from cerebral ischemia by alteration of CBF, vascular permeability and modulation of excitatory or inhibitory transmitter effects (Pickard, Walker 1984). The use of cyclo-oxygenase inhibitor indomethacin (Mossakowski, Gadamski 1987) and PGI<sub>2</sub> (Pluta 1986; Mossakowski, Gadamski 1987) have been shown to have protective effect on gerbil CA<sub>1</sub> hippocampal histologic damage and recovery of bioelectric activity after complete brain ischemia in rabbit. Treatment of cerebral ischemia with calcium channel blockers in rats and patients has been shown to have more diverse results (Grotta et al. 1988; Vinge et al. 1988).

The aim of the present study was to examine the effect of clinical death and recovery after resuscitation on the levels of PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub> and TxB<sub>2</sub> in the rat brain and plasma.



## MATERIAL AND METHODS

To avoid circadian rhythm on PG's level especially  $\text{PGF}_{2a}$  (Granström 1978) we used adult male Wistar rats weighing 170–180 g. Under ether anesthesia a 5 min clinical death was induced by intrathoracic compression of the cardiac vessels bundle at the base of the heart with hook-like device without major surgery (Korpachev et al. 1982). Cardio-pulmonary resuscitation was performed by external cardiac massage and artificial ventilation. Arrest of circulation and recovery from clinical death was confirmed previously by means of physiological methods including ECG, EEG and CBF (Korpachev et al. 1982; Kapuściński 1987). Morphological abnormalities in the brain after 10 and 15 min clinical death with different survival periods – up to 6 months using this experimental model have been also described (Mossakowski et al. 1986; Zelman, Mossakowski 1988).

Animals were sacrificed in groups of four at the end of ischemia and 5, 15, 30 and 60 min after resuscitation. Four rats served as a control group in which under ether anesthesia the sham-operation was performed.

Preparation of plasma samples was according to McCalden et al. (1984). Briefly, blood was drawn from the right ventricle into polyethylene tubes coated with EDTA (275 mg/50 ml) and acetylsalicylic acid (10 mg/50 ml), plasma separated by centrifugation in  $4^{\circ}\text{C}$  (5000 g, 5 min) and immediately frozen in liquid nitrogen. After all experiments had been performed the plasma samples were thawed and extracted twice into acidified diethyl anhydrous ether. The organic solvent was evaporated under stream of nitrogen and the residue dissolved in 0.05 M Tris buffer (pH 7.4) containing 0.1% gelatin. Samples were stored in  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysed.

Preparation of brain samples was according to Gaudet and Levine (1979) with our modification. Briefly, the brains including the brain stem were removed in less than 30 sec and frozen in liquid nitrogen. Each brain was weighted and then homogenized in 4 ml of cold 100% ethanol using a Teflon homogenizer (the tissue was not permitted to thaw before homogenization). The samples were centrifuged (10,000 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min) and the supernatant dried under a nitrogen stream. After reconstitution to 2 ml of Tris buffer (0.05 M, pH 7.4) and acidification 1N HCL to pH 3.1, each sample was extracted twice with anhydrous ether. The organic phase was separated, dried under nitrogen and redissolved in 2 ml Tris buffer (pH 7.4), containing 0.1% gelatin. The sample were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

The sensitive and specific  $^3\text{H}$  kits were used for radioimmunoassay (RIA) of  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2a}$  and  $\text{TxB}_2$  (Amersham). RIA of three eicosanoids was performed in the same tissue samples with the sensitivity over the range 3–300 pg/tube. Labelled standard of each compound (about 1500 cpm) was added to plasma samples before extraction and to the brain homogenates to calculate recovery which was consistently between 45 and 75%. The RIA was performed according to Amerham's assay system protocols for each compound. The

crossreactivity of the systems were the following: PGD<sub>2</sub> 100%, PGJ<sub>2</sub> 7%, other compounds below 1%; PGF<sub>2a</sub> 100%, PGD<sub>2</sub> 2.74%, 6-Keto-PGF<sub>1a</sub> 1.5%, other compounds below 1%; TxB<sub>2</sub> 100%, PGD<sub>2</sub> 1.2%, other compounds below 1%. All samples were assayed in duplicate with appropriate standard curves for reference. Sample extracts, antisera, and radiolabelled tracers were incubated overnight at 4°C, at which time bound and free radiolabel were separated by use of dextran coated charcoal. Radioactivity was counted in duplicate samples in an Isocap-300 liquid scintillation system (Nuclear Chicago) with 10 ml of scintillator. All chemical reagents were of special or chromatographic grade. The water was deionized and double distilled in glass. Results were expressed as mean ± S.D. and were analysed by Student's t test for correlated means.

### RESULTS

Levels of eicosanoids in rat brain and plasma in control groups, at the end of 5 min clinical death and after resuscitation are presented in the Table 1.

The eicosanoids content in brain of the control groups – sham operated animals under ether anaesthesia – was the following: PGD<sub>2</sub> 2.56 ± 0.92 ng/g of wet weight, PGF<sub>2a</sub> 100.74 ± 6.08 ng/g and TxB<sub>2</sub> 12.49 ± 1.90 ng/g, and in plasma 2.22 ± 0.18 ng/ml, 6.62 ± 1.34 ng/ml and 8.19 ± 0.58 ng/ml, respectively.

At the end of clinical death period, concentration of PGF<sub>2a</sub> and TxB<sub>2</sub> in brain didn't differ significantly from the control, whereas PGD<sub>2</sub> concentration increased. In the early reperfusion period – 5 and 15 min after resuscitation significant large accumulation of three eicosanoids was observed reaching 100, 2.8 and 15-fold the control level for PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2a</sub> and TxB<sub>2</sub>, respectively. In the later period after resuscitation – at 30 and 60 min the concentration of three eicosanoids decreased being at 60 min significantly below the control level for PGF<sub>2a</sub> but for PGD<sub>2</sub> and TxB<sub>2</sub> it was still significantly above the control.

Changes in the eicosanoids content in plasma were more manifold. At the end of clinical death period the content of three compounds didn't differ significantly from the control. Five minutes after resuscitation the content of PGD<sub>2</sub> and PGF<sub>2a</sub> significantly decreased (12-fold and 2-fold, respectively), however, TxB<sub>2</sub> level significantly increased (3-fold). During the later period after resuscitation tendency towards normalization was more diverse – PGD<sub>2</sub> content was increasing slowly and still didn't reach the control level at 60 min, whereas PGF<sub>2a</sub> content normalized quickly at 15 min and was not significantly different from control up to 60 min. TxB<sub>2</sub> concentration in plasma was decreasing slowly reaching the control level at 60 min after resuscitation.

### DISCUSSION

The normal levels of eicosanoids in brain and plasma differ significantly in individual papers depending on applied methods. The main reason is



Table 1. Eicosanoids in rat brain and plasma after resuscitation from clinical death. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. of 8 samples from 4 animals. Significant from control \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; a = ng/g of wet brain; b = ng/ml of plasma

Tabela 1. Eikosanoidy w mózgu i osoczu szczura po resuscytacji ze stanu śmierci klinicznej. Każda wartość przedstawia średnią  $\pm$  S.D. z 8 próbek z 4 zwierząt. Znamienne w porównaniu z kontrolą \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; a = ng/g mokrego mózgu; b = ng/ml osocza

		Control Kontrola	End of clin. death Koniec śmierci klinicznej	Period after resuscitation Okres po resuscytacji			
				5 min	15 min	30 min	60 min
PGD <sub>2</sub>	Brain Mózg	2.56 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	27.20 $\pm$ 1.98**	254.89 $\pm$ 25.80**	234.05 $\pm$ 41.85**	125.07 $\pm$ 29.52**	25.23 $\pm$ 6.18**
	Plasma Osocze	2.22 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	2.10 $\pm$ 0.61	0.18 $\pm$ 0.10**	0.34 $\pm$ 0.13**	0.42 $\pm$ 0.14**	1.20 $\pm$ 0.70*
PGF <sub>2a</sub>	Brain Mózg	100.74 $\pm$ 6.08	97.84 $\pm$ 13.26	282.45 $\pm$ 45.14**	223.27 $\pm$ 25.64**	169.15 $\pm$ 35.11**	71.60 $\pm$ 13.60*
	Plasma Osocze	6.62 $\pm$ 1.34	4.45 $\pm$ 1.69	3.36 $\pm$ 1.05**	8.85 $\pm$ 5.64	6.12 $\pm$ 1.10	5.46 $\pm$ 1.89
TxB <sub>2</sub>	Brain Mózg	12.49 $\pm$ 1.90	11.17 $\pm$ 1.10	192.00 $\pm$ 27.38**	194.36 $\pm$ 29.28**	99.53 $\pm$ 17.33**	37.27 $\pm$ 6.53**
	Plasma Osocze	8.19 $\pm$ 0.58	9.02 $\pm$ 1.11	24.10 $\pm$ 5.55**	15.40 $\pm$ 5.01**	16.92 $\pm$ 4.78**	14.45 $\pm$ 8.73

intensive postmortem synthesis (Kempski et al. 1987) and known interference of non-estrified fatty acids with prostanoid assays. The content of  $\text{PGD}_2$  in the normal rat brain can serve as an example. This eicosanoid was recognized as a major PG in homogenates from the rat brain by means of gas-chromatography – mass spectrometry (Abdel-Halim et al. 1977), however, with a solid-phase enzyme immunoassay the normal level appeared to be low (Hiroshima et al. 1986). Although postmortem synthesis was carefully avoided by immediate freezing or microwave irradiation, the normal values of  $\text{PGD}_2$  in rat brain ranged from 110 pg to 4.4 ng/g of tissue (Narumiya et al. 1982; Hiroshima et al. 1986; Kempski et al. 1987). The same problem exists with normal values of other eicosanoids in brain and plasma reported by different authors (Granström, Samuelsson 1978; Bales et al. 1986; Kempski et al. 1987; Minamisawa et al. 1988; Vinge et al. 1988).

In our experiments we didn't kill the animals by means of microwave irradiation which also immediately inactivates metabolic processes. The brain and plasma samples were frozen as quickly as possible followed by conventional extraction procedures. Nevertheless postmortem synthesis couldn't be avoided what is confirmed by high base-line values and by an increase of  $\text{PGD}_2$  level in brain at the end of clinical death. The elevation of three eicosanoids content in brain during the early reperfusion period is in line with observations of other authors on gerbils (Gaudet, Levine 1979; Gaudet et al. 1980; Kempski et al. 1987) and spontaneously hypertensive rats (Minamisawa et al. 1988). Our results differ from data reported by other authors e.g. Gaudet and Levine (1979) observed approximately 50-fold increase of  $\text{PGF}_{2a}$  in brain during reperfusion after 5 min bilateral carotid occlusion in gerbils with  $\text{PGE}_2$  levels increased 3-5-fold. We observed 2.8 fold increase of  $\text{PGF}_2$  in brain and 100-fold increase of  $\text{PGD}_2$ . The recent data reported by Minamisawa et al. (1988) showed 11-fold increase of  $\text{TxB}_2$  in brain in 5th min reperfusion from 2 hrs bilateral carotid occlusion in spontaneously hypertensive rats. We observed 15-fold increase of  $\text{TxB}_2$  in brain 5 min after resuscitation. The quantitative differences in individual eicosanoids content during reperfusion from brain ischemia are related to the species and the experimental model applied e.g. in spontaneously hypertensive rats bilateral carotid occlusion produces decrease of CBF to the level ranged from 0 to 40% of control (Minamisawa et al. 1988), whereas in clinical death model cerebral ischemia is complete and there is a stop-flow of cerebral circulation (Kapuściński 1987).

Analysing the changes of eicosanoids in brain and plasma one should keep in mind their quick metabolism.  $\text{PGD}_2$  and  $\text{TxB}_2$  are the final metabolites, whereas the  $\text{PGF}_{2a}$  is metabolized to 15-keto-13,14-dihydro- $\text{PGF}_{2a}$ . The reversible elevation of eicosanoids in the brain after ischemic episodes is in agreement with the results of other authors (Gaudet, Levine 1979; Minamisawa et al. 1988) and depends on the period of ischemia (Gaudet et al. 1980). The striking observation of the present study was accumulation of PG's and Tx in the brain during arterial hyperemia but not decreased perfusion. CBF



evaluated in the same experimental model by means of Xe-133 clearance technique was increased (Kapuściński 1987) and changed approximately parallel to the alteration in eicosanoids content. The deleterious effect of above eicosanoids on CBF including vasospasm and platelet aggregation is a theoretical background for treatment of ischemic stroke (Gaudet, Levine 1979; Gryglewski et al. 1982; Pluta 1986; Mossakowski, Gadamski 1987). The return of eicosanoids levels towards normal values with prolonged reperfusion is probably due to vascular washout, together with diffusion into cerebro-spinal fluid.

Alterations in eicosanoids content in plasma are more difficult to explain. Lack of significant changes at the end of clinical death period confirm depletion of tissue oxygen, a substrate necessary for the cyclo-oxygenation of arachidonic acid. The short-lasting drop of  $\text{PGF}_{2a}$  and profound decrease of  $\text{PGD}_2$  content with slow reversibility may reflect differences in their metabolism in peripheral circulation in the postischemic period. The reversible increase of  $\text{TxB}_2$  content may be explained by release of  $\text{TxA}_2$  (as reflected by  $\text{TxB}_2$  production) from adhered and aggregated platelets on the endothelial cells of the peripheral vessels damages by ischemia during clinical death as a result of accumulation of arachidonic acid.

The results of this study demonstrate that resuscitation from clinical death in rats produces reversible accumulation of eicosanoids in brain and changes in their content in peripheral plasma which are eicosanoid- and time-specific.

#### EIKOSANOIDY W MÓZGU I OSOCZU SZCZURA PO RESUSCYTACJI ZE STANU ŚMIERCI KLINICZNEJ

##### Streszczenie

Przy użyciu metody radioimmunologicznej oceniono zmiany stężenia prostaglandyn  $\text{D}_2$ ,  $\text{F}_{2a}$  i tromboksanu  $\text{B}_2$  w mózgu i w osoczu szczura podczas śmierci klinicznej i po resuscytacji. We wczesnym okresie po niedokrwieniu stwierdzono znaczny odwracalny wzrost zawartości tych związków w mózgu w okresie zwiększonego mózgowego przepływu krwi oraz zmiany ich poziomu w osoczu zależne od rodzaju związku i czasu badania.

##### REFERENCES

1. Abdel-Halim M. S., Hamberg M., Sjöquist B., Änggard E.: Identification of prostaglandin  $\text{D}_2$  as a major prostaglandin in homogenates of rat brain. *Prostaglandins*, 1977, 14, 633–643.
2. Abe K., Kogure K., Yamamoto H., Imazawa M., Miyamoto K.: Mechanism of arachidonic acid liberation during ischemia in gerbil cerebral cortex. *J Neurochem*, 1987, 48, 503–509.
3. Bales C. W., Wang M. C., Freeland-Graves J. H., Pobocik R. S.: The effect of zinc deficiency and food restriction on prostaglandin  $\text{E}_2$  and thromboxane  $\text{B}_2$  in saliva and plasma of rats. *Prostaglandins*, 1986, 31, 859–868.
4. Gaudet R. J., Levine L.: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979, 86, 893–901.
5. Gaudet R. J., Alam I., Levine L.: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J Neurochem*, 1980, 35, 653–658.

6. Granström E.: Minireview: Radioimmunoassay of prostaglandins. *Prostaglandins*, 1978, 15, 3–17.
7. Granström E., Samuelsson B.: Quantitative measurements of Prostaglandins and Thromboxanes: General considerations. In: *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*. Ed.: J. C. Frölich. Vol. 5, Raven Press, N.Y., 1978, 1–13.
8. Grotta J. C., Pettigrew L. C., Rosenbaum D., Reid C., Rhoades H., McCandless D.: Efficacy and mechanism of action of calcium blocker after global cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 1988, 19, 447–454.
9. Gryglewski R. J., Nowak S., Trąbka-Kostka E., Biedroń K., Kuśmiderski J., Markowska E., Szmatoła S.: Clinical use of prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) in ischemic stroke. *Pharmacol Res Commun*, 1982, 14, 879–908.
10. Hiroshima O., Hayashi H., Ito S., Hayaishi O.: Basal level of prostaglandin D<sub>2</sub> in rat brain by a solid-phase enzyme immunoassay. *Prostaglandins*, 1986, 32, 63–80.
11. Kapuściński A.: Mózgowy przepływ krwi w doświadczalnym modelu śmierci klinicznej u szczurów. *Neuropat Pol*, 1987, 25, 287–298.
12. Kempinski O., Shohami E., von Lubitz D., Hallenbeck J. M., Feuerstein G.: Postischemic production of eicosanoids in gerbil brain. *Stroke*, 1987, 18, 111–119.
13. Korpachev G. W., Lysenkov S. P., Tiel L. Z.: Modelirowanie klinicznej śmierci i post-reanimacyjnej choroby u krów. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 1982, 3, 78–80.
14. Lands W. E. M.: The biosynthesis and metabolism of prostaglandins. *Ann Rev Physiol*, 1979, 41, 633–652.
15. McCalden T. A., Nath R. G., Thiele K.: The role of prostacyclin in the hypercapnic and hypoxic cerebrovascular dilatations. *Life Sci*, 1984, 34, 1801–1807.
16. Minamisawa H., Terashi A., Katayama Y., Kanda Y., Shimizu J., Shiratori T., Inamura K., Kaseki H., Yoshino Y.: Brain eicosanoid levels in spontaneously hypertensive rats after ischemia with reperfusion: Leukotriene C<sub>4</sub> as a possible cause of cerebral edema. *Stroke*, 1988, 19, 372–377.
17. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropat Pol*, 1986, 24, 471–489.
18. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ prostacykliny PGI<sub>2</sub> i indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat Pol*, 1987, 25, 21–34.
19. Narumiya S., Ogorochi T., Nakao K., Hayaishi O.: Prostaglandin D<sub>2</sub> in rat brain, spinal cord and pituitary: basal level and regional distribution. *Life Sci*, 1982, 31, 2093–2103.
20. Pickard J. D., Walker V.: Current concepts of the role of prostaglandins and other eicosanoids in acute cerebrovascular disease. In: *Neurotransmitters and the cerebral circulation*, L.E.R.S. Eds.: E. T. Mackenzie J. Seylaz, A. Bies. Vol. 2, Raven Press, N.Y., 1984, 191–218.
21. Pluta R.: Influence of prostacyclin on the recovery of bioelectric cerebral activity after complete cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand*, 1986, 73, 44–54.
22. Rehncrona S., Westerberg E., Akesson B., Siesjö B. K.: Brain cortical fatty acids and phospholipids during and following complete and severe incomplete ischemia. *J Neurochem*, 1982, 38, 84–93.
23. Vinge E., Brandt L., Ljunggren B. and Andersson K.-E.: Thromboxane B<sub>2</sub> levels in serum during continuous administration of nimodipine to patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, 1988, 19, 644–647.
24. Wolfe L. S.: Eicosanoids, prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. Short Review. *J Neurochem*, 1982, 38, 1–14.
25. Zelman I. B., Mossakowski M. J.: Remote pathological brain changes in rats following experimentally induced clinical death. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 151–162.

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



JÓZEF KAŁUŻA, DARIUSZ ADAMEK, WITOLD MIEŻYŃSKI

MORFOLOGICZNE WYKŁADNIKI ZMIAN W OŚRODKOWYM  
UKŁADZIE NERWOWYM W SINICZYCH I BEZSINICZYCH  
WADACH WRODZONYCH SERCA W WIEKU ROZWOJOWYM.  
STAN KOMÓREK NERWOWYCH I ICH WYPUSTEK  
OCENIONY METODAMI BARWNYMI, IMPREGNACYJNYMI  
I W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM \*

CZEŚĆ I. ROZWÓJ DENDRYTÓW NA PODSTAWIE BADAŃ METODĄ GOLGIEGO

Samodzielna Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologii i Zakład Patologii Instytutu  
Pediatrii Akademii Medycznej, Kraków

Ocena morfologiczna neuronów w różnych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego jest trudna, ponieważ zmiany, jakie mogą w nich występować nie zawsze dadzą się wykazać z powodu ograniczeń metodycznych. Poszukiwanie metod, które pozwoliłyby na ujawnienie dotychczas nie dostrzeganych zmian doprowadziło do ponownego zainteresowania się metodą Golgiego w różnych jej modyfikacjach, przy niezmiennym wykorzystaniu jej właściwości impregnacyjnych. Fábregues i Feerer (1983) dzięki zastosowaniu impregnacji sposobem Golgiego, mogli wykazać zmiany strukturalne w komórkach nerwowych w korze mózgowej chorych z zespołem Downa, Huttenlocher (1974) zaś uwidoczniał zmiany w drzewie dendrytycznym w korze mózgowej dzieci z upośledzeniem umysłowym. Purpura (1974) stosując impregnację według Golgiego wykazał u dzieci z opóźnieniem rozwojowym dysgenezję kolców dendrytycznych. Dalsze badania nad rozwojem drzewa dendrytycznego i synaps (Hammerschlag 1983) na poziomie molekularnym, pozwoliły na dość dokładne określenie roli, jaką odgrywają w prawidłowym rozwoju komórek nerwowych siateczka śródplazmatyczna i aparat Golgiego. Machado-Salas (1984) potwierdził w chorobie Bourneville'a wyniki badań przeprowadzonych na prawidłowej tkance i uzyskał nowe dowody na zależność między prawidłową czynnością siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego a rozwojem dendrytów.

---

\* Praca wykonana w ramach programu CPBP — temat 06-02,II.4.2

Sposób impregnacji tkanki nerwowej według Golgiego wykorzystano już wcześniej. W 1964 r. Schadé i Meeters posłużyli się impregnacją w ujawnianiu sylwetek komórek nerwowych i ich wypustek w haku zakrętu hipokampa, a w kolejnej pracy (Schadé i wsp. 1964) — w ilościowej analizie parametrów neuronalnych w dojrzewającej korze. Purpura i wsp. (1964) przeprowadzili badania porównawcze nad ontogenezą strukturalno-czynnościową kory mózgu i mózdzku, używając również metody Golgiego, której możliwości zostały w tej pracy w pełni wykorzystane.

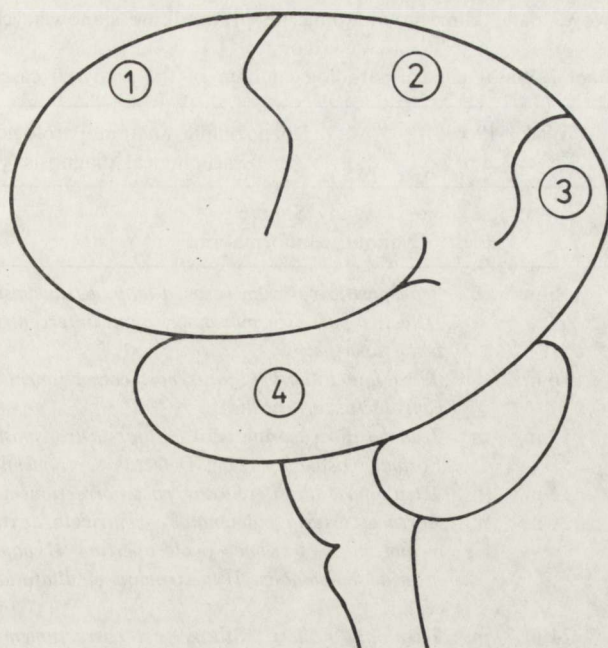
Z badań Schadé i wsp. (1964) wynika, że intensywny wzrost drzewa dendrytycznego, który polega na rozroście i tworzeniu rozgałęzień, odbywa się w pierwszych miesiącach rozwoju ontogenetycznego i osiąga szczyt między 12 a 14 miesiącem życia. W następnych miesiącach gęstość odgałęzień na jednostkę powierzchni kory nie zmienia się w istotny sposób. Okres intensywnego rozwoju dendrytów, jako morfologicznego wykładnika rozwoju umysłowego dziecka zamyka się w granicach jednego roku. W przewlekłych stanach chorobowych, do których zaliczany jest również zespół adaptacyjny w wrodzonych wadach serca, dochodzi do uszkodzenia neuronów w następstwie hipoksji i związanych z nią zaburzeń metabolicznych. Uszkodzenia neuronów mogą być niewidoczne w preparatach barwionych rutynowymi metodami, natomiast stają się dostępne obserwacjom po zastosowaniu innych metod badawczych. Mając powyższe na uwadze, przeprowadziliśmy badania metodą Golgiego w modyfikacji Coxa i Kopscha, łącząc je z ilościową analizą rozwoju drzewa dendrytycznego.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 18 mózgach dzieci w wieku 6, 12 i 24 miesięcy. Ogólną charakterystykę zbioru przypadków podano w tabeli 1. Skrawki do badania (ryc. 1) pobierano z okolicy czołowej — zakręt czołowy górny, pole 6, z okolicy ciemieniowej — płacik ciemieniowy górny, pole 7, z płata potylicznego — zakręty potyliczne górne, pole 18 oraz płata skroniowego — zakręt skroniowy środkowy, pole 22. Oznaczenia pól na powierzchni kory mózgowej przyjęto za Brodmannem (1909).

Skrawki nie większe niż  $0,5\text{ cm}^2$  utrwalano w formalinie wapniowej lub mieszaninie chromianowo-rtęciowej, impregnowano według metody Golgi—Coxa lub Golgi—Kopscha, zatapiano w celoidynie i krojono na skrawki o grubości 40 i 70  $\mu\text{m}$ , odwadniano w sposób typowy i zamykano w balsamie kanadyjskim. Tak przygotowane preparaty oglądano w mikroskopie świetlnym. Kontrolne skrawki z tych samych okolic mózgu utrwalano w formalinie, zatapiano w parafinie w typowy sposób, barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu sposobem Einarssona, tj. gallocjaniną w alunie chromowym oraz według Klüvera—Barrery.





Ryc. 1. Miejsca pobierania materiału: 1) zakręt czołowy górny, 2) płacik ciemieniowy górny, 3) zakręty potyliczne górne, 4) zakręt skroniowy środkowy

Fig. 1. Sites of the cerebral cortex, from where samples were taken: 1) frontal superior gyrus, 2) parietal superior lobule, 3) occipital superior gyri, 4) middle temporal gyrus

### Badania morfometryczne

W badaniach morfometrycznych zastosowano metodę opracowaną przez Schadé i Meetersa (1963), którą przystosowano do opracowania własnego materiału. Metoda oznaczona literą  $D_1$  polega na obliczeniu punktów odgałęzienia dendrytów bezpośrednio z ciała komórkowego; metoda oznaczona literą  $D_2$  polega na obliczeniu punktów rozwidleń i rozgałęzień dendrytów. Metoda oznaczona literą  $D_3$  polega na obliczeniu miejsc przekroczenia przez odgałęzienia dendrytów siatki rastra (ryc 2). Liczenia miejsc odgałęzień dendrytów dokonano wyłącznie w komórkach piramidowych III warstwy kory, na 10 neuronach, przy czym w metodzie  $D_3$  liczono miejsca przekroczenia przez dendryty brzegu rastra, którego bok, po przeliczeniu powiększenia wynosił 156  $\mu\text{m}$ .

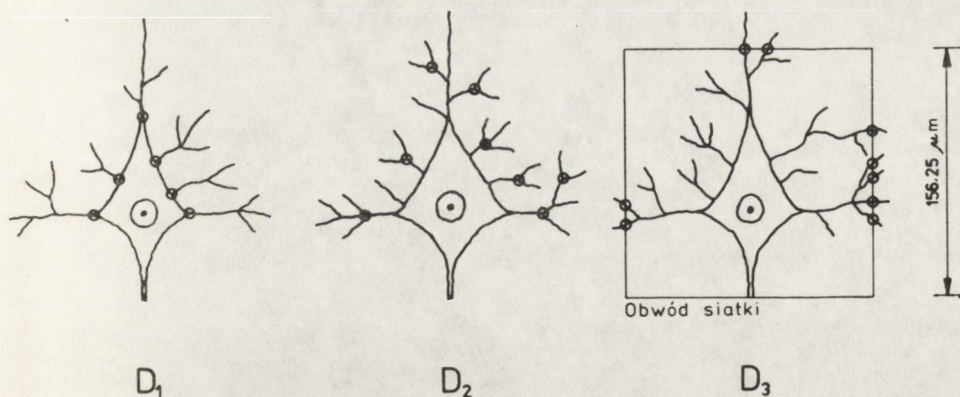
W pierwszym etapie analizy matematycznej obliczono średnie arytmetyczne wszystkich pomiarów wykonanych metodą  $D_1$ ,  $D_2$  i  $D_3$ . Średnie arytmetyczne tych pomiarów, na które składają się przeciętne wartości liczbowe odnoszące się do jednego neuronu, przedstawiono w tabelach 2, 3 i 4. W tabeli 2 podano zatem liczbę dendrytów odgałęziających się bezpośrednio od ciała komórkowego, w tabeli 3 – przeciętną liczbę rozgałęzień drzewa dendrytycznego i w tabeli 4 przeciętną liczbę punktów przecięcia brzegów rastra przez

Tabela 1. Podstawowe dane kliniczno-anatomiczne przypadków stanowiących opracowywany zbiór

Table 1. Basal clinical-pathological data of the analysed cases

Nr No	Sygn.	Wiek Age	Płeć Sex	Rozpoznanie anatomopatologiczne Pathological diagnosis
Wady Siniczne Cyanotic Malformations				
1.	I.P.3620	6 m.	f.	<i>Transpositio vasorum vera (d-loop, d-transpositio, situs solitus). Defectus partis membranacei septi interventricularis. Foramen ovale apertum.</i>
2.	I.P.3613	6 m.	f.	<i>Tetralogia Falloti. (Status post correctionem totalem et ligaturam ductus arteriosus).</i>
3.	I.P.3604	12 m.	m.	<i>Transpositio vasorum vera (d-loop, d-transpositio, situs solitus). Foramen ovale apertum. Defectus septi membranacei.</i>
4.	I.P.3556	12 m.	f.	<i>Tetralogia Falloti. (Status post correctionem totalem).</i>
5.	I.P.3599	24 m.	m.	<i>Aorta et arteria pulmonalis e ventriculo dextro. Defectus septi membranacei. Foramen ovale apertum. Hypoplasia rami sinistri arteriae pulmonalis. Hypertrophia et dilatatio ventriculi dextri cordis.</i>
6.	I.P.3589	24 m.	m.	<i>Tetralogia Falloti. (Status post correctionem totalem).</i>
Wady Bezsiničné Noncyanotic Malformations				
7.	I.P.3601	6 m.	m.	<i>Stenosis fere complete valvulae aortae. Hypoplasia cordis sinistri. Foramen ovale apertum et ductus Botalli persistens.</i>
8.	I.P.3566	6 m.	m.	<i>Defectus septi interventricularis.</i>
9.	I.P.3589	12 m.	f.	<i>Fibrosis endocardii maioris gradus. Hypertrophia et dilatatio ventriculi sinistri. Cardiomyopathia hypertrophica.</i>
10.	I.P.3556	12 m.	m.	<i>Defectus interatrialis secundus et canalis atrioventricularis completus. Malformatio ventriculorum.</i>
11.	I.P.3570	24 m.	f.	<i>Coarctatio aortae. Defectus partis membranacei septi interventricularis. Dilatatio cordis dextri.</i>
12.	I.P.3626	24 m.	m.	<i>Stenosis valvularis aortae. Hypoplasia cordis sinistri. Fibrosis endocardii. Ductus Botalli persistens et foramen ovale apertum. Hypertrophia ventriculi dextri.</i>
Grupa Porównawcza (Kontrolna) Comparative Group (Control)				
13.	I.P.3577	6 m.	m.	<i>Craniostenosis.</i>
14.	I.P.3561	6 m.	m.	<i>Morbus Werdnig–Hoffman.</i>
15.	I.P.3568	12 m.	m.	<i>Syndrom Hallerman–Streiff. Ulcus pepticum acutus perforans.</i>
16.	I.P.3610	12 m.	m.	<i>Morbus Hirschsprung.</i>
17.	I.P.3562	24 m.	m.	<i>Neuroblastoma.</i>
18.	I.P.3608	24 m.	m.	<i>Contusio thoracis. Hemothorax. Fractura costarum. Bronchopneumonia.</i>





Ryc. 2. Schematy komórek nerwowych z odgałęzieniami dendrytów z topografią liczonych miejsc  
 Fig. 2. Schematic presentation of nerve cells and their dendritic branchings with topography of counted sites

poszczególne dendryty pochodzące z jednego neuronu. Każda z tabel ma odrębną kolumnę dla każdego rodzaju stanu klinicznego, dla każdej lokalizacji oraz dla 3 przedziałów wieku. W ten sposób zgrupowano średnie pomiarów według trzech kryteriów: 1) stanu klinicznego, 2) lokalizacji i 3) wieku. Zgromadzone dane liczbowe opracowano metodą analizy wariancji według trzech wyżej wymienionych kryteriów.

Matematyczne opracowanie analizy wariancji wykonano przy użyciu sprzętu i oprogramowania udostępnionego w Zakładzie Informatyki AM w Krakowie, mgr J. Meus. Zbiorcze wyniki analizy wariancji przedstawiono w tabelach 7, 8 i 9.

W tabeli 5 przedstawiono uśrednione wyniki pomiarów (średnie arytmetyczne) wszystkich czterech badanych okolic mózgu w relacji do trzech stanów klinicznych i przedziałów wieku. Ponadto w dolnym rzędzie tabeli 5 umieszczono średnie pomiarów w poszczególnych stanach klinicznych. Dodatkowo wyniki te przedstawiono w postaci histogramów (ryc. 8). Tabela 6 zawiera uśrednione wyniki pomiarów w każdym z przedziałów wieku, niezależnie od stanu klinicznego. Tabelę tę sporządzono dla ogólnego zobrazowania tendencji rozwojowych poszukiwanych zależności w badanych mózgowiach analizowanych przez 4 metody pomiarowe.

#### WYNIKI

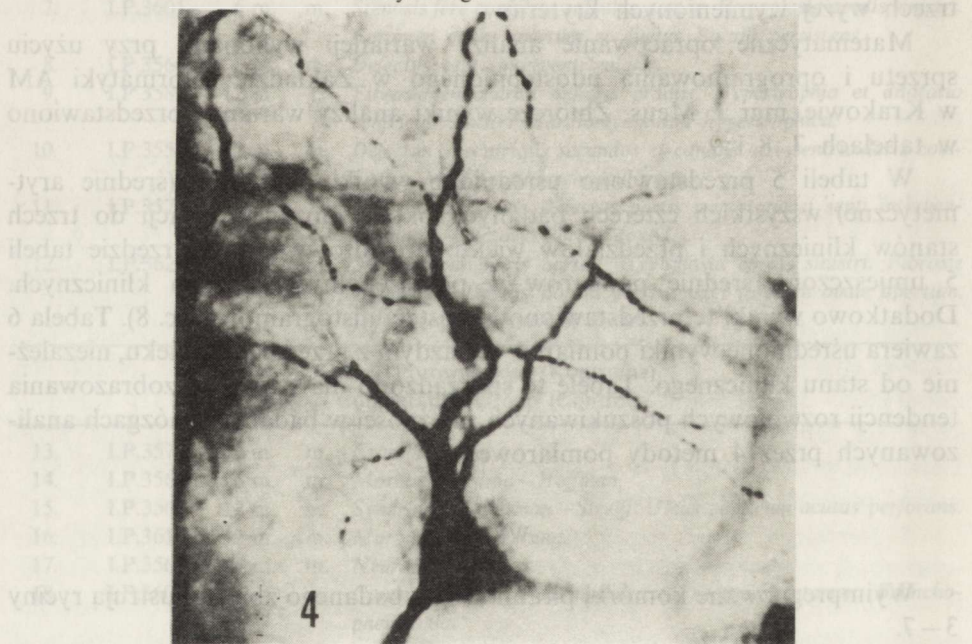
Wyimpregnowane komórki piramidowe z badanego zbioru ilustrują ryciny 3–7.

We wszystkich trzech metodach oceny drzewa dendrytycznego stwierdzono, że w przypadkach z wadami sinicznymi obserwuje się mniejszy stopień rozwoju dendrytów niż w pozostałych stanach klinicznych. Natomiast porów-



Ryc. 3. Komórka piramidowa III warstwy kory czołowej (pole 6). Dziecko 6-miesięczne z grupy kontrolnej. Pojedyncze odgałęzienia dendrytów i cienie wskazujące na odgałęzienia od ciała komórkowego. Golgi-Cox. Pow. 220 ×

Fig. 3. Pyramidal cell of the 3rd layer of frontal cortex (field No 6). Child 6/12, control group. Single ramifications of the dendrite and shadows of some other dendrites branching off the cell body. Golgi-Cox. × 220



Ryc. 4. Komórka piramidowa III warstwy kory czołowej (pole 6). Dziecko 12-miesięczne z grupy kontrolnej. Dendryty i ich wtórne odgałęzienia. Golgi-Cox. Pow. 220 ×

Fig. 4. Pyramidal cell of the 3rd layer of frontal cortex (field No 6). Child 12/12, control group. Dendrites and their ramifications. Golgi-Cox. × 220





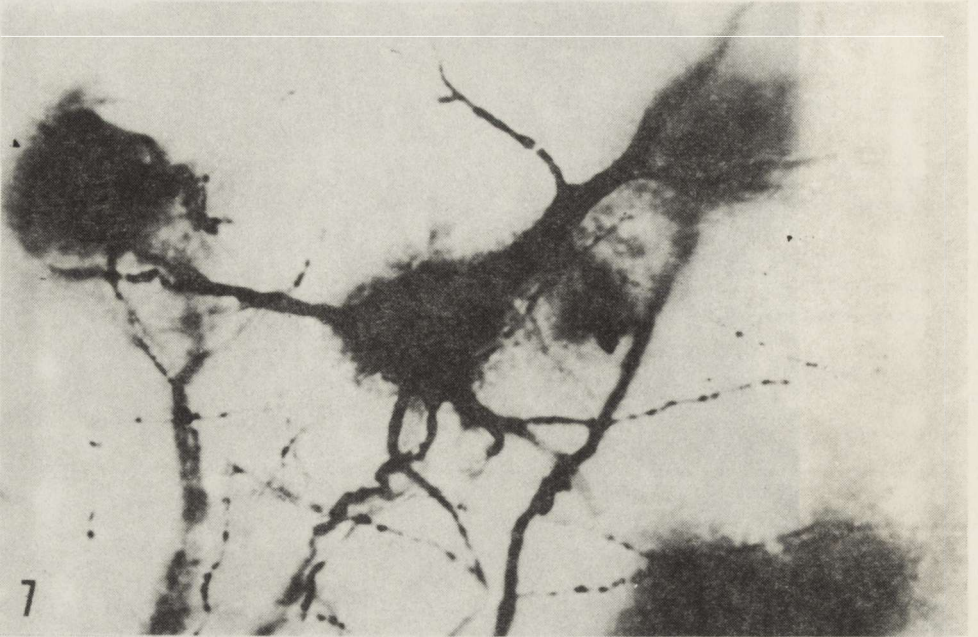
Ryc. 5. Komórka piramidowa III warstwy kory czołowej (pole 6). Dziecko 12-miesięczne z wadą sercową. Widoczne jedynie pojedyncze dendryty odchodzące od ciała komórkowego. Golgi-Cox. Pow. 220 ×

Fig. 5. Pyramidal cell of the 3rd layer of frontal cortex (field No 6). Child 12/12, cyanotic heart defect. Only single dendrites branching off the cell body are visible. Golgi-Cox. × 220



Ryc. 6. Komórka piramidowa III warstwy kory czołowej (pole 6). Dziecko 6-miesięczne z grupy wad sercowych. Pojedyncze dendryty podstawne i nieliczne odgałęzienia. Golgi-Cox. Pow. 220 ×

Fig. 6. Pyramidal cell of the 3rd layer of frontal cortex (field No 6). Child 6/12, cyanotic heart defect. Single basal dendrites with very scarce branches. Golgi-Cox. × 220



Ryc. 7. Komórka piramidowa III warstwy kory czołowej (pole 6). Dziecko 24-miesięczne z grupy wad bezsinicznych. Dobrze rozwinięte drzewo dendrytyczne. Golgi—Cox. Pow. 220 ×

Fig. 7. Pyramidal cell of the 3rd layer of frontal cortex (field No 6). Child 24/12, non-cyanotic heart defect. Well developed dendritic tree. Golgi—Cox. × 220

nując przypadki kontrolne z wadami bezsinicznymi można wysnuć wniosek, że stopień rozwoju dendrytów mierzony metodą  $D_1$ ,  $D_2$  i  $D_3$  jest zbliżony, można więc uznać, że zaburzenia w rozwoju drzewa dendrytycznego występujące w wadach bezsinicznych nie wpływają w zasadniczy sposób na jego ukształtowanie (tab. 2—4).

Tabele 5 i 6 zawierają dane liczbowe, które umożliwiają zorientowanie się jak mierzone cechy zachowują się w zależności od wieku zmarłych dzieci. Tabela 6 przedstawiająca wyniki średnie dla wszystkich grup klinicznych (N, S i BS) jest pod tym względem bardzo obrazowa. Szczególnie uderza fakt, że w grupie wad sinicznych, w której rozwój drzewa dendrytycznego jest opóźniony w stosunku do pozostałych grup, daje się jednak zauważyć stały wzrost dendrytów w czasie, co wynika z porównania wartości liczbowych przypadków w wieku 6, 12, i 24 miesięcy. Jest to szczególnie wyraźnie widoczne przy zastosowaniu metody  $D_2$ , w której liczone punkty rozgałęzień dendrytów.

Celem zorientowania się, która z wartości liczbowych jest znamienna statystycznie, a zatem która z cech wyróżnia się istotnie w badanym zbiorze, zastosowano analizę wariancji zmiennych według trzech kryteriów: stanu klinicznego, lokalizacji i wieku dla każdej z zastosowanych metod oceny drzewa dendrytycznego. Schemat na rycinie 9 przedstawia ideogram analizy wariancji. W schemacie wypisano również kryptonimy czynników zmienności,



Tabela 2. Ocena drzewa dendrytycznego – wyniki obliczeń metodą D-1  
 Table 2. Evaluation of dendritic tree – D-1 method

Okolica Region	N	S	BS	Wiek (miesiące) Age (months)
F	4,65	4,20	4,80	6
	5,40	4,05	5,65	12
	5,60	5,45	5,85	24
P	4,90	3,80	4,55	6
	5,65	4,35	5,85	12
	5,40	4,85	5,70	24
O	4,70	3,65	4,60	6
	5,55	3,95	6,00	12
	5,65	4,80	5,90	24
T	4,80	3,75	4,95	6
	5,75	4,00	6,15	12
	5,70	4,85	5,85	24

F – okolica czołowa  
frontal region

P – okolica ciemieniowa  
parietal region

O – okolica potyliczna  
occipital region

T – okolica skroniowa  
temporal region

N – grupa porównawcza (kontrolna)  
comparative (control) group

S – grupa wad sinicznych  
group with cyanotic malformations

BS – grupa wad bezsinicznych  
group with noncyanotic malformations

Tabela 3. Ocena drzewa dendrytycznego – wyniki obliczeń metodą D-2  
 Table 3. Evaluation of dendritic tree – D-2 method

Okolica Region	N	S	BS	Wiek (miesiące) Age (months)
F	5,10	4,10	5,45	6
	6,60	5,70	6,20	12
	7,25	6,65	7,20	24
P	5,40	3,75	5,50	6
	6,10	4,65	6,25	12
	7,15	6,35	6,70	24
O	5,45	4,00	5,30	6
	6,40	6,15	6,10	12
	7,05	5,70	7,20	24
T	5,90	4,35	5,15	6
	5,80	5,80	6,80	12
	7,15	6,40	7,00	24

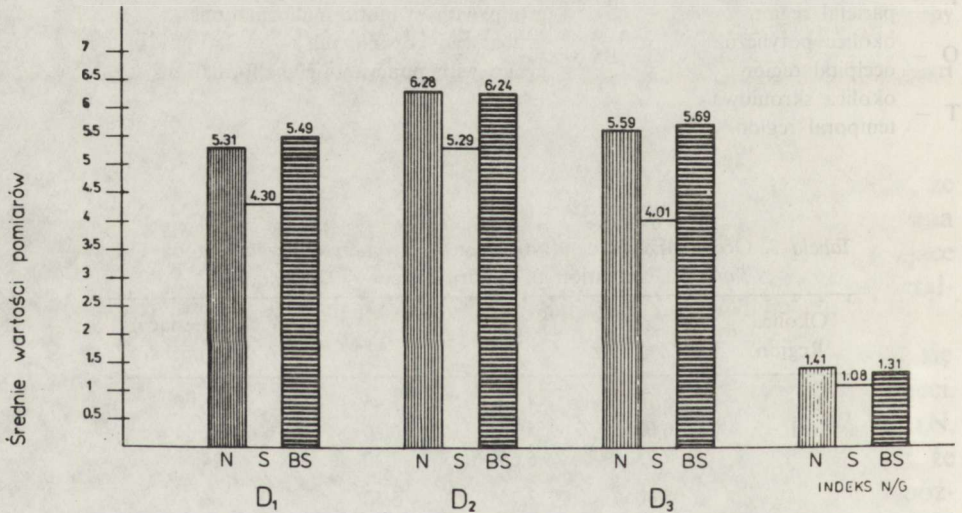
Oznaczenia jak w tabeli 2  
Designations as in Table 2

Tabela 4. Ocena drzewa dendrytycznego — wyniki obliczeń metodą D-3  
 Table 4. Evaluation of dendritic tree — D-3 method

Okolica Region	N	S	BS	Wiek (miesiące) Age (months)
F	5,30	3,60	5,25	6
	5,50	4,15	6,00	12
	5,40	3,95	5,70	24
P	5,45	3,75	5,35	6
	5,70	3,55	6,15	12
	5,40	4,05	5,10	24
O	5,70	3,80	5,85	6
	5,95	4,00	6,30	12
	5,80	4,65	5,70	24
T	5,05	3,75	5,45	6
	5,90	4,20	5,70	12
	5,95	4,70	5,50	24

Oznaczenia jak w tabeli 2

Designations as in Table 2



Ryc. 8. Zbiorcze średnie wyniki pomiarów miejsc drzewa dendrytycznego oraz indeks neuronalno-glejowy dla wszystkich grup wieku

Fig. 8. Summarizing results of the measurement of dendrites and neuron/glia index for all age groups and localizations

którymi oznaczono cechy w tabelach, mianowicie te cechy, które są przedmiotem analizy wariancji. Czynniki A jest kryptonimem stanów klinicznych, przy czym kryptonimem A<sub>1</sub> oznaczono stan bez zmian patologicznych (grupa kontrolna), A<sub>2</sub> stan z wadami sinicznymi i A<sub>3</sub> stan z wadami bezsinicznymi. Czynniki B jest kryptonimem czynników zmienności dla czterech różnych



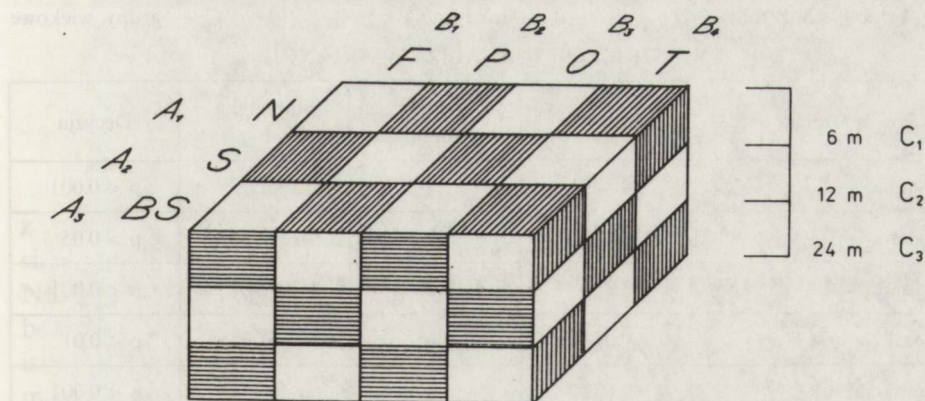
Tabela 5. Ogólne wyniki oceny stanu dendrytów — uśrednione różnice lokalizacyjne  
 Table 5. General results of the evaluation of dendrites — averaged localization differences

Wiek (miesiące) Age (months)	D-1			D-2			D-3		
	N	S	BS	N	S	BS	N	S	BS
6	4,76	3,85	4,72	5,46	4,04	5,35	5,37	3,72	5,47
12	5,59	4,09	5,91	6,22	5,57	6,34	5,76	3,97	6,04
24	5,59	4,99	5,82	7,15	6,27	7,02	5,64	4,34	5,50
Ogółem	5,31	4,30	5,49	6,28	5,29	6,24	5,59	4,01	5,67

Tabela 6. Stan dendrytów i indeksu N/G w poszczególnych grupach wieku dla obu grup chorobowych i grupy kontrolnej łącznie

Table 6. State of dendrites and N/G index in particular age groups both disease categories and control group included

	Grupa wieku Age group			Metoda Method
	6 m	12 m	24 m	
	4,44	5,20	5,47	D-1
	4,95	6,04	6,81	D-2
	4,85	5,26	5,16	D-3
	1,27	1,31	1,21	IND. N/G



Ryc. 9. Schemat analizy wariancji przeprowadzonej osobno dla wszystkich metod oceny drzewa dendrytycznego i dla współczynnika neuronalno-glejowego

Fig. 9. Diagram of the principles of variance analysis used for evaluation of the obtained data





## CZYNNIK –A–

Poziomy czynnika A	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom A 1	5.313	0.405	0.117
Poziom A 2	4.308	0.535	0.155
Poziom A 3	5.487	0.560	0.162

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

  A 2        A 1        A 3  

## CZYNNIK –B–

Poziomy czynnika B	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom B 1	5.072	0.626	0.209
Poziom B 2	5.006	0.658	0.219
Poziom B 3	4.978	0.799	0.266
Poziom B 4	5.089	0.793	0.264

## CZYNNIK –C–

Poziomy czynnika C	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom C 1	4.446	0.452	0.151
Poziom C 2	5.196	0.810	0.270
Poziom C 3	5.467	0.393	0.131

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

  C 1        C 2        C 3  

W tabeli 8 podano wyniki obliczeń dla rozgałęzień dendrytów (metoda  $D_2$ ), z których można wnosić, że liczba tych rozgałęzień w przypadkach wad sinicznych ( $A_2$ ) jest znamiennej mniejsza niż w pozostałych stanach klinicznych. Nie znaleziono znamiennej różnicy między grupą kontrolną i grupą wad bezsinicznych ( $A_1$  i  $A_3$ ). Podobnie jak w tabeli 7 (metoda  $D_1$ ) nie stwierdzono istotnych różnic w rozwoju rozgałęzień dendrytów w poszczególnych okolicach mózgowia. Oznacza to, że dendryty tworzą rozgałęzienia o podobnym zagęszczeniu we wszystkich okolicach mózgu. W przedziałach wieku różnice znamienne statystycznie wykazano dla każdej z porównywanych grup wieku. Na tej podstawie można sądzić, że w miarę rozwoju drzewo dendrytyczne

Tabela 8. Ocena dendrytów metodą D-2. Liczba rozgałęzień dendrytów. Analiza statystyczna  
 Table 8. Evaluation of dendrites according to D-2 method. Number of the secondary branchings of dendrites. Statistical analysis

## METODA D2

A – grupy schorzenia

B – lokalizacja

C – grupy wiekowe

## WYNIKI TESTU ANALIZY WARIANCJI

Źródło zmienności	Wariancja	Stopnie swobody	Statystyka F	Decyzja
Czynnik – A –	3.679	2	23.079	$p < 0.001$
Czynnik – B –	0.149	3	0.934	$p > 0.05$
Czynnik – C –	10.510	2	65.931	$p < 0.001$
Interakcja A × B	0.051	6	0.320	$p > 0.05$
Interakcja A × C	0.180	4	1.129	$p > 0.05$
Interakcja B × C	0.086	6	0.542	$p > 0.05$
Błąd eksperyment.	0.159	12		

## CZYNNIK – A –

Poziomy czynnika A	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom A 1	6.279	0.732	0.211
Poziom A 2	5.300	1.012	0.292
Poziom A 3	6.237	0.719	0.208

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

A 2    A 3    A 1

## CZYNNIK – B –

Poziomy czynnika B	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom B 1	6.028	0.979	0.326
Poziom B 2	5.761	0.999	0.333
Poziom B 3	5.928	0.917	0.306
Poziom B 4	6.039	0.859	0.286



## CZYNNIK -C-

Poziomy czynnika C	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom C 1	4.954	0.678	0.226
Poziom C 2	6.046	0.522	0.174
Poziom C 3	6.817	0.454	0.151

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

C 1    C 2    C 3

Tabela 9. Analiza statystyczna oceny dendrytów metodą D-3. Liczba punktów przecięcia dendrytów danego neuronu z brzegami pola rastra

Table 9. Evaluation of dendrites according to D-3 method. Number of the crossings of dendrites at the margin of the mesh of the raster net. Statistical analysis

## METODA D3

A – grupy schorzenia

B – lokalizacja

C – grupy wiekowe

## WYNIKI TESTU ANALIZY WARIANCJI

Źródło zmienności	Wariancja	Stopnie swobody	Statystyka F	Decyzja
Czynnik -A-	10.500	2	198.115	$p < 0.001$
Czynnik -B-	0.243	3	4.578	$p < 0.05$
Czynnik -C-	0.520	2	9.811	$p < 0.01$
Interakcja A × B	0.045	6	0.846	$p > 0.05$
Interakcja A × C	0.210	4	3.960	$p < 0.05$
Interakcja B × C	0.057	6	1.083	$p > 0.05$
Błąd eksperyment.	0.053	12		

## CZYNNIK -A-

Poziomy czynnika A	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom A 1	5.592	0.274	0.079
Poziom A 2	4.013	0.354	0.102
Poziom A 3	5.671	0.348	0.100

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

A 2    A 1    A 3

## CZYNNIK –B–

Poziomy czynnika B	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom B 1	4.983	0.805	0.268
Poziom B 2	4.944	0.872	0.291
Poziom B 3	5.306	0.860	0.287
Poziom B 4	5.133	0.730	0.243

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

B 2    B 1    B 4    B 3

## CZYNNIK –C–

Poziomy czynnika C	Średn. arytm.	Odch. stand.	Błąd stand.
Poziom C 1	4.858	0.826	0.275
Poziom C 2	5.258	0.941	0.314
Poziom C 3	5.158	0.647	0.216

## WYNIKI NOWEGO WIELOKROTNEGO TESTU ROZSTĘPU DUNCANA

C 1    C 3    C 2

wzbogaca się o nowe rozgałęzienia, zwiększając powierzchnię stykową dla połączeń synaptycznych.

W tabeli 9 przedstawiono wyniki obliczeń metodą  $D_3$ , w której oceniono rozprzestrzenienie się drzewa dendrytycznego. Wykazano znamienne różnice między wadami sinicznymi a grupą kontrolną i grupą wad bezsinicznych. W ten sposób dowiedziono, że wzrost drzewa dendrytycznego u chorych z wadami sinicznymi był upośledzony, w mózgach zaś bez zmian patologicznych i mózgach dzieci z wadami bezsinicznymi rozrost drzewa dendrytycznego przebiegał prawidłowo.

Analiza czynnika C (wiek) wydaje się wskazywać, że od 12 miesiąca życia ekspansja przestrzenna dendrytów jest bardzo wolna, lub też, że ekspansja ta kończy się w okolicy tego przedziału czasu. Nie stwierdzono bowiem znamiennej różnicy między poziomem  $C_2$  i  $C_3$ , tzn. między 12 i 24 miesiącem życia. Co jest jednak niezwykle, to wykazanie niewielkich różnic (dla  $p \leq 0,05$ ) pomiędzy okolicami mózgu. Okolica potyliczna (czynnik  $B_3$ ) różni się istotnie od pozostałych. Wyliczono dla tej okolicy największą liczbę przecięć dendrytów z brzegiem rastra, co przemawia za silniejszym wzrostem drzewa dendrytycznego w tej okolicy mózgu w porównaniu z innymi, które badano.



## OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych obserwacji wydają się jednoznacznie potwierdzać przydatność metody Golgiego w pewnych jej modyfikacjach do badań nad neuronami w mózgach ludzkich ze zmianami chorobowymi w wieku rozwojowym. Okazuje się, że w tych stanach chorobowych, w których rutynowymi metodami histologicznymi nie stwierdza się prawie żadnych lub tylko nieznaczne uszkodzenia komórek nerwowych, przy użyciu metod impregnacyjnych można wykazać zaburzenia rozwoju i zmiany w strukturze neuronów. W metodach barwnych liczebność komórek na jednostkę powierzchni prawie nie wykazuje zmian, co potwierdzają również nasze badania indeksu neuronalno-glejuowego. Patologia może natomiast dotyczyć elementów strukturalnych, których uwidocznienie jest możliwe tylko przy zastosowaniu metod impregnacyjnych. Według Schadé i wsp. (1964) przyrost masy mózgowia w rozwoju ontogenetycznym dokonuje się przez wzrost dendrytów i mielinizację włókien osiowych. Towarzyszy temu zjawisko względnego rozrzedzenia komórek nerwowych w korze, wyrażające się mniejszą liczbą neuronów na jednostkę powierzchni. Można więc przyjąć, że rozwijające się dendryty są szczególnie wrażliwe na działanie czynników szkodliwych. U dzieci z wrodzonymi wadami serca o typie wad sinicznych, jeśli przeżywają po urodzeniu odpowiednio długo, rozwijają się według Erbslöh (1958) zespoły adaptacyjne, dzięki którym niedostatek czynników warunkujących prawidłowy wzrost i rozwój wyrównywany jest przez inne czynniki, które umożliwiają tkance nerwowej przeżycie w tych bardzo niekorzystnych warunkach. Do najbardziej efektywnych elementów poprawiających przeżycie chorych dzieci z wrodzonymi wadami serca należy kompensacyjny wzrost sieci naczyń krwionośnych (Kałuża i wsp. 1988), który zwiększa powierzchnię naczyń w stosunku do masy mózgowia. Uruchomienie czynników wyrównujących niedostatki utlenowania tkanki nerwowej nie jest jednak w stanie zapobiec ujemnemu oddziaływaniu niedoboru tlenu na rozwój strukturalny i czynnościowy układu nerwowego.

Na podstawie badań Takashima i wsp. (1985) dotyczących zespołu nagłej śmierci niemowląt, u których stwierdzono opóźnienie rozwoju lub anomalie synaps neuronów pnia mózgowego oraz Purpury i wsp. (1980), którzy u dzieci z opóźnieniem rozwoju wykryli zaburzenia w układach aksodendrytycznych, można przyjąć, że prawidłowy rozwój wypustek neuronów i ich zakończeń ma zasadnicze znaczenie dla zachowania prawidłowej czynności ośrodkowego układu nerwowego. Zdaniem wyżej wymienionych autorów zaburzenia te są przyczyną zachwiania równowagi między pobudzeniem i hamowaniem w odpowiednich grupach neuronów, w wyniku czego może dojść albo do nadmiernego pobudzenia i padaczki, albo przeciwnie, do apatii i spowolnienia umysłowego i ruchowego. Zdaniem Hammerschlag (1983) rozwój i prawidłowa czynność siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego warunkuje wzrost drzewa dendrytycznego, które jest niezbędne do prawidłowej czynności mózgu. Schultze (1988) uważa, że hipoksja, czynniki toksyczne, jak również



substancje spichrzane w chorobach uwarunkowanych genetycznie (Adachi, Volk 1975), wpływają na rozwój siateczki śródplazmatycznej i doprowadzają do jej uszkodzenia i zniszczenia. Jak wynika z dotychczas przeprowadzonych badań między zachowaniem struktury i czynności siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego a rozwojem dendrytów zachodzi bezpośredni związek. Nasze badania przyczyniają się do potwierdzenia istnienia takiego związku. W grupie wad sinicznych wykazaliśmy zarówno opóźnienie rozwoju drzewa dendrytycznego, jak i zaburzenia strukturalne w rozgałęzieniach dendrytów. Badania metodą  $D_1$  (liczba odgałęzień od ciała komórkowego) wykazały statystycznie znamienne zmniejszenie się odgałęzień w grupie wad sinicznych. Podobne wyniki otrzymano dla metody  $D_2$  określającej liczbę rozgałęzień dendrytów, jak i dla metody  $D_3$  charakteryzującej ich ekspansję przestrzenną. Porównanie wartości liczbowych dających pogląd na rozwój struktury drzewa dendrytycznego w poszczególnych przedziałach czasowych wykazało, że rozwój ten dokonuje się nawet w takich stanach chorobowych jakimi są wady serca, włącznie z sinicznymi, chociaż w ostatnio wymienionej grupie w wolniejszym tempie.

Analiza wariancji nie dostarczyła żadnych dowodów istnienia różnic w rozwoju drzewa dendrytycznego między badanymi okolicami mózgu. Porównanie rozwoju dendrytów metodą  $D_3$  określającą ekspansję przestrzenną tych struktur w zależności od wieku zdaje się wskazywać na dwa okresy rozwoju. Pierwszy trwający do 12 miesiąca życia cechuje się intensywnym rozrostem rozgałęzień dendrytów, i drugi, trwający do 24 miesiąca, w którym ich ekspansja przestrzenna jest znacznie wolniejsza. Spostrzeżenie to jest zgodne z wynikami badań Schadé i wsp. (1964), którzy w prawidłowych mózgach obserwowali szybki wzrost dendrytów w okresie pierwszych 12 miesięcy życia, po czym następowało spowolnienie tego procesu.

Badanie zależności między rozwojem dendrytów a wadą rozwojową serca, okolicami mózgu i wiekiem dla każdej z par badanych osobno i wszystkich łącznie, stale wykazywało niedorozwój drzewa dendrytycznego w grupie wad sinicznych. Upoważnia nas to do stwierdzenia, że u dzieci z wrodzonymi wadami serca prowadzącymi do sinicy, dochodzi do uszkodzenia neuronu na poziomie ultrastrukturalnym i zaburzeń w rozwoju drzewa dendrytycznego. Można również przyjąć, że zmiany strukturalne w rozwoju dendrytów mogą być substratem morfologicznym dla objawów klinicznych występujących u dzieci z wadami rozwojowymi serca, w szczególności o typie wad sinicznych.



MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN  
CYANOTIC AND NONCYANOTIC CONGENITAL HEART FAILURES IN THE  
DEVELOPMENTAL AGE.

NERVE CELLS AND THEIR PROCESSES EVALUATED WITH STAINING  
METHODS, IMPREGNATION AND IN ELECTRON MICROSCOPE.

PART I. DEVELOPMENT OF DENDRITES ESTIMATED WITH  
THE USE OF GOLGI METHOD

Summary

Morphometric evaluation of cortical neurons in children with congenital heart defect of cyanotic and noncyanotic type was performed. Investigations based on autopsied material included three age groups of 6, 12 and 24 months respectively in both of the two groups with heart defect and in the control group. Formalin-fixed samples taken from frontal, parietal, occipital and temporal cortex were embedded in celoidin and slices were impregnated according to the Golgi procedure. The development of dendrites was estimated using three different and independent morphometric methods. The results were statistically analysed to reveal a putative mutual dependence between the type of disease, age and localization in cerebral hemispheres and development of dendrites.

The study disclosed significant differences in the dendritic tree in relation to the heart defect, especially that of cyanotic type as compared with the control group. A comparison between the groups with the heart defect and the control disclosed significant differences in the dendritic tree. The most remarkable difference was noted in the group of cyanotic heart disease in which the development of the dendritic tree was markedly retarded. No differences between particular localizations in cerebral hemispheres have been found. The validity of Golgi method for investigation of neuron structure was emphasized.

PIŚMIENICTWO

1. Adachi M., Volk B. W.: Pathology of GM<sub>2</sub> gangliosidosis. W: The gangliosidosis, Plenum Press, New York, 1975, pp. 74
2. Brodmann K.: Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in Ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. J. A. Barth Verlag, Leipzig, 1909.
3. Erbslöh E. E.: Hirnveränderungen bei den mit Blausucht einhergehenden Kardiopulmonalen Erkrankungen. W: Handb. der Speziellen Pathol. Anat. u. Histol. Erkrankungen des Zentral Nerven Systems. Springer, Berlin, 1958, 13/II, 1353–1385.
4. Fábregues I., Feerer I.: Abnormal perisomatic structures in non-pyramidal neurons in the cerebral cortex in Down's syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1983, 9, 165–170.
5. Hammerschlag R.: How do neuronal proteins know where they are going? Speculations on the role of molecular address markers. *Dev Neurosci*, 1983, 6, 2–17.
6. Huttenlocher P. R.: Dendrite development in neocortex of children with mental defect and infantile spasms. *Neurology*, 1974, 24, 203–210.
7. Kałuża J., Adamek W., Mieżyński W., Stolfa W.: Morfologiczne wykładniki zmian w ośrodkowym układzie nerwowym w sinicznych i niesinicznych wadach wrodzonych serca w wieku rozwojowym. I. Morfometryczna ocena unaczynienia mózgu i mózdzku we wrodzonych wadach sinicznych i niesinicznych serca. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 49–59.
8. Machado-Salas J. P.: Abnormal dendritic pattern and aberrant spine development in Bourneville's disease – a Golgi survey. *Clin Neuropathol*, 1984, 3, 52–58.
9. Purpura D. P., Schafer R. J., Hosepian E. M., Noback C. R.: Comparative ontogenesis of structure-function relations in cerebral and cerebellar cortex. W: Growth and maturation of the brain. Red. D. P. Purpura, I. P. Schädé. *Progress in Brain Research*, 1964, pp. 150–175.

10. Purpura D. P.: Dendritic spine dysgenesis and mental retardation. *Science*, 1974, 186, 1126–1128.
11. Purpura D. P., Highstein S. M., Karabelas A. B., Walkley S. U.: Intracellular recording and HRP-staining of cortical neurons in feline ganglioside storage disease. *Brain Res*, 1980, 181, 446–449.
12. Schadé I. P., Meeters K.: Neuronal and dendritic patterns in the uncinata area of the human hippocampus. W: *The rhinencephalon and related structures*. Red. W. Bargmann, I. P. Schadé. *Prog Brain Res*, 1963, 3, 89–110.
13. Schadé I. P., Van Backer H., Calon E.: Quantitative analysis of neuronal parameters in the maturing cerebral cortex. W: *Growth and maturation of the brain*. Red. D. P. Purpura, I. P. Schadé. *Prog Brain Res*, 1964, pp. 156–175.
14. Schultze F. J.: Pathophysiological mechanisms leading to permanent brain damage in surviving children. W: *Perinatal events and brain damage in surviving children*. Red. J. P. Kubli, W. Schmidt, E. Linderkamp. Springer, Berlin, 1988, pp. 58–63.
15. Takashima S., Mitro T., Becker I. W.: Neuronal development in the medullary reticular formation in sudden death syndrome and premature infants. *Neuropediatrics*, 1985, 16, 76–78.  
Adres autorów: Samodzielna Pracownia Neuropatologii, Instytut Neurologii AM, ul. Botaniczna 3, 31-503 Kraków.



ELŻBIETA KIDA, EWA MATYJA

## EXCITOTOXIN-MIMICKING EFFECT OF ZINC UPON THE ULTRASTRUCTURE OF RAT HIPPOCAMPUS *IN VITRO*

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

It is generally accepted that the biological activity of zinc exceeds by far the formation and functioning of the enzyme systems, as was previously assumed. Zinc is considered to play an important role in such physiological processes as: maintenance of membrane structure and function (Bettger, O'Dell 1981), uptake of some neurotransmitters (Gabrielsson et al. 1986), binding of glutamate aspartate and opiate to their receptors (Stengaard-Pedersen 1982; Slevin, Kasarskis 1985), stimulation of rapid axonal transport (Edström, Mattson 1975) or regulation of microtubule assemblies (Gaskin et al. 1978).

It was postulated recently, that zinc, blocking the action of the N-methyl-D-aspartate receptor might prevent normal levels of synaptic activity from becoming neurotoxic (Peters et al. 1987). Therefore, zinc might prevent the development of such human disorders, presumably connected with the NMDA receptor overactivity, as ischemia or epilepsy (Stone et al. 1987). Simultaneously, however, the results of some morphological studies reported cytotoxic properties of zinc (Kress et al. 1981; Yokoyama et al. 1986). Moreover, increased brain levels of zinc were found in Pick's disease (Constantinidis, Tissot 1981) and in experimental epilepsy (Chung, Johnson 1983).

We undertook the present study in order to examine if relatively low zinc concentrations, similar to those encountered *in vivo*, were sufficient to induce any morphological changes in the nerve tissue elements. We investigated the effect of zinc upon the ultrastructure of the hippocampus, a brain region with the highest calculated concentrations of zinc in the central nervous system *in vivo* (Donaldson et al. 1973) in a model of organotypic tissue culture technique.

### MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on organotypic cultures of rat hippocampus prepared from 2-3-day-old Wistar rats. Thin sections of the hippocampus dissected out under sterile conditions were placed on collagen-coated glass

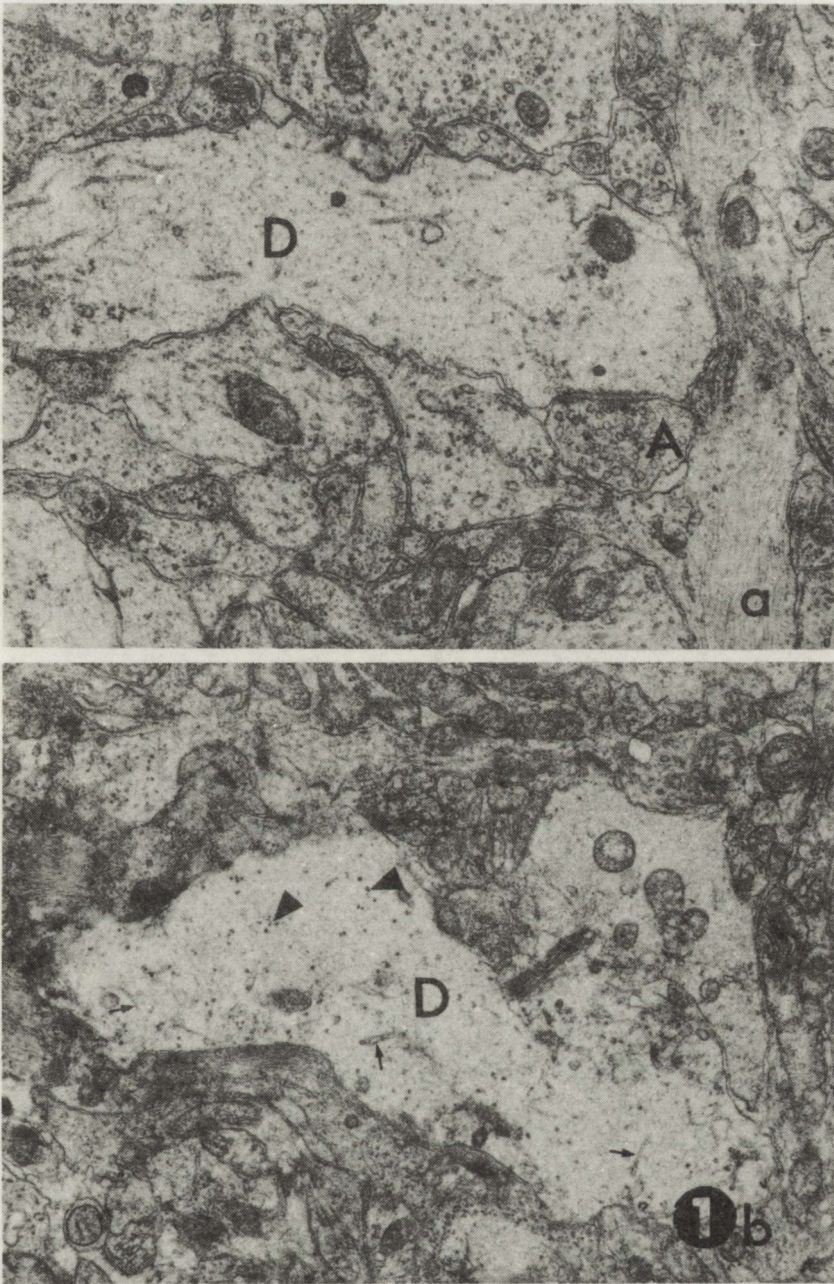
coverslips, covered with two drops of nutrient medium and maintained in Maximow assemblies at 36.5°C. The nutrient medium consisted of 20% heat-inactivated human serum and 80% Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 600 mg% glucose. The nutrient medium was renewed twice weekly.

The cultures were regularly examined by light microscopy. On the 21-st day of growth *in vitro* (DIV) selected cultures were exposed to the medium supplemented with zinc as chloride ( $ZnCl_2$ ) at a concentration of 100  $\mu M$ . Prior to the addition, MEM with zinc was filtered through a 0.45  $\mu m$  Milipore filter. Sister cultures were kept in standard conditions. 24 h after zinc addition the experimental, as well as control cultures were processed for electron microscopy according to routinely used methods. Briefly, the cultures were fixed in 1.5% glutaraldehyde, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in alcohols and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counterstained with lead citrate and uranyl acetate and examined in a JEM 100 B electron microscope.

## RESULTS

The cultures examined under the light microscope in living state, showed no distinct morphological alterations after exposure to zinc, as compared with control cultures. However, their electron-microscopic examination disclosed ultrastructural abnormalities involving both the neuropil and nerve and glial cells perikarya. The neuropil was composed of a dense network of neuronal and glial processes with numerous synapses of various type, similarly to the pattern of neuropil organization in control cultures. However, while the axon terminals showed intact ultrastructural features, in particular dendritic profiles distinct morphological changes were found. These postsynaptic elements were markedly swollen with electron-lucent appearance (Fig. 1a,b). In some of them only few, short, irregularly arranged microtubules and small vacuoles were present. In others, abnormal accumulation of mitochondria, usually with well preserved ultrastructure was seen (Fig. 2). Moreover, individual dendritic processes were filled with densely packed mitochondria leaving only small areas of electron-lucent protoplasm between. Dendritic alterations were not widespread, and besides distinctly altered dendrites, intact postsynaptic profiles were frequently found. Among the neuronal population, a great majority of pyramidal and granule nerve cells was well preserved (Fig. 3). However, some pyramidal neurons were distinctly affected and showed pronounced vacuolation of the cell cytoplasm (Fig. 4). The number and size of the vacuoles observed distinctly varied from cell to cell. In some areas small vacuoles were also seen in proximal dendrites (Fig. 5). Apart from vacuolar changes, individual nerve cells exhibited an increased number of large mitochondria, characterized usually by light matrix and short cristae (Fig. 6a). Similar, large mitochondria were observed in the adjacent dendritic processes, sometimes in

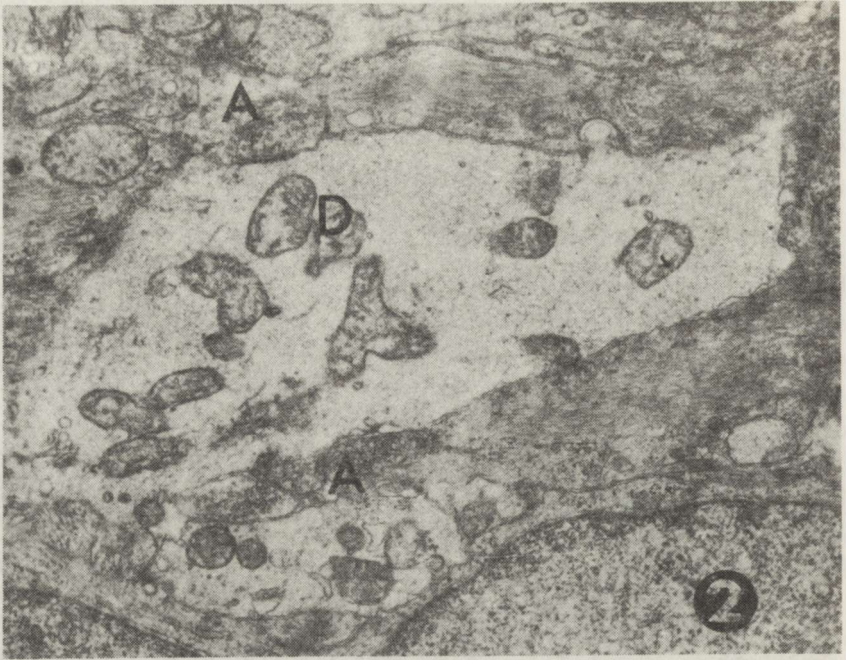




*Fig. 1a.* Swollen, electron-lucent dendritic process (D); well preserved axon endings (A) in the hippocampal culture exposed to  $100 \mu\text{M ZnCl}_2$ .  $\times 12\,000$ , *b.* Dendritic process containing few, disarranged microtubules (arrows) and dispersed ribosomes (arrow heads). The same culture.  $\times 7\,500$

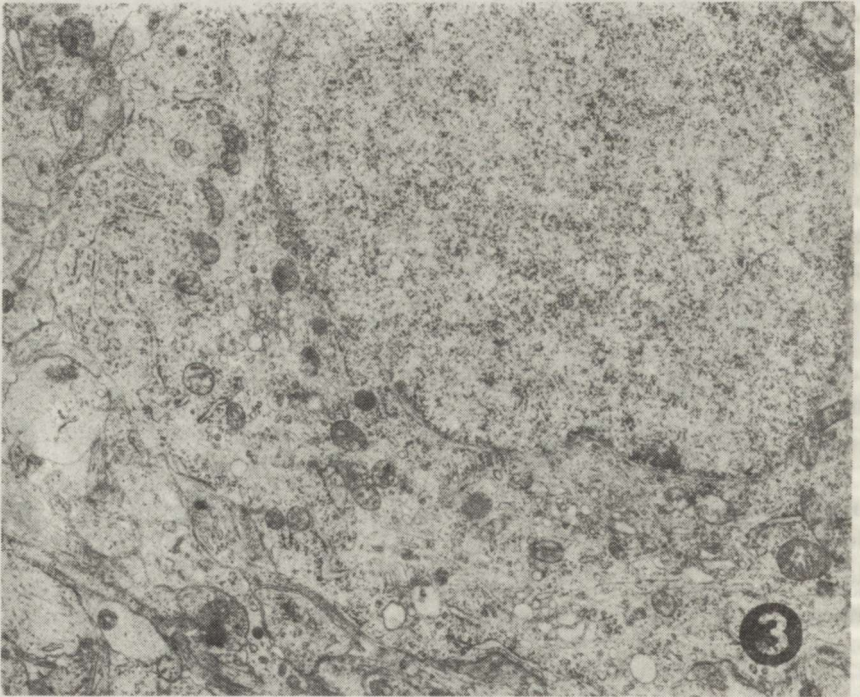
*Ryc. 1a.* Obrzmiała, elektronowo-jasna wypustka dendrytyczna (D). Prawidłowo zachowane zakończenia aksonalne (A) w hodowli hipokampa poddanej działaniu  $100 \mu\text{M ZnCl}_2$ . Pow.  $12\,000\times$  *b.* Wypustka dendrytyczna zawierająca nieliczne rozrzucone mikrotubule (strzałki) oraz rybosomy (groty strzałek). Ta sama hodowla. Pow.  $7\,500\times$





*Fig. 2.* Swollen dendritic process (D) with increased number of mitochondria, few microtubules and small vacuoles, and intact axon terminals (A). The same culture.  $\times 7500$

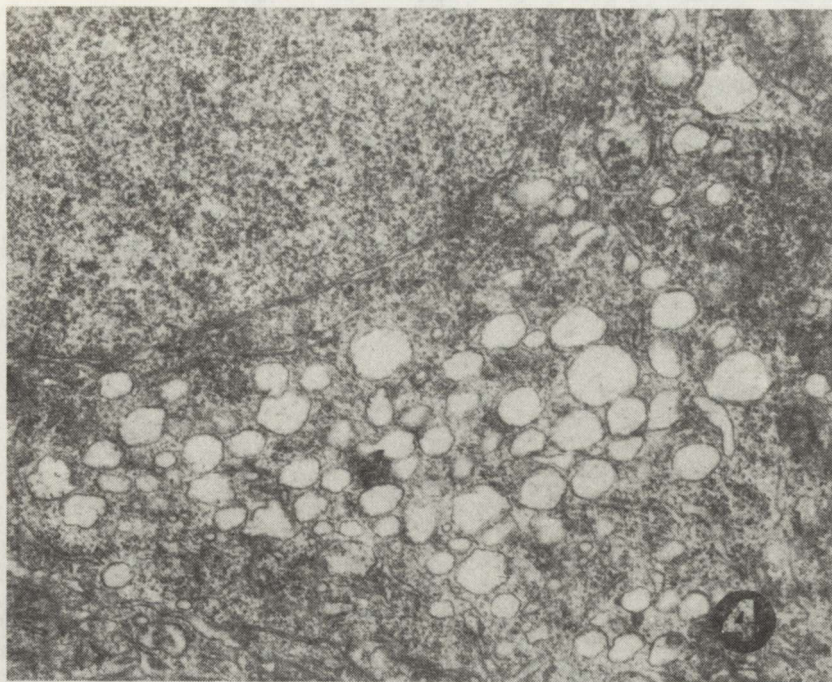
*Ryc. 2.* Obrzmiała wypustka dendrytyczna (D) ze zwiększoną ilością mitochondriów, nielicznymi mikrotubulami i małymi wakuolami. Nieuszkodzone zakończenie aksonalne (A). Ta sama hodowla. Pow.  $7500 \times$



*Fig. 3.* Well preserved pyramidal neuron. The same culture.  $\times 6000$

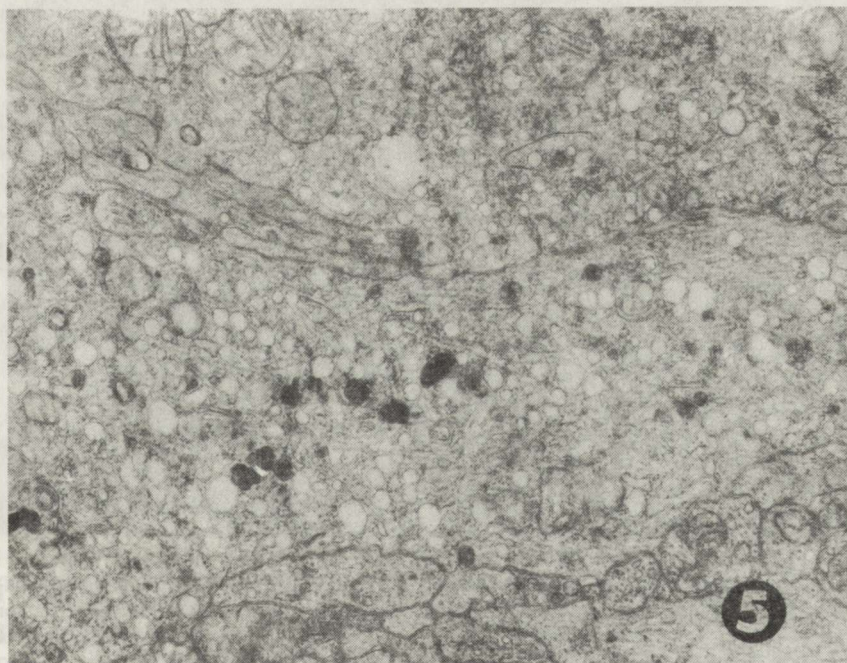
*Ryc. 3.* Prawidłowo zachowany neuron piramidowy. Ta sama hodowla. Pow.  $6000 \times$





*Fig. 4.* Pyramidal hippocampal neuron with numerous vacuoles (V) in the perikaryon. The same culture.  $\times 7500$

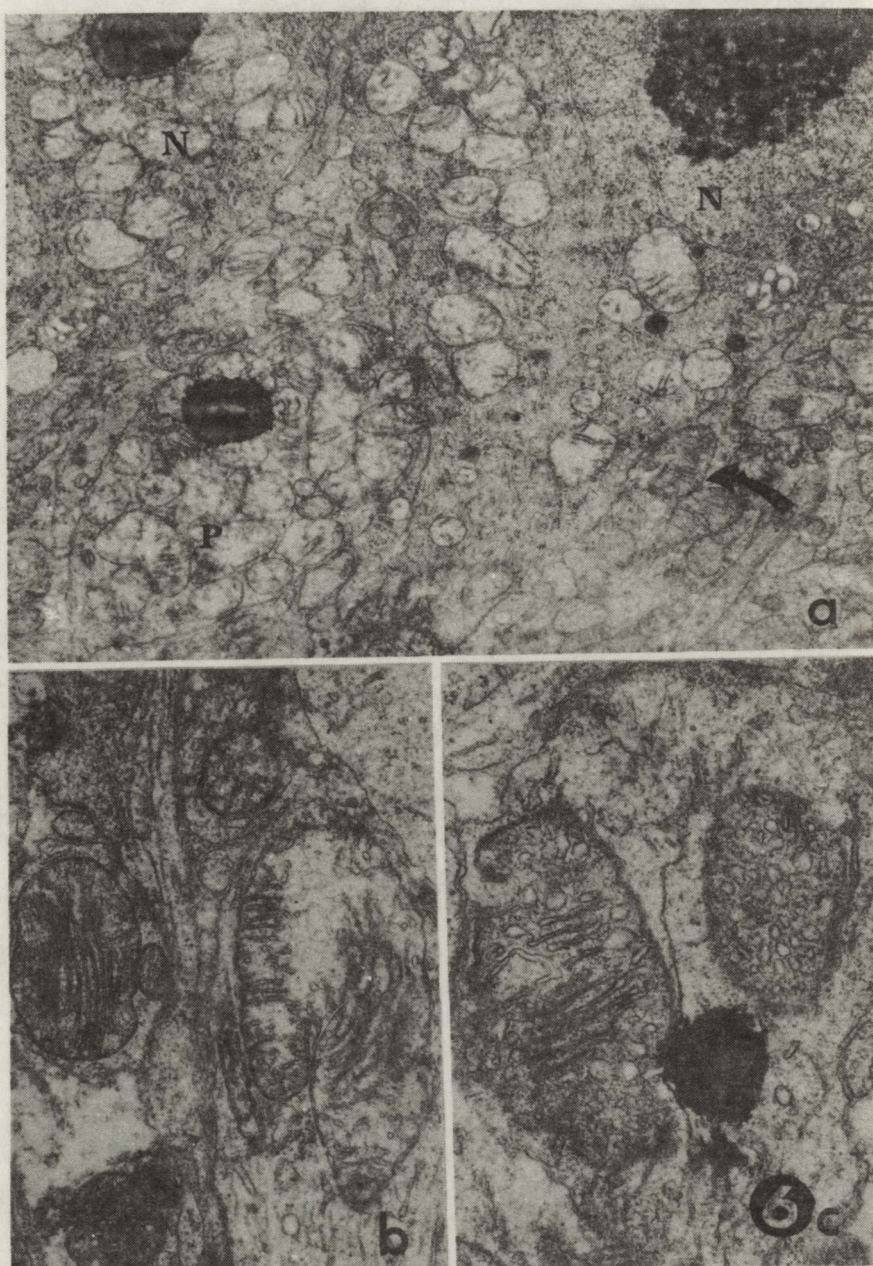
*Ryc. 4.* Neuron piramidowy hipokampa zawierający liczne wakuole (V) w cytoplazmie. Ta sama hodowla. Pow.  $7500\times$



*Fig. 5.* Proximal dendrite exhibiting numerous small vacuoles and dense bodies. The same culture.  $\times 7500$

*Ryc. 5.* Dendryt proksymalny zawierający liczne, drobne wakuole i ciała gęste. Ta sama hodowla. Pow.  $7500\times$





*Fig. 6.* Mitochondrial changes induced by  $ZnCl_2$  addition. The same culture, *a*. Numerous large mitochondria with electron lucent matrix and short cristae in the perikarya of nerve cells (N) and processes (P). Intact mitochondria in the adjacent processes (arrow).  $\times 6000$ , *b*. Large mitochondria in the neuronal processes.  $\times 10000$ , *c*. Large mitochondria with vesicular appearance of the cristae.  $\times 10000$

*Ryc. 6.* Zmiany mitochondrialne wywołane pod wpływem  $ZnCl_2$ , *a*. Liczne, duże mitochondria o elektronowo-jasnej macierzy i krótkich grzebieniach w cytoplazmie komórki nerwowej (N) i w wypustkach nerwowych (P). Prawidłowo zachowane mitochondria w leżących w pobliżu wypustkach neuronalnych (strzałka). Pow.  $6000\times$ , *b*. Duże mitochondria w wypustkach neuronalnych. Pow.  $10000\times$ , *c*. Duże mitochondria zawierające pęcherzykowe grzebienie. Pow.  $10000\times$



large quantities. Moreover, in some areas unusually large mitochondria, as well as mitochondria of bizarre shape or containing focally distended cristae with vesicular appearance were observed (Fig. 6b,c). The mitochondrial alterations disclosed could not represent artefactual changes, because in their close proximity nerve cells and their processes containing mitochondria with typical ultrastructure were found. Abnormal mitochondria, sometimes showing severe damage were present also in the glial cells cytoplasm (Fig. 7). Some astroglial cells showed, moreover, swelling of the cytoplasm and processes. In particular glial processes abundant glycogen particles were seen. Numerous nerve and glial cells or their processes contained lipid droplets, of variable, but usually rather high electron density.

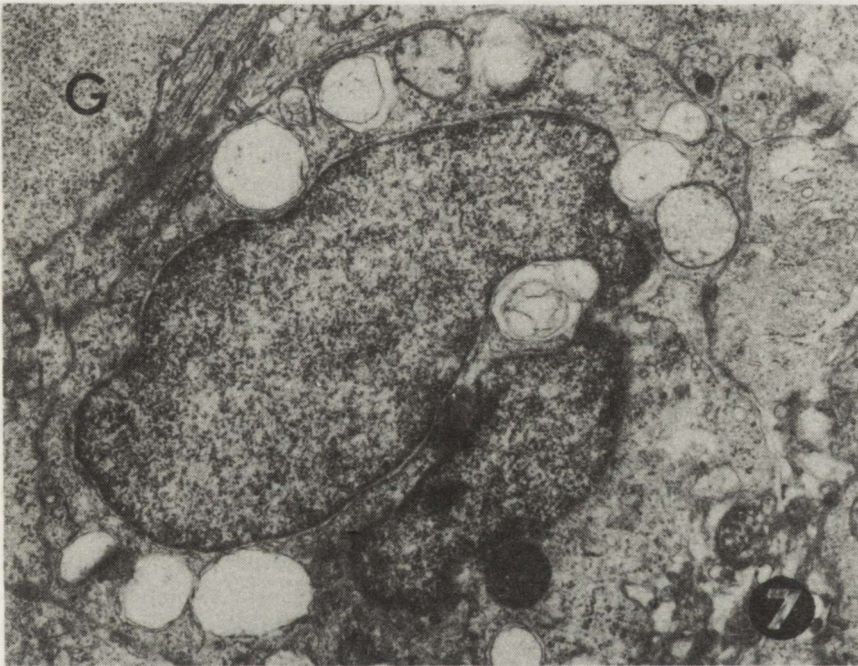


Fig. 7. Fibrous astrocyte with damaged mitochondria. Abundant glycogen particles in the adjacent glial processes (G). The same culture.  $\times 6000$

Ryc. 7. Astrocyt włóknisty zawierający uszkodzone mitochondria; liczne ziarnistości glikogenu w położonych w pobliżu wypustkach glejowych (G). Pow. 6000  $\times$

#### DISCUSSION

The results of the present study differ in many aspects from the pattern of morphological alterations observed after exposure to zinc in previous experiments. We could not find in our cultures either bundles of neurofilaments in neuronal perikarya, or abnormal sheets and 200–250 nm tubular structures disclosed in dorsal root ganglion cultures after 24 h exposure to 100  $\mu\text{M}$  zinc sulfate (Gaskin et al. 1978). The pattern of nerve cell alterations was somewhat similar, with the presence of perikaryal vacuolation, but without signs of severe



nerve cell degeneration reported previously. The above mentioned discrepancies might result from both: differences in regional sensitivity to zinc and the form of the zinc salts used in experiments. In dissociated neocortical cell cultures, however, examined at the light microscope level only, no cytotoxic effect of zinc chloride was seen after overnight addition of 100  $\mu\text{M}$  of zinc ions to the medium (Yokoyama et al. 1986). Moreover, in the same culture model, delivery of 100  $\mu\text{M}$  to 1 mM of  $\text{ZnCl}_2$  generally produced no change in membrane potential or conductance, a small transient hyperpolarization being noted only occasionally (Peters et al. 1987). Other experiments performed *in vivo*, with zinc wire implants, showed that at early times zinc had little effect on neurotubules and neurofilaments, affecting mitochondria and producing both axonal and dendritic abnormalities (Kress et al. 1981). It is of interest, however, that the authors mention that their preliminary results with mouse hippocampal cultures suggested that dendrites were more susceptible to zinc ions than axons, similarly to the results of our study. The axon-sparing, dendritic lesions observed in our cultures, as well as vacuolation of neuronal perikarya disclosed, strongly resembles the pattern of structural changes typically observed after various excitatory amino acid treatments (Schwarcz et al. 1983; Rothman, Olney 1987; Whetsell, Schwarcz 1983). The neurotoxic effect induced by these compounds, which act *via* their specific receptor sites, seems to be closely connected with their excitatory properties (Stone et al. 1987). In this respect it is especially interesting that application of zinc ions to the cortical neurons was also efficient in producing cell activation (Wright 1984). Electron-microscopic study demonstrated zinc in the synaptic vesicles of the terminal boutons of mossy fiber endings in the rat hippocampus (Ibata, Otsuka 1969). Moreover, zinc can be released during excitation of granule cells from their endings into the extracellular space (Assaf, Chung 1984). The results of our study suggest that even relatively low zinc concentrations are sufficient to produce structural alterations and thus support the previously postulated by these authors, presumably cytotoxic effects of this trace element. The exact pathomechanism of ultrastructural changes disclosed in our cultures is uncertain, because it is still unclear whether zinc participates actively in neurotransmission or is involved in the processes of neuromodulation. Mitochondrial structural changes induced by zinc, observed in the previous and the present study, are generally ascribed to the inhibition of electron transport in the mitochondrial respiratory chain (Chvapil et al. 1972). The biological significance of mitochondrial accumulation and their increased quantity revealed in our study might be only speculatively attributed to the increased energy requirement of the cell, presumably in response to excitation.



OBRAZ ZMIAN ULTRASTRUKTURALNYCH WYWOŁANYCH  
W HODOWLI HIPOKAMPA PRZEZ CYNKK, IMITUJĄCY USZKODZENIA  
TYPOWE DLA POBUDZAJĄCYCH NEUROTOKSYN

Streszczenie

Celem pracy była ocena obrazu ultrastrukturalnego hipokampa szczura poddanego *in vitro* działaniu cynku. Badania te podjęto wobec zmiennych doniesień wskazujących zarówno na cytoprotekcyjne właściwości jonów cynku, jak też na ich niekorzystne, neurotoksyczne oddziaływanie w ośrodkowym układzie nerwowym.

Badania przeprowadzono w warunkach organotypowej hodowli tkankowej, podając do płynu odżywczego dobrze zróżnicowanych, 21-dniowych hodowli hipokampa szczura cynk w postaci chlorku ( $ZnCl_2$ ) w stężeniu 100  $\mu M$ . Badania mikroskopowo-elektronowe przeprowadzono po 24 godzinach od podania cynku. Wykazano uszkodzenia strukturalne poszczególnych neuronów piramidowych polegające na wakuolizacji cytoplazmy oraz nagromadzeniu mitochondriów w cytoplazmie niektórych neuronów piramidowych i ich wypustek. Obserwowano ponadto uszkodzenie wypustek dendrytycznych w postaci ich obrzęku i zmian ultrastrukturalnych organelli komórkowych, przy wyraźnym zaoszczędzeniu presynaptycznych elementów aksonalnych. Stwierdzone zmiany strukturalne są analogiczne do typu uszkodzeń obserwowanych po podaniu aminokwasów pobudzających, co może wskazywać na podobny patomechanizm ich powstawania, a także potwierdzają możliwość neurotoksycznego działania cynku na tkankę nerwową.

REFERENCES

1. Assaf S. Y., Chung S. H.: Release of endogenous  $Zn^{2+}$  from brain tissue during activity. *Nature*, 1984, 308, 734–736.
2. Bettger W. J., O'Dell B. L.: A critical role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci*, 1981, 28, 1425–1438.
3. Chung S. H., Johnson M. S.: Divalent transition-metal ions ( $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ ) in the brain of epileptogenic and normal mice. *Brain Res*, 1983, 280, 323–334.
4. Chvapil M., Elias S. L., Ryan J. N., Zukoski C. F.: Pathophysiology of zinc. *Int Rev Neurobiol*, suppl. 1, 1972, 105–124.
5. Constantinidis C., Tissot R.: Role of glutamate and zinc in the hippocampal lesions of Pick's disease. In: *Glutamate as neurotransmitter*. Eds.: G. DiChiara, G. L. Gessa, Raven Press, New York, 1981, 413–422.
6. Donaldson J., St. Pierre T., Minnich J. L., Barbeau A.: Determination of  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  in rat brain regions. *Can J Biochem*, 1973, 51, 87–92.
7. Edström A., Mattson H.: Small amounts of zinc stimulate rapid axonal transport *in vitro*. *Brain Res*, 1975, 86, 162–167.
8. Gabrielsson B., Robson T., Norris D., Chung S. H.: Effects of divalent metal ions on the uptake of glutamate and GABA from synaptosomal fractions. *Brain Res*, 1986, 384, 218–223.
9. Gaskin F., Kress Y., Brosnan C. F., Bornstein M.: Abnormal tubulin aggregates induced by zinc sulfate in organotypic cultures of nerve tissue. *Neuroscience*, 1978, 3, 1117–1128.
10. Iбата Y., Otsuka N.: Electron microscopic demonstration of zinc in the hippocampal formation using Timm's sulfide-silver technique. *J Histochem Cytochem*, 1969, 17, 171–175.
11. Kress Y., Gaskin F., Brosnan C. F., Levine S.: Effects of zinc ions on the cytoskeletal proteins in the central nervous system of the rat. *Brain Res*, 1981, 220, 139–149.
12. Peters S., Koh J., Choi D. W.: Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science*, 1987, 236, 589–593.
13. Rothman S. M., Olney J. W.: Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci*, 1987, 10, 299–302.

14. Schwarcz R., Whetsell W. O., Mangano R. M.: Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316–318.
15. Slevin J.T., Kasarskis E.J.: Effects of glutamate and aspartate neurotransmission in rat hippocampus. *Brain Res*, 1985, 334, 281–286.
16. Stengaard-Pedersen K.: Inhibition of enkephalin binding to opiate receptors by zinc ions: possible physiological importance in the brain. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1982, 50, 213–220.
17. Stone T. W., Connick J.H., Winn P., Hastings M.H., English M.: Endogenous excitotoxin agents. In: *Selective neuronal death*. Eds.: G. Bock, M.O'Connor, Ciba Foundation Symposium 126, J. Wiley, Chichester, 1987, 204–220.
18. Whetsell W.O., Schwarcz R.: The organotypic tissue culture model of corticostriatal system used for examining amino acid neurotoxicity and its antagonism: studies on kainic acid, quinolinic acid and (-)-2-Amino-7 phosphonoheptanoic acid. *J Neural Transm*, suppl. 19, 1983, 53–63.
19. Wright D. M.: Zinc: effect and interaction with other cations in the cortex of the rat. *Brain Res*, 1984, 311, 343–347.
20. Yokoyama M., Koh J., Choi D. W.: Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neurosci Lett*, 1986, 71, 351–355.

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



JERZY DYMECKI, WILLIAM J. FREED

## WYNIKI MIĘDZYGATUNKOWYCH TRANSPLANTACJI ISTOTY CZARNEJ DO KOMORY BOCZNEJ MÓZGU SZCZURÓW Z DOŚWIADCZALNIE WYWOŁANYM PARKINSONIZMEM

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Warszawa i Sekcja Neurologicznych  
Badań Przedklinicznych Narodowego Instytutu Zdrowia Psychicznego, Waszyngton

Metoda kompensacji niedoboru dopaminy (DA) w prądkowiu, przez wszczęcie do mózgu żywych komórek, produkujących DA, stwarza nowe perspektywy w terapii choroby Parkinsona. Na zwierzęcych modelach parkinsonizmu przebadano szczegółowo efekty wszczęcia do mózgu różnych tkanek produkujących DA, a zwłaszcza istoty rdzennej nadnerczy i płodowej istoty czarnej (SN) (Freed i wsp. 1980; Freed 1983; Dymecki i wsp. 1985, 1986). Płodowa SN okazała się znacznie lepszym źródłem DA niż istota rdzenna nadnerczy. Użycie więc do leczenia transplantacyjnego choroby Parkinsona ludzkiej płodowej SN wydaje się znacznie bardziej celowe i obiecujące niż stosowanie autoprzeszczepów rdzenia nadnerczy, których pobranie z ciała chorego trwale go okalecza. Ponadto komórki nadnercza jako obce mózgowi nie mają możliwości trwałego przeżycia w mózgu gospodarza, a dyfuzyjny sposób wydzielania przez nie DA nie może zapewnić zaopatrzenia neuronów prądkowia w DA na drodze fizjologicznej, tzn. poprzez kontakty synaptyczne. Jednakże w wielu krajach pojawiają się problemy etyczne i prawne, utrudniające użycie ludzkiej płodowej tkanki nerwowej do celów terapeutycznych. W tej sytuacji zaczęto rozważać możliwość zastosowania przeszczepów obcogatunkowej SN. Wojak i wsp. (1988) wysunął sugestię wykorzystania do celów transplantacji terapeutycznych zamiast ludzkiej płodowej SN, neuronów dopaminergicznych pobranych ze śródmózgowia miniaturowych świnek. Od dawna proponowano też wykorzystanie płodów małych człekokształtnych do leczenia pacjentów z chorobą Parkinsona. Wiadomo, że tolerancja przeszczepu zależy od pokrewieństwa genetycznego między gatunkiem dawcy i biorcy, brak jednak w piśmiennictwie szczegółowych danych na temat losów obcogatunkowych przeszczepów tkanki nerwowej do mózgu. Badania licznych autorów

Praca przedstawiona na 9 Międzynarodowym Sympozjum na temat choroby Parkinsona, Jerozolima, 5–9 czerwca 1988 i opublikowana w pamiętniku Sympozjum



wskazują, że przeszczepy różnych tkanek w mózgu są częściowo chronione przed odrzuceniem (Barker, Billingham 1977; Raju, Grogan 1977; Brundin i wsp. 1985; Head, Griffin 1985; Freed i wsp. 1988), jednak tzw. „uprzywilejowanie immunologiczne” mózgu nie jest absolutne i stopień ochrony przeszczepu przed odrzuceniem zależy nie tylko od dystansu genetycznego między dawcą i biorcą, ale także od lokalizacji przeszczepu w mózgu i od innych, nie całkowicie poznanych czynników.

Celem podjętych badań była ocena przeżycia i funkcjonowania allo-, hetero- i ksenoprzeszczepów płodowej SN umiejscowionych w komorze bocznej mózgu szczurów z doświadczalnie wywołanym hemiparkinsonizmem.

#### MATERIAŁ I METODY

Hemiparkinsonizm był wywoływany przez jednostronne stereotaktyczne wstrzyknięcie 8  $\mu$ g 6-hydroksydopaminy (6-OHDA) rozpuszczonej w 4  $\mu$ l izotonicznego roztworu soli fizjologicznej z dodatkiem 0,1% kwasu askorbowego, do istoty czarnej po stronie prawej według metodyki opisanej przez Freeda i wsp. (1980). Biorcami przeszczepów były dwumiesięczne szczury wsobnego szczepu Fisher 344 w liczbie 100 zwierząt. Dawcami były płody królika (ksenoprzeszczepy), chomika (ksenoprzeszczepy), myszy szczepu CF<sub>1</sub> (heteroprzeszczepy), szczury szczepu Sprague-Dawley (alloprzeszczepy) i szczury szczepu wsobnego Fisher 344 (izoprzeszczepy – grupa kontrolna). Mysz i szczur są gatunkami blisko spokrewnionymi i należą do rodziny *muridae* (rząd *rodentiae*), chomik (rząd *rodentiae*) i królik (rząd *logormorpha*) wykazują dalsze pokrewieństwo do szczura. Brzuszna część śródmózgowia, zawierająca SN, była pobierana od płodów wymienionych gatunków w okresie odpowiadającym wiekowi 16–17 dni życia płodowego szczura, dzielona na kilka fragmentów po 1 mm<sup>3</sup> i wszczepiana do prawej komory bocznej mózgu szczura w aparacie stereotaktycznym Davida Kopfa w znieczuleniu ogólnym według metody opisanej w pracach Freeda (1983, 1985), w dwa tygodnie po chemicznym zniszczeniu tożsamostronnej SN. Nie stosowano żadnych środków immunosupresyjnych.

Po uszkodzeniu SN przeprowadzano co tydzień testy rotacyjne według Ungerstedta i Arbuthnotta (1970), prowokowane apomorfina podaną podskórną w dawce 0,1 mg/kg. Jak wiadomo, po jednostronnym uszkodzeniu SN występuje tendencja do ruchów obrotowych wokół własnej osi ciała na skutek dominacji prążkowiec po stronie nieuszkodzonej SN. Apomorfina działa na receptory dopaminergiczne w striatum, które po stronie uszkodzenia SN wykazują nadwrażliwość. Powoduje to ruchy obrotowe zwierzęcia w kierunku przeciwnym do uszkodzenia SN (kontralateralne). Obroty mierzono w specjalnie skonstruowanych rotometrach i rejestrowano przez mikroprocesor w ciągu 60 minut po podaniu apomorfiny. Do przeszczepów selekcjonowano tylko te zwierzęta, które w kilkakrotnie powtórzonym teście wykazywały minimum 240 obrotów na godzinę. Po transplantacji testy rotacyjne powtarzano co tydzień,



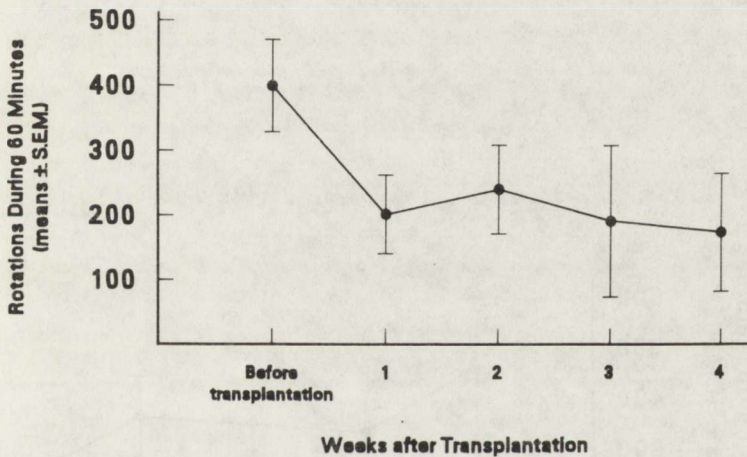
aby ocenić efekty działania przeszczepu w postaci zanikania lub zmniejszania się liczby obrotów.

Każda grupa zwierząt została podzielona na 4 podgrupy zależnie od czasu przeżycia, który wynosił 2, 4, 6 i 8 tygodni, licząc od dnia transplantacji. Zwierzęta dekapitowano lub perfundowano w znieczuleniu ogólnym. Na skrawkach mózgowych ujawniano immunoreaktywność hydroksylazy tyrozynowej (TH) techniką Sternbergera (1979) przy użyciu przeciwciał dostarczonych przez W. Tanka z Uniwersytetu w Rochester, N.Y., USA. Ponadto skrawki barwiono hematoksyliną i eozyną oraz metodą Klüvera–Barrery.

## WYNIKI

### Zachowanie rotacyjne

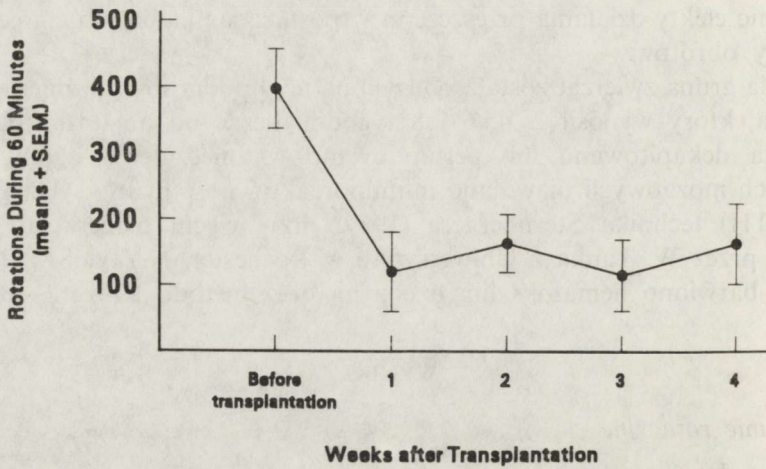
Testy obrotowe wywołane przy użyciu apomorfiny wykazywały postępujące i utrzymujące się obniżanie liczby obrotów w grupie zwierząt z izoprzeszczepami (szczur F 344 do szczura F 344) (ryc. 1). Stopniowe



Ryc. 1. Zachowanie rotacyjne wywołane przez apomorfinę u szczura Fisher 344 z uszkodzeniem SN przed i po transplantacji SN pobranej z mózgu szczura Fisher 344

Fig. 1. Rotational behavior induced by apomorphine in Fisher 344 rats with SN lesion before and after transplantation of Fisher 344 rat SN

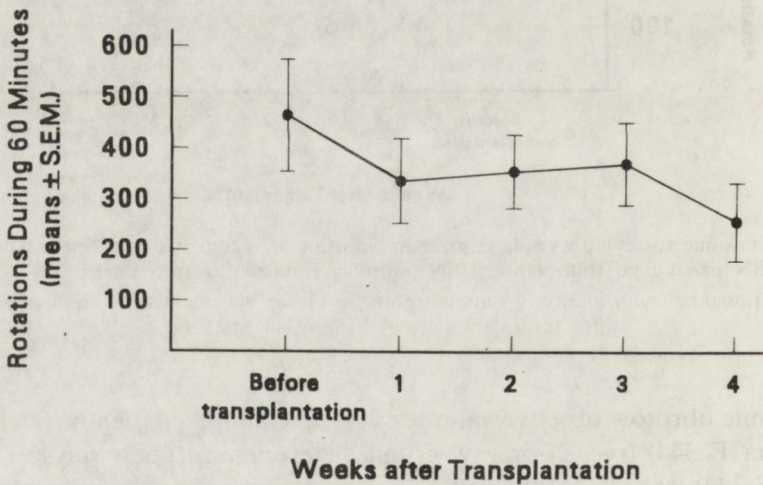
zmniejszanie obrotów obserwowano też w grupie alloprzeszczepów (szczur SD do szczura F 344) (ryc. 2) oraz w grupie heteroprzeszczepów (mysz CF<sub>1</sub> do szczura F 344) (ryc. 3). U zwierząt z ksenoprzeszczepami (chomik do szczura F 344) obniżenie liczby obrotów występowało do 5 tygodnia po transplantacji (ryc. 4). W drugiej grupie ksenoprzeszczepów (królik do szczura F 344) obniżenie to utrzymywało się tylko 3 tygodnie; po tym okresie liczba obrotów wracała do wartości sprzed transplantacji (ryc. 5, tabela 1).



2

Ryc. 2. Zachowanie rotacyjne wywołane przez apomorfine u szczura Fisher 344 z uszkodzeniem SN przed i po transplantacji SN pobranej z mózgu szczura Sprague-Dawley

Fig. 2. Rotational behavior induced by apomorphine in Fisher 344 rats with SN lesion before and after transplantation of Sprague-Dawley rat SN

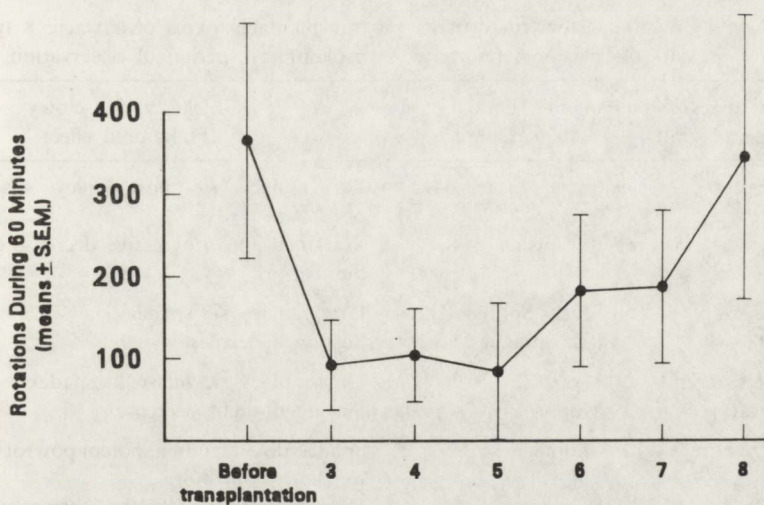


3

Ryc. 3. Zachowanie rotacyjne wywołane przez apomorfine u szczura Fisher 344 z uszkodzeniem SN przed i po transplantacji SN pobranej z mózgu myszy CF<sub>1</sub>

Fig. 3. Rotational behavior induced by apomorphine in rats with SN lesion before and after transplantation of CF<sub>1</sub> mouse SN



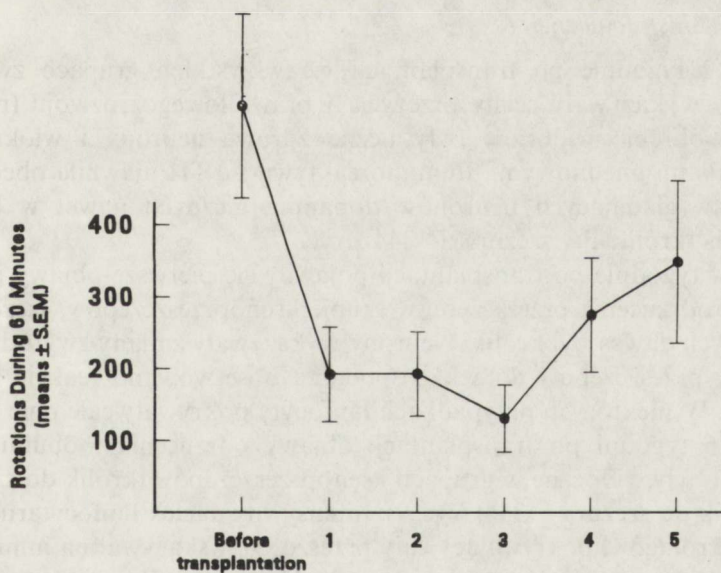


4

## Weeks after Transplantation

Ryc. 4. Zachowanie rotacyjne wywołane przez apomorfine u szczura Fisher 344 z uszkodzeniem SN przed i po transplantacji SN pobranej z mózgu chomika

Fig. 4. Rotational behavior induced by apomorphine in rats with SN lesion before and after transplantation of hamster SN



5

## Weeks after Transplantation

Ryc. 5. Zachowanie rotacyjne wywołane przez apomorfine u szczura Fisher 344 z uszkodzeniem SN przed i po transplantacji SN pobranej z mózgu królika

Fig. 5. Rotational behavior induced by apomorphine in rats with SN lesion before and after transplantation of rabbit SN

Tabela 1: Wyniki testów rotacyjnych po transplantacji, okres obserwacji: 8 tygodni  
 Table 1: Results of rotational tests after transplantation, period of observation: 8 weeks

Rodzaj przeszczepu Type of graft	Dawca Donor	Efekt czynnościowy Functional effect
Izoprzeszczep	Szczur Fisher 344	Utrzymujący się postępujący spadek liczby obrotów
Isograft	Rat Fisher 344	Sustained and progressive decrease of rotations number
Alloprzeszczep Allograft	Szczur Sprague-Dawley Rat Sprague-Dawley	Utrzymujący się spadek Sustained decrease
Heteroprzeszczep Heterograft	Mysz CF <sub>1</sub> Mouse CF <sub>1</sub>	Utrzymujący się niewielki spadek Sustained slight decrease
Ksenoprzeszczep	Chomik	Spadek do 5 tygodnia, potem powrót do wyjściowej liczby obrotów
Xenograft	Hamster	Decrease until the 5th week, then return to initial number of rotations
Ksenoprzeszczep	Królik	Spadek do 3 tygodnia, potem wzrost liczby obrotów
Xenograft	Rabbit	Decrease until the 3rd week, then increase in number of rotations

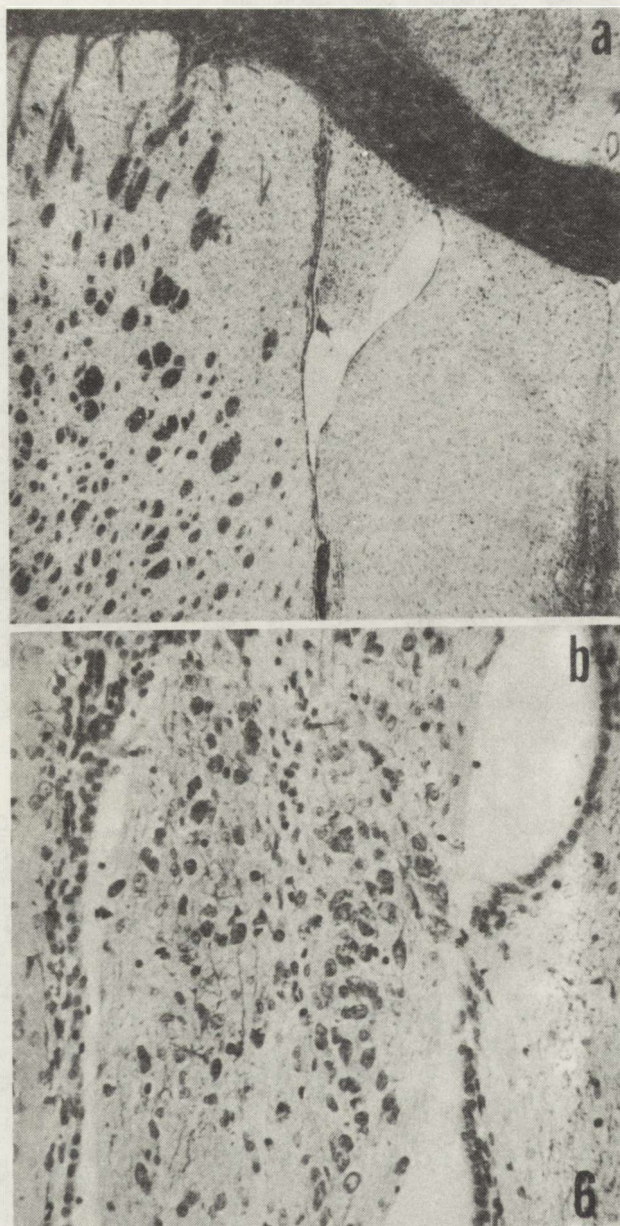
### Badania histologiczne

W 2 tygodnie po transplantacji we wszystkich grupach zwierząt przeszczepy wykazywały cechy przeżycia i prawidłowego rozwoju (ryc. 6a i 6b). W ich obrębie widoczne były liczne zdrowe neurony i włókna nerwowe z osłonkami mielinowymi. Immunoreaktywność TH ujawniła obecność prawidłowo wyglądających neuronów dopaminergicznych nawet w ksenoprzeszczepach (królik do szczura F 344) (ryc. 7).

W 4 tygodnie po transplantacji pojawiły się pierwsze objawy immunologicznego odrzucenia przeszczepu w grupie ksenoprzeszczepów, szczególnie tych, w których dawcą był królik. Neurony wykazywały zmiany zwyrodnieniowe, na granicy przeszczepu i tkanek gospodarza obserwowano reakcję limfocytarną (ryc. 8). W niektórych przypadkach limfocyty pokrywały całe pole przeszczepu.

W 6 tygodni po transplantacji objawy odrzucenia i obumierania przeszczepu były widoczne w grupach ksenoprzeszczepów (królik do szczura F 344 i chomik do szczura F 344) (ryc. 9). Intensywny naciek limfocytarny z obecnością makrofagów, pokrywający cały przeszczep, wskazywał na immunologiczny charakter procesu odrzucenia (ryc. 10). Heteroprzeszczepy (mysz do szczura F 344) wykazywały podobną, lecz znacznie mniej nasiloną reakcję występującą tylko u niektórych zwierząt. W grupie alloprzeszczepów i izoprzeszczepów prawidłowo wyglądające neurony i włókna mielinowe, obserwowane do końca doświadczenia, wskazywały w większości przypadków na przeżycie przeszczepu. Jednakże w obrębie niektórych przeszczepów, szczególnie tych, które





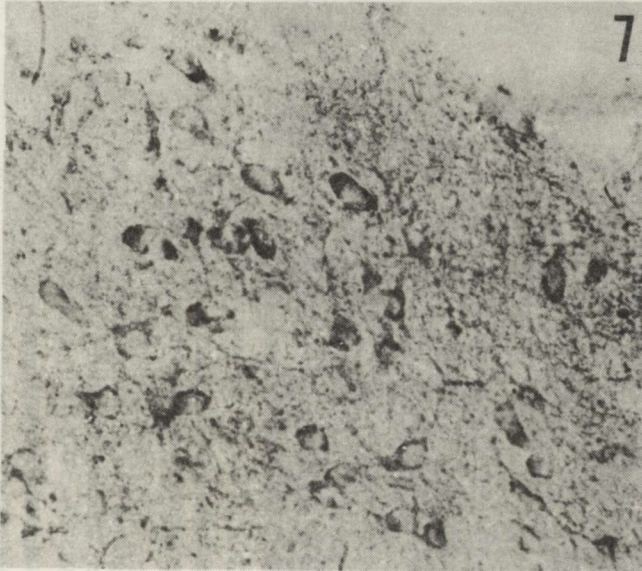
Ryc. 6a. Istota czarna królika wszczepiona do komory bocznej szczura F 344 w 2 tygodnie po transplantacji. Żywy przeszczep zespolony z prążkowiem i ciałem modzelowatym. Klüver-Barrera. Pow. 20 ×

Fig. 6a. Rabbit SN grafted into the lateral ventricle of rat 344, two weeks after transplantation. Surviving graft closely attached both to the striatum and to corpus callosum. Klüver-Barrera. × 20

Ryc. 6b. Ten sam przeszczep w powiększeniu 200 ×

Fig. 6b. The same graft under higher magnification — × 200





Ryc. 7. Istota czarna królika wszczepiona do komory bocznej szczura w dwa tygodnie po transplantacji. Immunoreaktywność hydroksylazy tyrozynowej wskazuje przeżycie neuronów. Pow. 200×

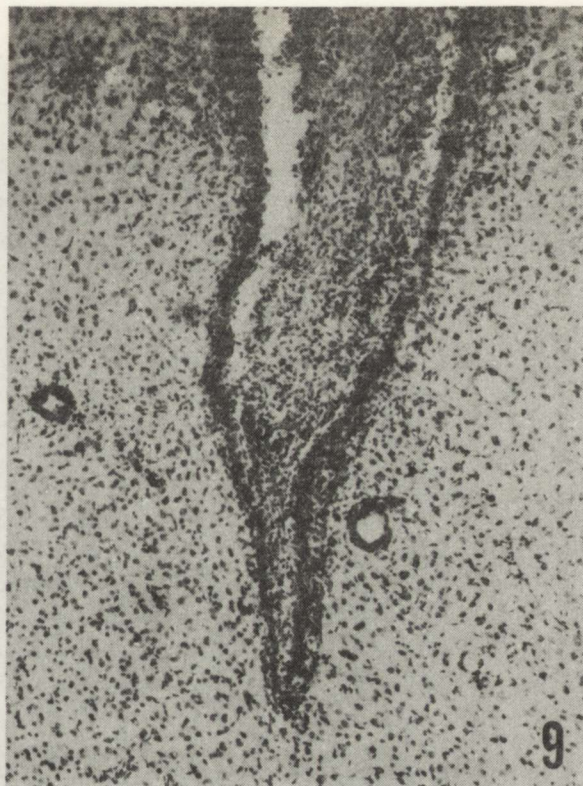
Fig. 7. Rabbit SN grafted into the rat lateral ventricle, two weeks after transplantation. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity demonstrates surviving neurons. × 200



Ryc. 8. Istota czarna królika wszczepiona do komory bocznej szczura w cztery tygodnie po transplantacji. Reakcja limfocytarna na pograniczu przeszczepu i tkanki gospodarza, H-E. Pow. 60×

Fig. 8. Rabbit SN grafted into the rat lateral ventricle, four weeks after transplantation. Lymphocytic reaction at the border of graft and host brain, H-E. × 60





Ryc. 9. Istota czarna chomika wszczepiona do komory bocznej szczura, 6 tygodni po transplantacji. Naciek limfocytny z licznymi limfocytami i makrofagami niszczy przeszczep. W tkance otaczającej liczne limfocytarne mufki okołonaczyniowe. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×

Fig. 9. Hamster SN grafted into the rat lateral ventricle, six weeks after transplantation. A pronounced cellular infiltration with many lymphocytes and macrophages destroying the graft. Perivascular lymphocytic cuffs are seen in the surrounding tissue. Cresylviolet. × 60



Ryc. 10. Istota czarna królika wszczepiona do komory bocznej szczura, 6 tygodni po transplantacji. Przeszczep, wypełniający komorę pokryty jest niszczącym go naciekiem limfocytnym. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×

Fig. 10. Rabbit SN grafted into the rat lateral ventricle, six weeks after transplantation. This graft, which fills the ventricle, has been destroyed by a lymphocytic infiltration. Cresyl violet. × 60



wbrew założeniom umiejscowione były w istocie białej lub w spoidle wielkim, populacja neuronów zastąpiona była przez bliznę glejowo-mezodermalną. Odsetek przeszczepów, które przeżyły do końca 8-tygodniowego okresu obserwacji, co potwierdzone zostało badaniem histologicznym, ilustruje tabela 2.

Tabela 2: Przeżycie przeszczepu wyrażone w odsetkach  
Table 2: Survival of the grafts expressed in percent

Rodzaj przeszczepu Type of graft	Dawca Donor	Liczba zwierząt Number of animals	Przeżycie przeszczepów Graft surviving	
			n	%
Izoprzeszczep Isograft	Szczur Fisher 344 Rat Fisher 344	20	17	85
Alloprzeszczep Allograft	Szczur Sprague-Dawley Rat Sprague-Dawley	20	14	70
Heteroprzeszczep Heterograft	Mysz CF <sub>1</sub> Mouse CF <sub>1</sub>	19	11	58
Ksenoprzeszczep Xenograft	Chomik Hamster	23	3	13
Ksenoprzeszczep Xenograft	Królik Rabbit	18	2	11

Kryteria przeżycia przeszczepu: a) metoda Klüvera—Barrery: dobrze zachowane błony komórkowe i jądrowe, jasne jądra, widoczny tigroid. Obecność włókien mielinowych, b) immunoreaktywność hydroksylazy tyrozynowej: pozytywne barwienie się neuronów z wyraźną błoną komórkową i wypustkami.

Criteria of graft survival: a) Klüver—Barrera method: well preserved nuclear and cytoplasmic membranes, bright nuclei, clearly visible tigroid. The presence of myelin fibers, b) TH immunoreactivity: positive staining of neurons with clearly delineated cytoplasmic membranes and processes

#### OMÓWIENIE

Efektywność czynnościowa przeszczepów w mózgu wyraża się zmniejszeniem liczby obrotów, indukowanych przez apomorfine, może więc być oceniana obiektywnie liczbowo. Po jednostronnym uszkodzeniu SN występuje nadwrażliwość postsynaptycznych receptorów dopaminergicznycch w prążkowie po stronie uszkodzenia. Podanie zwierzęciu apomorfiny powoduje aktywację nadwrażliwych neuronów *striatum*, co wywołuje ruchy obrotowe w kierunku przeciwnym do uszkodzenia SN (rotacje kontralateralne) (Freed 1983; Dymecki i wsp. 1985). Dla wywołania rotacyjnego zachowania się zwierząt można również podać amfetaminę, która uwalnia DA ze zdrowych neuronów prążkowie po stronie przeciwnej do uszkodzenia SN. Nasila to dominację nietkniętego prążkowie i wyzwala ruchy rotacyjne w kierunku uszkodzonej SN (rotacje ipsilateralne). Licząc obroty w określonym czasie można ocenić, czy uszkodzenie SN było całkowite, czy tylko częściowe.



Przeszczep umieszczony w komorze po stronie uszkodzonej SN zaopatruje w DA odnerwione prążkowie. Powoduje to redukcję obrotowego zachowania się zwierzęcia, wywołanego przez zniszczenie SN. Pomiar liczby obrotów jest więc wykładnikiem przeżycia i funkcjonalnej wydolności przeszczepu. W razie odrzucenia i obumierania przeszczepu zachowanie rotacyjne nasila się do punktu wyjściowego, tzn. do sytuacji po uszkodzeniu SN, a przed transplantacją (Freed 1983; Dymecki i wsp. 1987). Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że wszystkie przeszczepy powodują redukcję zachowania obrotowego zwierząt, jednak jej nasilenie i czas trwania wahają się w zależności od pokrewieństwa genetycznego między dawcą a biorcą. W grupach zwierząt z ksenoprzeszczepami (królik do szczura i chomik do szczura) zmniejszenie liczby obrotów trwało tylko odpowiednio 3 lub 5 tygodni. U szczurów z hetero-, allo- i izoprzeszczepami obniżenie zachowania rotacyjnego utrzymywało się do końca obserwacji, tzn. przez pełne 8 tygodni.

Analiza histologiczna wykazała, że czas przeżycia przeszczepu odpowiada w zasadzie okresowi poprawy w testach rotacyjnych. Intensywna reakcja limfocytarzna, zwłaszcza w obrębie ksenoprzeszczepów sugeruje immunologiczny charakter mechanizm odrzucania przeszczepu. Interesujący jest wpływ lokalizacji przeszczepu na jego przeżycie. Założeniem eksperymentu było umieszczenie wszystkich przeszczepów w komorze bocznej, jednakże w praktyce nie jest to łatwe i dopiero na etapie badania histologicznego okazało się, że niektóre przeszczepy zostały umieszczone w istocie białej lub w spoidle wielkim. Większość z nich obumarła, niezależnie od tego od jakiego dawcy pochodziła tkanka wszczepiona do mózgu. Badania Masona i wsp. (1985) nad allo- i ksenoprzeszczepami neuronów dopaminergicznych nie wykazały wpływu lokalizacji przeszczepu ani urazu, wywołanego przez procedurę transplantacyjną na przeżycie przeszczepu. Natomiast nasze ostatnio przeprowadzone badania (Dymecki i wsp. 1988a) nad zależnością między czasem przeżycia izoprzeszczepu korowego a jego lokalizacją w mózgu sugerują, że najlepsze warunki przeżycia występują, gdy przeszczep jest umiejscowiony w komorze bocznej, nieco gorsze w istocie szarej (*striatum*), a najmniejszy odsetek izoprzeszczepów rozwija się i przeżywa w istocie białej (*corpus callosum*). Wyniki te wykazują korelację z morfometryczną analizą gęstości sieci naczyniowej w przeszczepie (Dymecki i wsp. 1987, 1988b), która jest największa w izoprzeszczepach wewnątrzkomorowych, mniejsza w przeszczepach zlokalizowanych w istocie szarej, a najmniejsza przy umiejscowieniu transplantatu w istocie białej. Istnieje więc duże prawdopodobieństwo, że jednym z czynników warunkujących przeżycie przeszczepu jest jego wczesna i dostateczna waskularyzacja, mająca kluczowe znaczenie dla odżywiania przeszczepu. Dobre warunki dla przeżycia przeszczepu w obrębie komory bocznej mózgu mogą też w pewnym stopniu być zależne od odżywiania wszczepionej tkanki w najwcześniejszej fazie, zanim rozwinie się w przeszczepie własna sieć naczyniowa i zanim nastąpi jej integracja z układem naczyniowym gospodarza. W tej wczesnej fazie dyfuzyjne odżywianie wszczepionej tkanki przez płyn



mózgowo-rdzeniowy może mieć kluczowe znaczenie dla przeżycia przeszczepu. Niezadowolające wyniki, dotyczące przeżycia zarówno izo-, jak allo- i heteroprzyszczepów w obrębie ciała modelowego, stwierdzone w naszym materiale można więc wiązać z ubogim rozwojem unaczynienia przeszczepów umiejscowionych w istocie białej.

Przyczyna przeżycia przez okres 8 tygodni 11% przeszczepów tkanek królika i 13% przeszczepów tkanek chomika w mózgu szczura nie jest jasna. W piśmiennictwie istnieje szereg doniesień na temat długoterminowego przeżycia przeszczepów obcogatunkowych w mózgu gryzoni (Bragin, Vinogradova 1981; Björklund i wsp. 1982; Daniloff i wsp. 1984, 1985; Low i wsp. 1985; Vinogradova i wsp. 1985; Dymecki i wsp. 1987; Freed i wsp. 1988). Dowodzą one, że ksenoprzeszczepy mogą częściowo uniknąć odrzucenia nawet przy niestosowaniu środków immunosupresyjnych. Raju i Grogan (1977) sugerują, że istnieje krótki krytyczny okres zanim mózg „wyzdrowieje” po transplantacji i zanim przeszczep zintegruje się z gospodarzem, gdy mechanizm odrzucania ulega aktywacji lub zahamowaniu. Jednym z czynników, który może odgrywać istotną rolę w przeżyciu części ksenoprzeszczepów jest względny brak głównego kompleksu antygenów zgodności tkankowej (MHC) w tkance mózgu (Lampson, Hickey 1986). Tkanki zdrowego, normalnego mózgu zawierają stosunkowo mało głównych antygenów zgodności tkankowej (MHC), ale ekspresja antygenów MHC w mózgu może być zaktywizowana przez układową immunizację (Hickey, Kimura 1987). Odpowiedź immunologiczna mózgu na ksenoprzeszczep może być zależna od antygenów MHC, jak również od innych powierzchniowych antygenów komórkowych (Sachs i wsp. 1971). Można więc przypuszczać, że powodem faktu, że nie wszystkie ksenoprzeszczepy uległy odrzuceniu była z jednej strony nieobecność antygenów MHC w niektórych przypadkach, z drugiej – ochronny efekt częściowego „uprzywilejowania” immunologicznego mózgu. To „uprzywilejowanie” przypisywane jest brakowi układu limfatycznego w mózgu oraz obecności bariery krew-mózg, która stanowi selektywny filtr dla różnych substancji, być może także dla antygenów. Bariera ta jednak ulega uszkodzeniu w wyniku procedury przeszczepu i rekonstruuje się dopiero po około 7 dniach. Należy więc uwzględnić również fakt, że niedojrzała, płodowa tkanka nerwowa może wykazywać bardzo niewielką ekspresję antygenową, która u różnych dawców może mieć różne nasilenie. Podsumowując: przedstawione dane sugerują, że układ komorowy mózgu szczura jest częściowo uprzywilejowany immunologicznie w odniesieniu do płodowych alloprzeszczepów (szczur SD do szczura F 344) i heteroprzeszczepów (mysz do szczura), jednak to uprzywilejowanie nie jest wystarczające aby ochronić ksenoprzeszczepy przed odrzuceniem (królik i chomik do szczura) bez zastosowania środków immunosupresyjnych.



EFFECTS OF TRANSPLANTATION OF CROSS-SPECIES *SUBSTANTIA NIGRA* INTO THE LATERAL VENTRICLE OF RATS WITH EXPERIMENTALLY INDUCED HEMIPARKINSONISM

Summary

The method of compensation of dopamine (DA) deficit in the *striatum* by living, DA producing cells implanted into the brain, creates new hopes for patients with Parkinson's disease. In view of many ethical and legal problems, connected in some countries with obtaining human fetal tissue for transplantation, cross-species transplants would be an attractive alternative. The subject of our investigation was the problem of survival and functioning of embryonal *substantia nigra* (SN) neurons, taken from four species, implanted into the lateral ventricle of rats with denervated *striatum*. The recipients were 100 inbred rats of the Fisher 344 strain in which hemiparkinsonism was induced by unilateral chemical (6-OHDA) lesion of SN. As donor served foetuses of rabbits, hamsters, mouse CF<sub>1</sub> and Sprague-Dawley rats. Immunosuppressive drugs were not applied. The effectiveness of the transplants was estimated by testing the rotational behaviour before and after transplantation over a period of 8 weeks at weekly intervals. Survival of the transplant was evaluated by histological and immunocytochemical methods. Behavioural tests demonstrated a statistically significant improvement persisting in groups of xenografts for three to five weeks. Histological investigations revealed that the time of graft survival corresponds roughly to the period of improvement in the rotational behaviour. The results indicate that without application of immunosuppressive drugs intracerebral transplant between different species survive no more than several weeks. Thus, it is necessary to search for homogenic material for therapeutic transplantations in parkinsonian patients.

PIŚMIENNICTWO

1. Barker C.F., Billingham R.F.: Immunologically privileged sites. *Adv Immunol*, 1977, 23, 1-54.
2. Björklund A., Stenevi U., Dunnet S.B., Gage F.H.: Cross-species neural grafting in a rat model of Parkinson's disease. *Nature*, 1982, 298, 652-654.
3. Bragin A.G., Vinogradova O.S.: Homo- and hetero-specific transplantation of embryonal central nervous tissue (in Russian). *Bull Exp Biol Med*, 1981, 10, 486-489.
4. Brundin P., Nilsson O.G., Gage F.H., Björklund A.: Cyclosporin A increases survival of cross-species intrastriatal grafts of embryonic dopamine-containing neurons. *Exp Brain Res*, 1985, 60, 204-208.
5. Daniloff J.K., Low W.C., Bodony R.P., Wells J.: Cross-species neural transplants of embryonic septal nuclei to the hippocampal formation of adult rats. *Exp Brain Res*, 1985, 59, 73-82.
6. Daniloff J.K., Wells J., Ellis J.: Cross-species septal transplants recovery of choline acetyltransferase activity. *Brain Res*, 1984, 324, 151-154.
7. Dymecki J., Puciłowski O., Dyr W., Markiewicz D., Póltorak M., Kostowski W., Hauptmann M., Lipińska B.: Effects of intracerebral transplantation of immature *substantia nigra* in rats with experimentally induced Parkinson's disease. III. Results of behavioural and biochemical investigations. *Neuropat Pol*, 1985, 23, 287-295.
8. Dymecki J., Póltorak M., Markiewicz D., Hauptmann M., Dziedzic W., Kostowski W.: Effects of intracerebral transplantation of the adrenal medulla in rats with experimental Parkinson's disease. *Neuropat Pol*, 1986, 24, 29-42.
9. Dymecki J., Jędrzejewska A., Póltorak M., Puciłowski O., Bidziński A., Wośko W.: Effects of transplanting rabbit *substantia nigra* into the *striatum* of rats with experimental hemiparkinsonism. *Ann NY Acad Sci*, 1987, 495, 696-698.

10. Dymecki J., Węgiel J., Lee H.M., Rabe A., Vorbrodt A.W., Wiśniewski H.: Morphometric analysis of blood vessels development in a neocortical brain graft. W: Transplantation in the mammalian CNS: pre-clinical and clinical studies. Red. D.M. Gash, J.R. Sladek. Progress in Brain Research, vol. 78, Elsevier, Amsterdam, 1988.
11. Dymecki J., Wierzba-Bobrowicz T., Malec I., Dumański Z., Waniewski E., Jędrzejewska A., Poszwińska Z., Stefaniak N.: The development of vascular system in the intracerebral graft depending on the place of grafting in the brain. Clin Neuropathol, 1988a, 7, 161.
12. Dymecki J., Wierzba-Bobrowicz T., Malec I., Poszwińska Z., Stefaniak N.: The survival of intracerebral transplants depending on the place of grafting. 21 Danube Symposium for Neurological Sciences, Abstracts, 1988b, 109.
13. Freed W.J.: Functional brain tissue transplantation: reversal of lesion-induced rotation by intraventricular *substantia nigra* and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retinal grafts. Biol Psychiatry, 1983, 18, 1205–1267.
14. Freed W.J.: Transplantation of tissues to the cerebral ventricles: methodological details and rate of graft survival. W: Neuronal grafting in the mammalian CNS. Red. A. Björklund, U. Stenevi, Elsevier, Amsterdam, 1985, 31–40.
15. Freed W.J., Dymecki J., Póltorak M., Rodgers C.: Survival and rejection of intraventricular brain isografts, homografts, allografts and heterografts. W: Transplantation in the mammalian CNS: pre-clinical and clinical studies. Red. D.M. Gash, J.R. Sladek. Progress in Brain Research, vol. 78, Elsevier, Amsterdam, 1988.
16. Freed W.J., Hoffer B.J., Olson L., Wyatt R.J.: Transplantation of catecholamine-containing tissues to restore the functional capacity of the damaged nigrostriatal system. W: Neural transplants. Red. J.R. Sladek, D.M. Gash, Plenum Publ. Corp., New York, 1984, 373–406.
17. Freed W.J., Perlow M.J., Karoum F., Seiger A., Olson L., Hoffer B.J., Wyatt R.J.: Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat *substantia nigra* to the caudate nucleus: longterm behavioral, biochemical and histochemical studies. Ann Neurol, 1980, 8, 510–519.
18. Head J.R., Griffin A.T.: Functional capacity of solid tissue transplants in the brain: evidence for immunological privilege. Proc R Soc Lond (Biol), 1985, 224, 375–387.
19. Hickey W.F., Kimura H.: Graft-vs-host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84, 2082–2086.
20. Lampson L.A., Hickey W.F.: Monoclonal antibody analysis of MHC expression in human brain biopsies: tissue ranging from “histologically normal” to that showing different levels of glial tumor involvement. J Immunol, 1986, 136, 4054–4063.
21. Low W.C., Daniloff J.K., Bodony R.P., Wells J.: Cross-species transplants of cholinergic neurons and the recovery of function. W: Neural grafting in the mammalian CNS. Red. A. Björklund, U. Stenevi, Elsevier, Amsterdam, 1985, 575–584.
22. Mason D.W., Charlton H.M., Jones A., Parry D.M., Simmonds S.J.: Immunology of allograft rejection in mammals. W: Neural grafting in the mammalian CNS. Red. A. Björklund, U. Stenevi, Elsevier, Amsterdam, 1985, 91–98.
23. Raju S., Grogan J.B.: Immunological study of brain privileged site. Transplant Proc, 1977, 9, 1187–1191.
24. Sachs D.H., Winn H.J., Russel P.S.: The immunologic response to xenografts: recognition of mouse H-2 histocompatibility antigens by the rats. J Immunol, 1971, 107, 481–492.
25. Sternberger L.A.: Immunocytochemistry, 2nd ed., Wiley, New York, 1979.
26. Ungerstedt L.A., Arbuthnott G.W.: Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxydopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. Brain Res, 1970, 24, 4865–4893.
27. Vinogradova O.S., Bragin A.G., Kitchigina V.S.: Spontaneous and evoked activity of neurons in intrabrain allo- and xenografts of the hippocampus and septum. W: Neural grafting in the mammalian CNS. Red. A. Björklund, U. Stenevi, Elsevier, Amsterdam, 1985, 409–419.



28. Wojak J.C., Brandeis L., Michel J.P., Pearson J., Flamm E.S., Freeman T.B.: Xenogenic intracerebral grafting of embryonic miniature swine dopaminergic neurons. W: Transplantation in the mammalian CNS: pre-clinical and clinical studies. Red. D. M. Gash, J. R. Sladek, Progress in Brain Research, Elsevier, Amsterdam, 1988

Adres autorów: Prof. J. Dymecki, Zakład Neuropatologii Instytutu Psychiatrii i Neurologii, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

HALINA KROH

## GLIAL ELEMENTS IN EXPERIMENTAL CEREBRAL SARCOMAS

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

Intracranial sarcomas are a common finding among tumors intracerebrally induced in mice with topical cancerogens. They grow mostly as spherical masses sharply demarcated from the nervous tissue or invade the brain along the vessels in finger-like manner. Beside glial tissue, between the tongues of sarcomatous infiltration, other glial formations confined to the tumor area are hardly recognized. In humans, sarcomatous growth shows frequently peritumoral reactive glia and small islands of nervous tissue incorporated into the tumor and consisting of hyperplastic and neoplastic glial elements (Lalitha, Rubinstein 1979).

In the search for glial tissue concealed in murine cerebral mesodermal tumors for evaluation of its distribution and alterations, immunocytochemical investigations of glial fibrillary acidic protein (GFAP) containing elements were performed.

### MATERIAL AND METHODS

From the collection of CNS tumors induced by implantation of methylcholanthrene, previously reported and described in detail (Kroh 1967, 1969) 20 cases of brain sarcomas were selected for reinvestigation. Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue has been diagnosed from hematoxylin-eosin, Gridley and van Gieson stained, 7  $\mu$ m thick cross-sections of the brains. Among 20 tumors there were 11 fibrosarcomas and 9 giant cell sarcomas. The blocks used for immunocytochemical study were 20 years old. Antiserum to GFAP was from Dacopatts (Copenhagen), dilution 1:500. The Avidin-Biotin-Complex method was used for immunostaining.

### RESULTS

**Histology.** Intracerebral fibrosarcomas presented infiltrative, finger-like tumor spread from the main mass of neoplasm in 5 cases. In other 4 cases the tumor periphery was well delineated, whereas the precise margins of 2 tumors remained unknown due to artificial damage.



Small fields composed of several glial cells were incorporated into the peripheral zone of fibrosarcomas, some near their edges, whereas others, more numerous, were located between the advancing sarcomatous infiltrations. Glial islands totally surrounded by neoplastic tissue were present within the advancing portion of the sarcoma independently of the type of spread, infiltrative or circumscribed.

The majority of cerebral fibrosarcomas (7 of 11) exhibited also an extracranial part of the tumor whose histology did not grossly differ from the intracerebral mass. Vascularization of both, intra- or extracerebral tumor growth was similar, the blood vessels merged with the tumor tissue and could be recognized only by their narrow lumen. Vascularization of glial islands inside the tumor mass and of the nervous tissue abutting on the sarcoma margin did not differ significantly from the other parts of adjacent edematous tissue.

Intracerebral giant cell sarcomas formed masses well delineated from the nervous tissue in 7 of 9 cases: the remaining ones were infiltrative. The glial islands which were incorporated also within the marginal zone of the tumor were less numerous than in fibrosarcomas. The vascular network in cerebral, intra- et extracranial parts of the tumor was hardly discernible in some cases, whereas distinct and abundant in others. An extracranial component of the tumor was present in the majority of cases (8/9).

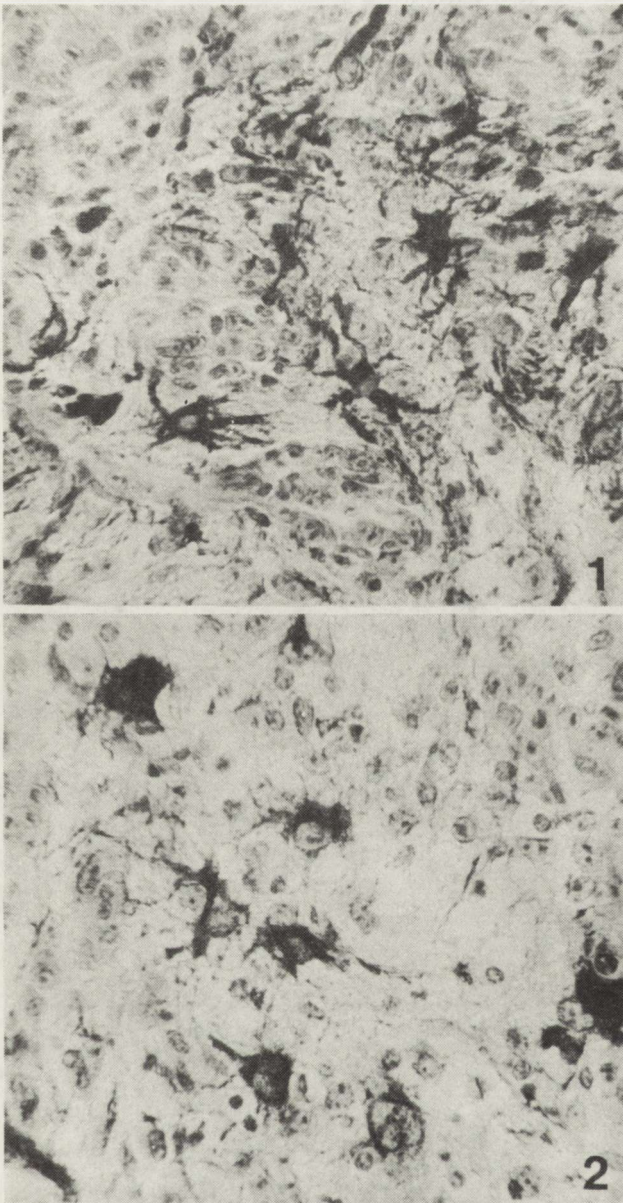
GFAP immunocytochemistry. All cerebral and extracerebral parts of the tumors of both types were composed of GFAP-immunonegative neoplastic cells, i.e. spindle cells, polymorphic cells and giant cells, small lymphoid-like cells. One exception was an extracerebral part of a giant cell sarcoma which displayed some giant and some lymphoid-like cells presenting a scarce granular, cytoplasmic GFAP reaction.

Glial cells entrapped by the tumor in the islands of nerve tissue were strongly immunopositive in all cases. GFAP-immunostained reactive astrocytes were enlarged, their shape and arrangement of processes irregular (Fig. 1). Frequently only parts of thick processes or large perikaryon were visible. Less frequently islands of astrocytic, GFAP-positive cells presented an admixture of oligodendroglia (Fig. 2).

Central areas of tumors presented singular, scattered, GFAP-positive cells or their processes in the midst of 3 cerebral fibrosarcomas and 1 giant cell sarcoma only (Fig. 3). The number of GFAP-positive cells increased slightly towards the periphery of these tumors.

Blood vessels of intracerebral fibrosarcomas were frequently surrounded by strongly GFAP-positive cellular bodies and processes, particularly near the tumor margins (Fig. 4, 5) (5 cases). Immunostaining of perivascular tissue of the whole cross-section of the cerebral fibrosarcomas was demonstrated in 2 cases. On the contrary, the cerebral giant cell sarcomas displayed none GFAP immunostaining of perivascular tissue in 5 cases (Fig. 6). Perivascular staining of low intensity around a few scattered vessels was revealed in one tumor,





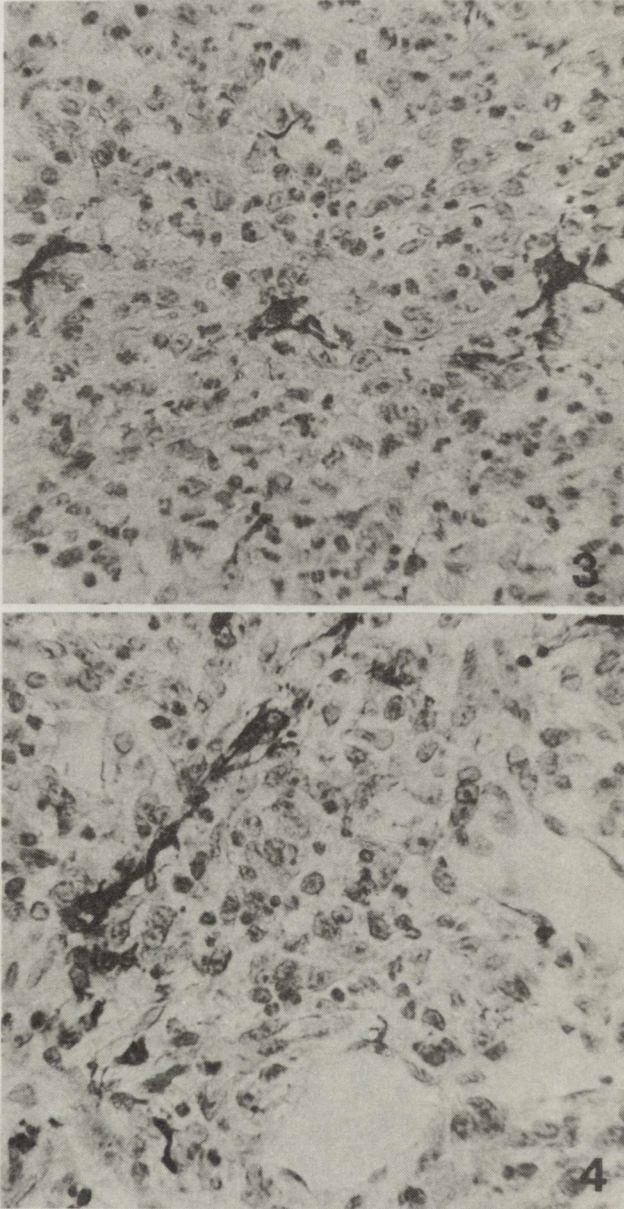
*Fig. 1.* Island of GFAP-positive astrocytes in peripheral area of fibrosarcoma.  $\times 400$

*Ryc. 1.* Wysepka GFAP-dodatnich astrocytów w obwodowej części włókniako-mięsaka. Pow.  $400\times$

*Fig. 2.* Group of GFAP-positive astrocytes and a few oligodendroglial cells in fibrosarcoma.  $\times 400$

*Ryc. 2.* Grupa GFAP-dodatnich astrocytów i kilka komórek oligodendrogleju we włókniako-mięsaku. Pow.  $400\times$

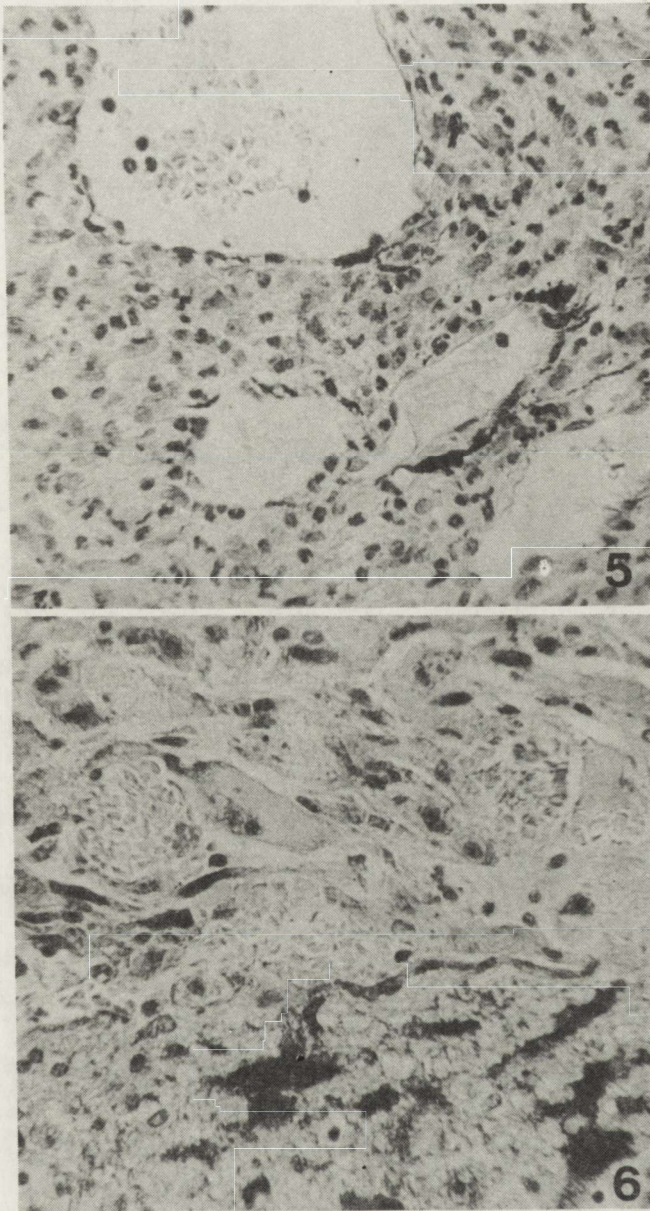




*Fig. 3.* Three GFAP-positive astrocytic cells in central part of fibrosarcoma.  $\times 400$   
*Ryc. 3.* Trzy GFAP-immunododatnie astrocyty w centralnej części włókniako-mięsaka. Pow.  $400 \times$

*Fig. 4.* GFAP-positive perivascular elements and negative surrounding of thin-walled vessels in fibrosarcoma.  $\times 400$

*Ryc. 4.* GFAP-immunododatnie elementy okołonaczyniowe oraz immunoujemne otoczenie cienkościennych naczyń we włókniako-mięsaku. Pow.  $400 \times$



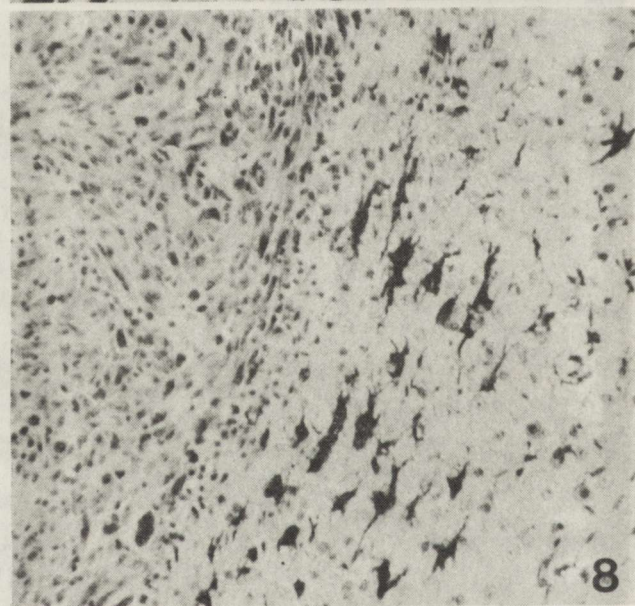
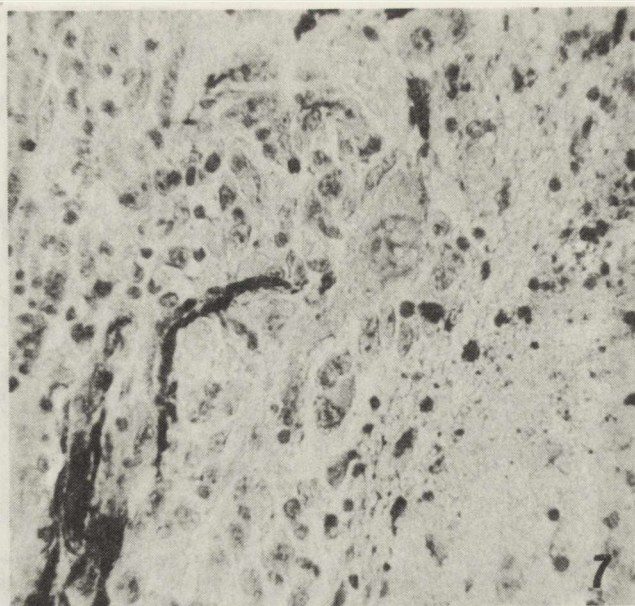
*Fig. 5.* GFAP-positive perivascular elements of sinusoidal vessels in fibrosarcoma.  $\times 400$

*Ryc. 5.* GFAP-immunododatnie elementy okołonacyniowe wokół naczyń zatokowatych we włókniało-mięsaku. Pow.  $400\times$

*Fig. 6.* Negative GFAP immunostaining of perivascular elements at the margin of giant cell sarcoma. Positive staining of astrocytes in peritumoral zone.  $\times 400$

*Ryc. 6.* Brak odczynu GFAP w elementach okołonacyniowych w części brzeżnej mięsaka olbrzymiokomórkowego. Dodatni odczyn w astrocytach tkanki okołoguzowej. Pow.  $400\times$





*Fig. 7.* GFAP-immunostained elements abutting on the blood vessels near the margin of giant cell sarcoma.  $\times 400$

*Ryc. 7.* GFAP-immunododatnie elementy komórkowe przylegające do ścian naczyń w części brzeżnej mięsaka olbrzymiokomórkowego. Pow.  $400\times$

*Fig. 8.* GFAP-immunostained reactive astrocytes in the zone of peritumoral edema in fibrosarcoma.  $\times 200$

*Ryc. 8.* GFAP-immunododatnie astrocyty odczynowe w obrzękowej tkance wokół włóknia-ko-mięsaka. Pow.  $200\times$

another one presented immunostained astrocytes abutting on blood vessels in the marginal zone (Fig. 7).

Perivascular tissue was GFAP-immunonegative in all extracerebral components of fibrosarcomas and giant cell sarcomas.

A chance finding was a row of GFAP-positive cellular processes, probably a residue of subpial glial fibres between the intra- and extracerebral part of the tumor.

Strong GFAP immunostaining was expressed by the reactive astrocytes contiguous to the tumors margin as well as in the peritumoral zone of edema (Fig. 8).

#### DISCUSSION

The glial component of experimental brain sarcomas was not reported in the earliest papers (Seligman, Shear 1939; Arnold, Zimmerman 1943; Zimmerman, Arnold 1943). "Ortständige Gliazellen" have been noted in experimental sarcomas by Jänisch (1966), but due to the scarcity of spontaneous cerebral sarcomas and the discontinued since method of their topical induction, the problem of intratumoral glia was not investigated any further. Recently immunocytochemical identification of even singular cellular elements or their fragments in tissue of alien origin allowed to continue the study.

The lack of GFAP-positivity in neoplastic cells of both types of murine sarcomas confirms the observations on human cerebral sarcomas (Eng, Rubinstein 1978; Duffy et al. 1980; Schiffer et al. 1980) and on the mesodermal component of gliosarcomas (Deck et al. 1978; Schiffer et al. 1983; Bonnin, Rubinstein 1984; Slowik et al. 1985). In the presented murine sarcomas the glial elements beside scarce number of oligodendroglial cells are represented by the immunostained scattered and grouped astrocytic cells and some preserved perivascular structures. In normal conditions the human and murine nervous tissue displays, also in EM the distinct immunohistochemical GFAP reaction product in the astrocytic endfeet abutting on the blood vessel walls (Schachner et al. 1977; Vander Meulen et al. 1978).

In the present material perivascular GFAP-positive astrocytes are much better demonstrated in fibrosarcomas which to a great extent invade the nervous tissue from the meninges than in giant cell sarcoma which reveals a lack of the GFAP-positive layer of astrocytes or their endfeet, particularly in the central areas of tumors. The difference may be evidence of early destruction of perivascular astrocytes by neoplastic proliferation originating in the vascular walls. In human gliomas the pericapillary or perivascular GFAP immunostaining varies from fragmentary (Van der Meulen et al. 1978) to well marked (Kimura et al. 1986; Cras et al. 1988). The idea that all the vessels in giant cell sarcoma originate from the neoplastic growth and, therefore, are lacking their GFAP-positive surrounding cannot be ignored. On the contrary, the majority of the vessels of a fibrosarcoma might be of autochthonous cerebral origin.



The reason for the long lasting discussion on the origin of giant cell sarcoma/glioblastoma (Shuangshoti, Netsky 1971; Duffy et al. 1980; Schiffer et al. 1980) is reflected further by a single case of a tumor consisting of some GFAP-positive immunostained giant and lymphoid-like cells, deprived, however, of other histological features of a glioma. The GFAP-positive giant cells are considered to be the best evidence for glial origin of so-called monstrocellular sarcomas of the brain, whereas their negativity does not confirm their sarcomatous origin (Schiffer et al. 1980, 1983).

A moderate number of glial cells scattered among neoplastic tissue with a tendency to increase towards the periphery of the tumor and the glial islands located only at the periphery are evidence of gradual incorporation of adjacent nervous tissue into the tumors of both types. Moreover, the number of scattered astrocytic cells demonstrated in fibrosarcomas seems to be related to a higher number or visualized GFAP-positive perivascular structures and can represent either their remnants or residues of stromal astrocytes better preserved due to longer functioning of perivascular astroglia. The mingling of singular immunostained astrocytes with neoplastic cells of human metastatic lung, breast and renal carcinomas mostly towards the periphery of brain metastases indicates the course of glial involvement (Epstein et al. 1984; Luevano et al. 1986).

Increased peritumoral GFAP immunostaining of reactive astrocytes corresponds to that observed in the edematous zone around murine and rat tumors including the perivascular astrocytic layer (Conley 1979; Mauro et al. 1983).

## ELEMENTY GLEJOWE W DOŚWIADCZALNYCH MIĘSAKACH ŚRÓDMÓZGOWYCH

### Streszczenie

W poszukiwaniu tkanki glejowej wcielonej w nowotwory mezodermalne mózgu wykonano badanie kwaśnego glejowego białka komórkowego (GFAP) w 20 przypadkach doświadczalnych mięsaków wywołanych w OUN myszy wszczepionym miejscowo metylocholantrinem. Śródmózgowe części guzów były włókniako-mięsakami lub mięsakami olbrzymiokomórkowymi. Poza nielicznymi, rozproszonymi GFAP-dodatnimi astrocytami lub ich wypustkami w centralnych częściach włókniako-mięsaków oraz małymi wyspami komórek glejowych wcielonych w części brzeżne nowotworu, częstszymi we włókniako-mięsakach niż w mięsakach olbrzymiokomórkowych, obserwowano dodatni odczyn GFAP w astrocytach okołonaczyniowych włókniako-mięsaków, bardziej wyrażony w polach brzeżnych.

Przeciwnie do tych obserwacji, astrocyty okołonaczyniowe w mięsakach olbrzymiokomórkowych nie wykazywały odczynu GFAP w większości przypadków oprócz pojedynczych naczyń w strefie brzeżnej kilku guzów. Dodatni odczyn GFAP w astrocytach okołonaczyniowych we włókniako-mięsakach, a brak GFAP-dodatnich astrocytów lub ich wypustek wokół naczyń mięsaków olbrzymiokomórkowych może stanowić argument w dyskusji o pochodzeniu mięsaków olbrzymiokomórkowych.

### REFERENCES

1. Arnold H., Zimmerman H.M.: Experimental brain tumors. III. Tumors produced with dibenzanthracene. *Cancer Res*, 1943, 3, 682–685.

2. Bonnin J., Rubenstein L.: Immunohistochemistry of central nervous system tumors. *J Neurosurg*, 1984, 60, 1121–1133.
3. Conley F.K.: The immunocytochemical localization of GFA protein in experimental murine CNS tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1979, 45, 9–16.
4. Cras P., Martin J.J., Gheuens J.:  $\gamma$ -Enolase and glial fibrillary acidic protein in nervous system tumors. An immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1988, 75, 377–384.
5. Deck J., Eng L., Bigbee J., Woodcock S.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1978, 42, 183–190.
6. Duffy P., Graf L., Rapport M.: Identification of glial fibrillary acidic protein by the immunoperoxidase method in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1977, 36, 645–652.
7. Duffy P., Huang Y., Rapport M., Graf L.: Glial fibrillary acidic protein in giant cell tumors and other gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1980, 52, 51–57.
8. Eng L., Rubinstein L.: Contribution of immunochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem*, 1978, 26, 513–522.
9. Epstein J., While Ch. III., Mendelsohn G.: Factor VIII related antigen and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the differential diagnosis of central nervous system hemangioblastomas. *Am J Clin Pathol*, 1984, 81, 285–292.
10. Jänisch W.: Die Induktion von experimentellen Hirngeschwülsten mit cancerogenen Kohlenwasserstoffen. *Z Krebsforsch*, 1966, 68, 224–233.
11. Kimura T., Budka H., Soler-Federspiel S.: An immunocytochemical comparison of the glia-associated proteins glial fibrillary acidic protein (GFAP) and S-100 protein (S 100 P) in human brain tumors. *Clin Neuropathol*, 1986, 5, 21–27.
12. Kroh H.: Przypadek doświadczalnego mięsaka ołbrzymiokomórkowego w mózgu myszy. *Patol. Pol*, 1967, 18, 421–431.
13. Kroh H.: Some observations on the morphology and histochemistry of experimental brain sarcomas in mice. *Folia Histochem Cytochem*, 1969, 7, 47–58.
14. Lalitha V., Rubinstein L.: Reactive glioma in intracranial sarcoma: a form of mixed sarcoma and glioma (“sarcoglioma”). *Cancer*, 1979, 43, 246–257.
15. Luevano E., Tena M., Zamora A., Sotelo J.: Glial fibrillary acidic protein in brain tumors. *Oncology*, 1986, 43, 364–367.
16. Mauro A., Giordana M., Migheli A., Schiffer D.: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in rat brain tumors transplacentally induced by ethylnitrosourea (ENU). *J Neurol Sci*, 1983, 61, 349–355.
17. Rubinstein L.: The development of contiguous sarcomatous and gliomatous tissue in intracranial tumors. *J Pathol Bact*, 1956, 71, 441–459.
18. Schachner M., Hedley-Whyte E., Hsu D., Schoonmaker G., Bignami A.: Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labelling. *J Cell Biol* 1977, 75, 67–73.
19. Schiffer D., Giordana M., Mauro A., Migheli A.: Glial fibrillary acidic protein GFAP in human cerebral tumors. An immunohistochemical study. *Tumori*, 1983, 69, 95–104.
20. Schiffer D., Giordana M., Sofietti R., Tarenzi L., Bertolotto A.: On the nature of so-called monstrocellular sarcoma of the brain. *Neurosurgery*, 1980, 6, 391–397.
21. Shuangshoti S., Netsky M.: Neoplasms of mixed mesenchymal and neuroepithelial origin. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1971, 30, 290–309.
22. Seligman A.M., Shear M.J.: Studies in carcinogenesis. VIII. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholantrene. *Am J. Cancer*, 1939, 37, 364–395.
23. Slowik F., Jellinger K., Gaszo L., Fischer J.: HGliosarcomas: histological, immunohistochemical, ultrastructural and tissue culture studies. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, 67, 201–210.
24. Van der Meulen J., Houthoff H., Ebels E.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1978, 4, 177–190.



25. Zimmerman H.M., Arnold E.: Experimental brain tumors. II. Tumors produced with benzopyrene. *Am J Pathol*, 1943, 19, 939–955.

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

ELŻBIETA KIDA, MARIA NIEMCZEWSKA,  
HALINA RUDNICKA, JERZY BAUMRITTER

WORD DEAFNESS SYNDROME WITH LATERALIZED,  
PROGRESSIVE ACTION MYOCLONUS,  
EPILEPSY AND CEREBELLAR SIGNS.  
COEXISTENCE OF MULTIFOCAL AND SYSTEM,  
ASSYMETRICAL CNS DEGENERATION

Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw  
and II Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw

Progressive myoclonus epilepsy (PME) constitutes a symptomatic complex encountered in various CNS disorders including storage diseases and a group of conditions representing a system degeneration of CNS (Lance 1986). In the latter category of disorders neurological abnormalities of slowly progressive character appear usually in childhood or adolescence and besides myoclonus and epilepsy, commonly comprise cerebellar ataxia (Ramsay Hunt 1921; Roger et al. 1968; Koskiniemi et al. 1974). Morphological alterations of degenerative type, observed, however, in various CNS areas, they reveal a predilection for the cerebellar and brainstem structures (Ramsay Hunt 1921; Roger et al. 1968; Choteau et al. 1980; Marsden et al. 1982; Habib et al. 1985).

We report a case representing a unique coexistence of lateralized action myoclonus, epilepsy and cerebellar signs with the word deafness syndrome, characterized by late onset and rapid progression displaying unusual association of multifocal and system degeneration of CNS.

CASE REPORT

A 49-year-old woman was admitted in February, 1984 after episodes of violent, right sided jerks, with a four month history of hearing disturbances, myoclonus and gait unsteadiness.

The first symptom of her disease, hearing difficulties, soon producing complete deafness appeared in November 1983, not preceded by any infectious illness. At that time only slight awkwardness of her upper right limb and mild gait disturbances had been noted (she was prosthesized at the knee level after a traffic accident in childhood; but afterwards could walk unaided). Since the end of December 1983 mild, but gradually increasing myoclonic



movements in the right upper limb and right mouth corner developed. The family history was negative regarding hereditary disorders, her 10-year-old daughter was healthy. The pure tone audiogram performed in December 1983 revealed hearing loss not exceeding 30 dB on the right and 15 dB on the left above 2 kHz. Other laboratory findings including vestibular functions, brain stem evoked auditory potentials, EEG and CSF examination were normal.

On admission the patient was alert and oriented, however, presented severe verbal comprehension impairment so communication with her was possible only by written instructions. Spontaneous speech was dysarthric and explosive. The myoclonic jerks, almost continuous, abrupt, irregular and asynchronous involved the right side of the face, palatopharyngeal muscles and upper right limb. They were worsened by any external stimuli, emotions and voluntary action, did not appear during sleep but persisted, however they were less severe at rest. The cranial nerves were otherwise normal, the optic discs and retinae unchanged. Tendon reflexes were brisker on the left, the muscle tone was slightly reduced. Nystagmus was absent, the other cerebellar functions were difficult to evaluate because of severe myoclonus, but a mild dysmetria, intension tremor and adiadochokinesis were found. The patient could not walk or even sit without assistance. Remote and recent memory were normal. Routine examination of the blood and urea were normal except for elevated to 110/h sedimentation rate, normalized within next two months. ECG, radiographs, virological and immunological tests were normal. CSF on numerous occasions showed no abnormalities. Repeated EEG showed diffuse spike discharges due to muscle artefacts, subsiding after injections of Clonazepam or Diazepam. Otherwise, sporadic spikes or slow waves predominantly over the left temporo-occipital area were seen against a background of low voltage, accelerated activity. An electrocochleogram disclosed a well preserved peripheral cochlear function, brain stem evoked auditory potentials were unremarkable. CT in March 1984 showed a small hypodense area in the right temporo-parietal region, but repeated twice afterwards revealed no alterations.

Because of the clinical suspicion of atypical viral infection the patient was given Encorton (60 mg pro die) and Isoprinosine (5000 mg pro die). Myoclonus after treatment with Nitrazepam (30 mg pro die) and Valproic Acid (1500 mg pro die) became less severe, however, sporadically myoclonic jerks appeared in the left upper limb.

Neuropsychological examination performed during the clinical improvement revealed that the patient could name different objects even difficult for articulation, answered correctly the written questions and arranged appropriately letters to compose the words. In favourable test conditions she stated that she could hear the speaker's voice but did not understand the meaning of the utterances, not even the most simple words. She was unable to repeat any syllables or consonants, sometimes only she could repeat the vowels. At the same time, she correctly identified nonverbal environmental sounds and counted claps performed outside her field of vision. All these data allowed to diagnose a word deafness syndrome.



The patient was discharged home in July, 1984, but frequent generalized epileptic seizures occurred, so she was readmitted to the hospital. Soon, she became bedridden, incapacitated, could not feed herself. In December, 1984 tracheostomy was performed. The last period of life was complicated by bronchial and urinary infections. She died suddenly at the age of 50 because of abrupt cardiorespiratory arrest, 16 months after the onset of the disease.

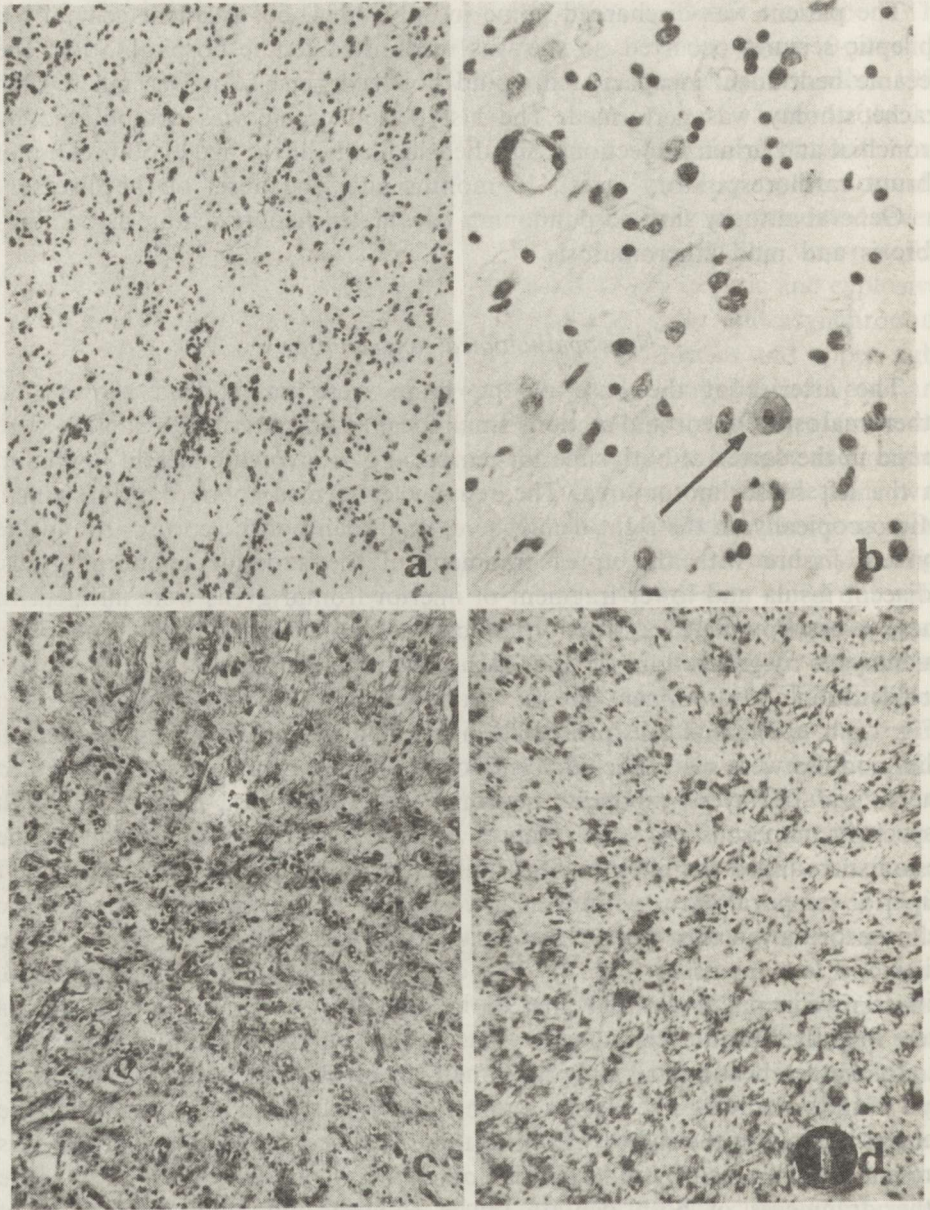
General autopsy showed pulmonary edema, tracheobronchitis, myocardiofibrosis and mild atheromatosis.

#### *Neuropathological examination*

The arteries at the base of the brain were patent and showed no atheromatosis. On coronal sections small focal zones of tissue rarefaction were found in the cortex of both superior temporal gyri involving Heschl's gyri and in the left sensorimotor area. The red nuclei seemed to be darkly stained. Microscopically, in the right hemisphere, small band of the cortex around the Sylvian fissure with the upper fragment of the superior temporal gyrus, adjacent insula and lower fragment of inferior frontal gyrus were affected. In these areas complete destruction of cortical architecture was visible with microcystic degeneration of the tissue, neuronal disappearance, capillary proliferation and prominent gliosis with hypertrophic astrocytes and microglia (Fig. 1a, b, c, d). Glial cells proliferation was diffuse, only in some places small glial nodules were seen. The adjacent cortex showed a spongy state limited to the II and III layers, moderate neuronal loss, diffuse and focal gliosis with especially numerous rod cells. Only few blood vessels at the margins of the lesion surrounded the mononuclear infiltrates (Fig. 2). In the cortex of the left superior temporal gyrus within the lower lip of the Sylvian fissure and in the left sensorimotor area small, the focal alterations, similar in nature, were distinctly less intensive (Fig. 3). The cerebral white matter disclosed mild, diffuse myelin pallor without glial or inflammatory reactions. Small arteries were slightly fibrotic, perivascular spaces were enlarged, without infiltrates.

In the cerebellum strikingly asymmetrical atrophy of both dentate nuclei was found, involving the dorsal lamina of the left dentate nucleus and the ventral lamina on the right (Fig. 4). In these areas complete neuronal loss was present accompanied by mild gliosis and capillary proliferation (Fig. 5a). The other fragments of both dentate nuclei showed only mild diminution of neuronal population with the occurrence of ballooned or atrophied nerve cells (Fig. 5b). The left dentate hilus displayed diffuse demyelination. Emboliform and globosus nuclei were similarly affected. Cerebellar cortex showed mild, focally accentuated loss of Purkinje cells with Bergmann glia proliferation. Superior cerebellar peduncles were asymmetrically damaged: the left one showed degeneration of its upper part, meanwhile the lesion of the right one was confined to its lower fragment (Fig. 6). In both red nuclei some neurons in the parvocellular area revealed degenerative changes with concomitant gliosis. The C1 segment of the spinal cord, only available, was not damaged.



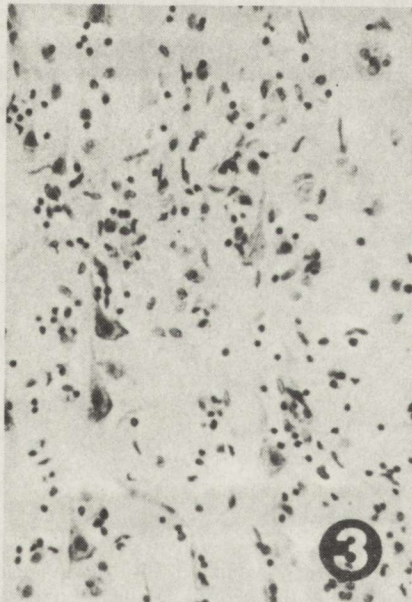


*Fig. 1.* Areas of cortical damage: *a.* Complete destruction of cortical architecture in right superior temporal gyrus. H-E.  $\times 100$ . *b.* Few persisted damaged nerve cells (arrow) in the same area. H-E.  $\times 200$ . *c.* Vascular proliferation in the same area. PAS.  $\times 100$ . *d.* Diffuse glial cell proliferation in the same area. PTAH.  $\times 200$

*Ryc. 1.* Ogniska uszkodzeń korowych: *a.* Zatarcie budowy warstwowej kory w zakręcie skroniowym górnym prawym. H-E. Pow.  $100\times$ . *b.* Pojedyncze uszkodzone komórki nerwowe (strzałka) w tej samej okolicy. H-E. Pow.  $200\times$ . *c.* Rozplem naczyń krwionośnych w tym samym obszarze. PAS. Pow.  $100\times$ . *d.* Rozlany rozplem komórek glejowych w tym samym obszarze. PTAH. Pow.  $200\times$



*Fig. 2.* Perivascular mononuclear infiltrate at the margin of cortical degeneration. H-E.  $\times 100$   
*Ryc. 2.* Okołonaczyniowy naciek jednojądrzasty w brzegu ogniska uszkodzenia w korze. H-E.  
 Pow.  $100\times$



*Fig. 3.* Degenerated neurons and cellular gliosis in the left sensorimotor cortex. H-E.  $\times 200$   
*Ryc. 3.* Zmiany zwyrodnieniowe neuronów i ogniskowe pomnożenie komórek glejowych w lewej  
 okolicy czuciowo-ruchowej. H-E. Pow.  $200\times$



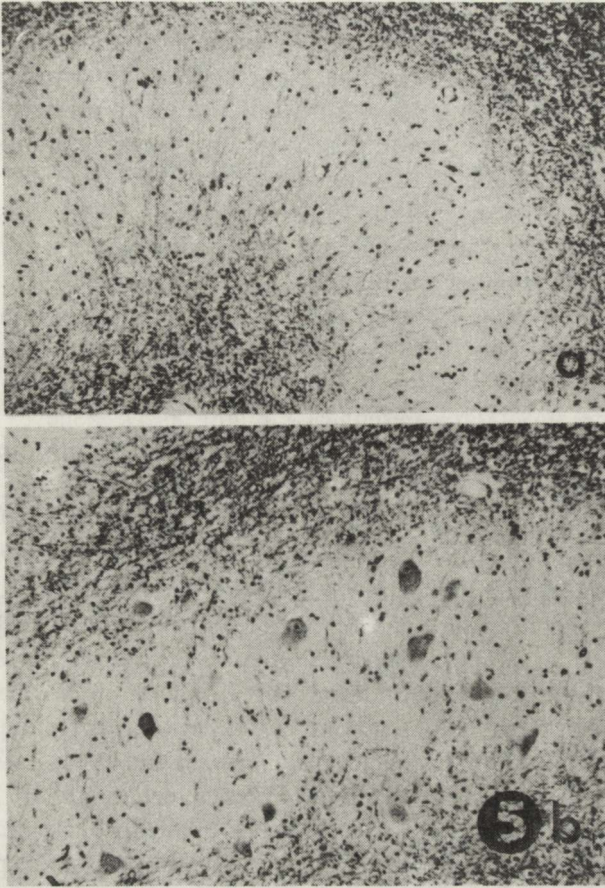


*Fig. 4.* Damage of deep cerebellar nuclei and their efferents. Degeneration of both dentate nuclei (arrows) and demyelination of the left dentate hilus. L – left, R – right side. Klüver–Barrera. Gross magn.

*Ryc. 4.* Uszkodzenie jąder głębokich mózdzku i ich dróg odprowadzających. Zwyródnienie jąder zębatych mózdzku (strzałki) oraz demielinizacja wnętrza lewego jądra zębatego. L – lewa, P – prawa strona. Klüver–Barrera. Pow. lupowe

*Fig. 5a.* Total loss of neurons in the dorsal lamina of left dentate nucleus. Klüver–Barrera.  $\times 200$ .  
*5b.* Numerous preserved neurons in the ventral lamina of the same dentate nucleus. Klüver–Barrera.  $\times 200$

*Ryc. 5a.* Zanik komórek nerwowych blaszki górnej lewego jądra zębatego. Klüver–Barrera. Pow.  $200\times$ .  
*5b.* Liczne zachowane neurony blaszki dolnej tego samego jądra. Klüver–Barrera. Pow.  $200\times$



#### DISCUSSION

The association of PME with the word deafness syndrome is unique and to our knowledge was not described previously. On pathological grounds our case resembles those Ramsay Hunt syndrome cases with prominent dentato-rubral atrophy, however, at present, this syndrome is considered to be a multifactorial disorder rather than a specific clinicoanatomical entity (Gray et al. 1986). Neither can we include our case into any definite PME group of disorders (Berkovic et al. 1986) nor conclusively eliminate, the clinically suspected, role of an atypical viral agent. The etiology remains unclear, however, an uncommon coexistence of multifocal and system, but asymmetrical CNS degeneration disclosed, and the potential relevancy of the topography of lesions to the clinical presentation seem to be noteworthy.

Only partial destruction of cerebellar nuclei in our patient was probably due to the short duration of the pathological process, as compared with other PME cases, typically with long lasting course. The presence of asymmetrical damage of dentate nuclei in a patient with a distinctly lateralized manifestation



of myoclonus, as was disclosed, seems to suggest their possible pathogenetical relations. However, the precise causative mechanisms of myoclonus are still not fully elucidated. Clinical observations of the beneficial effect of 5-hydroxytryptophan and benzodiazepines point to the alterations in the serotonergic and GABA-ergic system (Marsden et al. 1982; Lance 1986; Menini, Naquet 1986). Neuropathological studies often disclosed in PME dentate nuclei lesions (Ramsay Hunt 1921; Roger et al. 1968; Bird, Shaw 1978), but besides them, damage of various brain areas such as of cerebellar cortex or olivary nuclei is also well documented (Koskiniemi et al. 1974; Habib et al. 1985; Logigian et al. 1986). Therefore, dentate nuclei damage does not represent a common anatomical substrate of myoclonus. Nevertheless, it seems that in individual cases the participation of dentate nuclei lesion in the production of myoclonus deserves consideration. The present case might, as we believe, illustrate such a possibility, however further clinicopathological correlations are necessary to clarify this problem.

Apart from cerebellar damage, small, focal lesions confined to the cortex exclusively and responsible for word deafness were disclosed. But few cases of PMF with deafness have been reported (May, White 1960; Baraitser et al. 1984) none, however, displayed a word deafness syndrome as that exhibited by our patient. The finding of circumscribed, bitemporal injuries moreover is as yet unique. Previously reported auditory disturbances of cortical origin were accompanied by deep, left temporal lobe lesion, or bitemporal, always widespread and mainly vasogenic damage (Geschwind 1965; Barraquer-Bordas et al. 1980; Buchman et al. 1986; Mendez, Geehan 1988); both of them disconnecting Wernicke's area from auditory input. In our patient bitemporal cortical lesions affected in addition to Heschl's gyri only small portions of the insula and inferior frontal gyrus on the right, hence involved mainly the primary auditory cortex. They generally spared the accessory auditory centres, which are suggested to be responsible for the comprehension of elementary sounds (Dewson et al. 1969; Celesia 1976). Therefore, our findings strongly support, the recently postulated critical role of Heschl's gyri, representing primary auditory centres, for the interpretation and processing of speech, and independent participation of auditory association cortex in decoding and analysing nonverbal sounds (Coslett et al. 1984). However mild were the auditory deficiencies disclosed in our patient by audiologic study, we agree with Buchman et al. (1986) that the term word deafness, rather than pure word deafness, more appropriately defines speech comprehension defects in such cases.

Cortical lesions, considered to be primary, were rarely described in PME (Haltia et al. 1969; Bird, Shaw 1978). In our case, the early involvement of the cerebral cortex was documented by CT scan, however, only one of the cortical foci and only once could be detected. It is easily explicable by the small size of the cortical foci, as well as the type of tissue damage disclosed. The involvement of the cortex in PME cases, even if uncommon, may not be coincidental but,

alternatively might reflect certain differences of the pathogenesis and etiology within this heterogenous group of disorders.

ZESPÓŁ GŁUCHOTY SŁOWNEJ WSPÓLISTNIEJĄCY Z POSTĘPUJĄCYMI,  
NIESYMETRYCZNYMI MIOKLONIAMI, PADACZKĄ I OBJAWAMI MÓZDŻKOWYMI  
W PRZEBIEGU OGNISKOWYCH ORAZ UKŁADOWYCH ZMIAN  
ZWYRODNIENIOWYCH W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM

Streszczenie

Opisano przypadek 49-letniej kobiety, u której do zespołu głuchoty słownej dołączyły się postępujące, niesymetryczne mioklonie, padaczka i dyskretne objawy mózdkowe. Zespół kliniczny cechował późny początek choroby i szybki, niepomyślny przebieg. Badanie neuropatologiczne wykazało drobne, korowe ogniska uszkodzeń tkankowych o charakterze zwyrodnieniowym z dominującym, obustronnym zajęciem pierwszorzędowych ośrodków słuchowych. Tak ograniczony typ zmian korowych ma charakter unikalny, ponieważ w znanych z piśmiennictwa przypadkach głuchoty słownej opisywano rozległe, zazwyczaj naczyniopochodne uszkodzenia zarówno kory, jak też istoty białej. Opisany przypadek zdaje się potwierdzać przypuszczenie o dominującej roli pierwszorzędowych ośrodków słuchowych w interpretacji i percepcji mowy oraz udział dodatkowych ośrodków słuchowych w percepcji prostych bodźców niewerbalnych.

Na uwagę zasługuje ponadto niesymetryczny typ uszkodzeń jąder głębokich mózdku sugerujący ich możliwy związek patogenetyczny w mechanizmie powstawania ruchów mioklonicznych. Współistnienie uszkodzeń korowych oraz mózdku, może wskazywać na pewne wspólne czynniki etiopatogenetyczne w obrębie grupy schorzeń z objawami postępującej padaczki mioklonicznej.

REFERENCES

1. Baraitser M., Goody W., Halliday A. M., Harding A. E., Rudge P., Scaravilli F.: Autosomal dominant late onset cerebellar ataxia with myoclonus, peripheral neuropathy and sensorimotor deafness: a clinico-pathological report. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1984, 47, 21–25.
2. Barraquer-Bordas L., Pena-Casanova J., Pons-Irazazabal L.: Surdite centrale sans troubles aphasiques par lesions temporale bilaterale. *Rev Neurol*, 1980, 136, 377–380.
3. Berkovic S. F., Andermann P., Carpenter S., Wolfe L. S.: Progressive myoclonus epilepsies: specific causes and diagnosis. *New Eng J Med*, 1986, 315, 296–305.
4. Bird T. D., Shaw C. M.: Progressive myoclonus and epilepsy with dentatorubral degeneration: a clinicopathological study of the Ramsay Hunt syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1978, 41, 140–149.
5. Buchman A. S., Garron D. C., Trast-Cardamone J. E., Wichter M. D., Schwartz M.: Word deafness: one hundred years later. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 1986, 49, 489–499.
6. Celesia G. G.: Organization of the auditory cortical areas in man. *Brain*, 1976, 99, 403–414.
7. Choteau P., Gray E., Warot P., Dereux J. F.: Syndrome de Ramsay Hunt. Etudes anatomique d'un cas. *Rev Neurol*, 1980, 136, 837–852.
8. Coslett H. B., Brashear H. R., Heilman K. M.: Pure word deafness after bilateral primary auditory cortex infarcts. *Neurology*, 1984, 34, 347–352.
9. Dewson J. H., Pribam K. H., Lynch J. C.: Effects of ablations of temporal cortex upon speech sound discrimination in the monkey. *Exp Neurol*, 1969, 24, 579–591.
10. Geschwind N.: Disconnection syndromes in animals and man. *Brain*, 1965, 88, 237–294, 585–644.



11. Gray E., Signoret J.L., Colin R., Hauw J.J., Escourolle R., Lhermitte F.: Dyssynergie cerebelleuse myoclonique (syndrome de Ramsay Hunt) et telangiectasies cerebelleuses. *Rev Neurol*, 1986, 142, 29–33.
12. Habib M., Roger J., Khalil R., Pallisier J.F., Bureau M., Boudouresques G., Delpuech F.: Epilepsie myoclonique progressive. Lésions olivo-cerebelleuses systematisées. *Rev Neurol*, 1985, 141, 274–288.
13. Haltia M., Kristensson K., Sourander P.: Neuropathological studies in three Scandinavian cases of progressive myoclonus epilepsy. *Acta Neurol Scand*, 1969, 45, 63–77.
14. Koskiniemi M., Donner M., Majuri H., Haltia M., Norio R.: Progressive myoclonus epilepsy. A clinical and histopathological study. *Acta Neurol Scand*, 1974, 50, 307–332.
15. Lance J.W.: Action myoclonus, Ramsay Hunt syndrome and other cerebellar myoclonic syndromes. *Adv Neurol*, 1986, 43, 33–55.
16. Loggiani E.L., Kolodny D.H., Griffith J.F., Filipek P.A., Richardson E.P.: Myoclonus epilepsy in two brothers: clinical features and neuropathology of a unique syndrome. *Brain*, 1986, 109, 411–429.
17. Marsden C.D., Hallett M., Fahn S.: The nosology and pathophysiology of myoclonus. In: *Movement disorders vol 13*, Eds. C.D. Marsden, S. Fahn. Butterworth, London, 1982, 196–248.
18. May D.L., White H.H.: Familial myoclonus, cerebellar ataxia and deafness. Specific, genetically determined disease. *Arch Neurol*, 1960, 19, 331–338.
19. Mendez M.F., Geehan G.R.: Cortical auditory disorders: clinical and psychoacoustic features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988, 51, 1–9.
20. Menini C., Naquet R.: Les myoclonies. Des myoclonies du *Papio papio* a certaines myoclonies humaines. *Rev Neurol*, 1986, 142, 3–28.
21. Ramsay Hunt J.: *Dyssynergia cerebellaris myoclonica* – primary atrophy of the dentate system. A contribution to the pathology and symptomatology of the cerebellum. *Brain*, 1921, 44, 490–538.
22. Roger J., Soulayrol R., Hassoun J.: La dyssynergie cerebelleuse myoclonique (Syndrome de Ramsay-Hunt) *Rev Neurol*, 1968, 119, 85–106.

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

WOJCIECH SOBANIEC, ELEONORA JANKOWICZ, MARIA SOBANIEC-ŁOTOWSKA

## EFFECT OF VALPROIC ACID ON THE MORPHOLOGY OF THE RAT CEREBELLUM AND BRAIN STEM\*

Clinic of Neurology and Department of Pathological Anatomy, School of Medicine, Białystok

The pathogenesis of central nervous system (CNS) injuries in patients with chronic epilepsy has not been, as yet, fully elucidated. Among the reasons which evoke organic alterations of the nervous tissue two are believed to be most important: frequent epilepsy attacks causing changes described as post-seizures (Tarnowska-Dziduszko 1976; Markiewicz, Dymecki 1978; Dymecki 1981; Majkowski 1986) and the toxic effect of anticonvulsants, mainly affecting the cerebellum (Meyler, Herxheimer 1968; Woodbury et al. 1972; Karkos 1973; Frey, Janz 1985). On the basis of autopsy material and experimental findings it has been ascertained that the earliest and most intense morphological lesions in the CNS in cases of epilepsy are found in the cerebellum and in the hippocampal cortex (Karkos 1973; Tarnowska-Dziduszko 1976; Dymecki 1981; Majkowski 1986). Structural elements of the cerebellum are characterized by a high susceptibility to the action of toxic factors both endo- and exogenous (Collins 1970; Majkowski 1986). Some antiepileptic drugs like phenytoin, tend to cumulate in this organ (Karkos 1973; Majkowski 1986). Moreover, the biochemical specificity of the cerebellar tissue which includes intensive protein metabolism and high concentration of cyanocobalamin may be of importance in the pathomechanism of convulsive attacks and the activity of antiepileptic drugs (Reynolds 1968).

Hitherto, the pathological basis of experimentally induced organic damage to the cerebellum under the influence of long-term application of antiepileptic drugs like phenytoin, phenobarbital, ethosuximide, primidone has been studied. The lesions found, were ascribed to the duration of administration of drugs used in such experiments (Karkos 1973; Frey, Janz 1985; Majkowski 1986).

In the available literature we did not find data describing the morphological picture of the brain of rats given chronically therapeutic doses of valproic acid (VPA). This drug is a relatively new antiepileptic, though it has been known since 1881. However, the anticonvulsant properties of VPA were not known before the 60-s of this century. Chemically, VPA is a short-chain

---

\* This work was done within Research Programme R-15



n-propyl acetic acid, thus, its structure markedly differs from other antiepileptic drugs which have a more complex structure. When introduced for therapy, VPA became the most frequently used drug in cases of epilepsy. Its wide activity spectrum as an antiepileptic has made it efficient in more types of attacks comparing to another drugs which show their beneficial effects only in cases of a single form of seizure. VPA is used as one of the drugs of first choice in cases of generalized, in partial and complex (mixed) seizures, as well as febrile and metabolic convulsions (Chiba et al. 1985; Cloyd et al. 1985; Wallace 1986). The mechanism of action of VPA has not been fully explained up till now. It was shown that the drug did not inhibit bursts in the epileptic foci, but it prevented propagation of secondary bursts (Van Duijn, Backmann 1975). This is connected, among other things, with an increased concentration of GABA in the synapses (VPA inhibits GABA transferase and succinic acid semi-aldehyde dehydrogenase), higher concentration of nervous tissue monoamine degradation products (5-hydroxyindolacetic acid and homovanilic acid) and with an increased cell membranes permeability to selected ions (mainly  $K^+$ ) (Chadwick et al. 1975; Löscher 1981; Strolin et al. 1984; Franceschetti et al. 1986; Majkowski 1986; Jakubiec et al. 1988).

Our recent studies (Sobaniec et al. 1989) have indicated an inhibitory action of VPA upon the increase of lipid peroxides which like an avalanch are formed during experimental seizures. Many publications devoted to VPA or its derivatives concern the toxic effect of this drug on the parenchymal organs, in particular liver, pancreas and kieneys (Suchy et al. 1979; Sussman, McLain 1979; Coulter, Allen 1980; Eeg-Olofsson, Lindskog 1982; Lewis et al. 1982; Warter et al. 1983). It has been shown that this substance, mainly after long-term therapy can bring about hyperammonemia, hypoglycemia, homeostatis disorders, functional disturbances in the CNS, and even death (Hyman et al. 1979; Suchy et al. 1979; Ware, Millward-Sadler 1980; Eeg-Olofsson, Lindskog 1982; Wyllie et al. 1982; Strolin 1984). The above facts inclined us to undertake morphological studies on the effect of long-term application of VPA on particular systems and organs of rats. In this paper we present a part of the results of our experiments in rats to which VPA was administered. These results include the effect of VPA upon the morphology of the cerebellum and brain stem.

#### MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on 150 male Wistar rats (body weight 160–180 g) preselected according to classic pharmacological screening tests. Five groups of animals to which VPA was given for 1, 3, 6, 9 and 12 months included 100 rats. Every experimental group was followed by a group of 10 control animals.

Valproic acid (Vupral, Polfa) dissolved in physiological saline was given to rats through a metal gastric tube in a dose of 200 mg/kg, once daily, before

feeding (Frey, Janz 1985);  $ED_{50}$  in animals with cardiazol seizures amounted to 179–1020 mg/kg if given orally, and 200 mg/kg if given i.p. (to block kindling). Control rats were given physiological saline in the same amount as the animals used for the experiment. During its course the neurological and somatic status of the rats were observed. The animals were weighed every two weeks to correct the amount of the drug administered. After 1, 3, 6, 9 and 12 months the animals were decapitated. The brains were fixed in a neutralized 10% formaldehyde solution. The fixed material was elaborated routinely to paraffin-embedded sections. The cerebellum was cut serially at three planes – frontal, sagittal and horizontal. The brain stem was cut horizontally. The following histological staining methods were used: Mayer's hematoxylin and eosin (HE), Klüver–Barrera, Heidenhain, Gomori.

## RESULTS

The most frequent neurological disorder ascribed to cerebellar lesions was ataxia (14 animals) which occasionally occurred after 3 months of the experiment and became more intense and frequent after 6, 9 and 12 months.

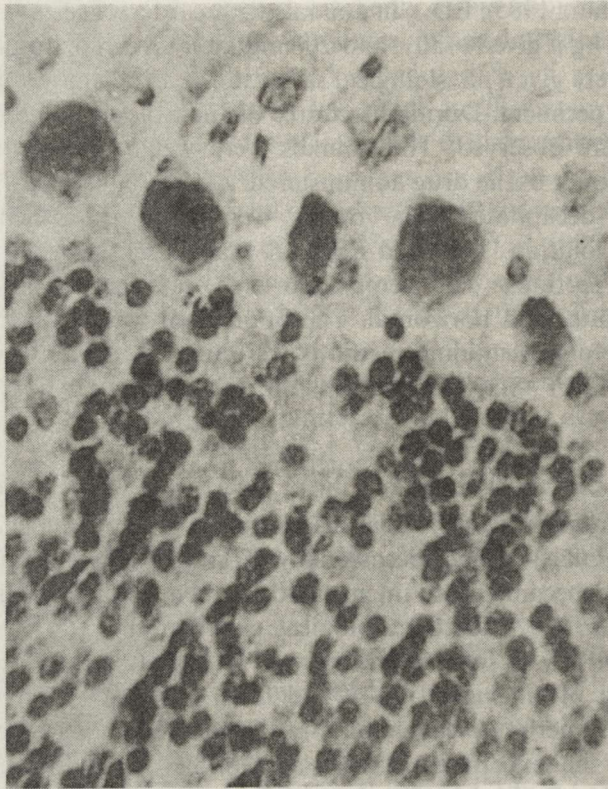
### Neuropathological examination

Macroscopically, in some animals given VPA for 6, 9 and 12 months edema and hyperemia of *pia mater* was found.

The earliest microscopical changes in the cerebellum were noted 6 months after starting the experiment. Most susceptible to the pathogenic factor appeared to be Purkinje cells. In single cases vacuolar degeneration of particular ganglion cells was observed. It consisted in cell swelling with appearance of sharply demarcated vacuoles within the cytoplasm. In some places Purkinje cells showed homogenization characterized by diffuse tigrolysis, pycnosis and disintegration of perikarya (Fig. 1).

The microscopic picture of the cerebellum from animals after 9 and 12 months revealed changes of parenchymal and mesenchymal elements, most intense in the latter group of rats. Purkinje cells exhibited chromatolysis of various intensity, including necrosis, often showed homogenization (Fig. 2 and 3). In some of them vacuolar degeneration was seen. Almost in half of the screened preparations the number of Purkinje cells became reduced, though the degree of their loss was different. One could see a loss of single ganglion cells, at some places its range reached 1/3 to 1/2 of their total amount, and somewhere within the lobules only some remaining cells were visible (Fig. 3). An extensive loss of Purkinje cells was most frequently found at the bottom and around sulci (Figs 2 and 3) while at the protuberance of folia the number of preserved ganglion cells was greater. As a rule, loss of Purkinje cells was accompanied by a rarefaction of the granular layer, mainly within the bottom of sulci and sometimes by its narrowing (Figs 2 and 3). Coarse-grained and often irregularly stained nuclear chromatin of the granular cells and shrunken or disintegrated nuclei were visible. In most preparations the molecular layer was of normal





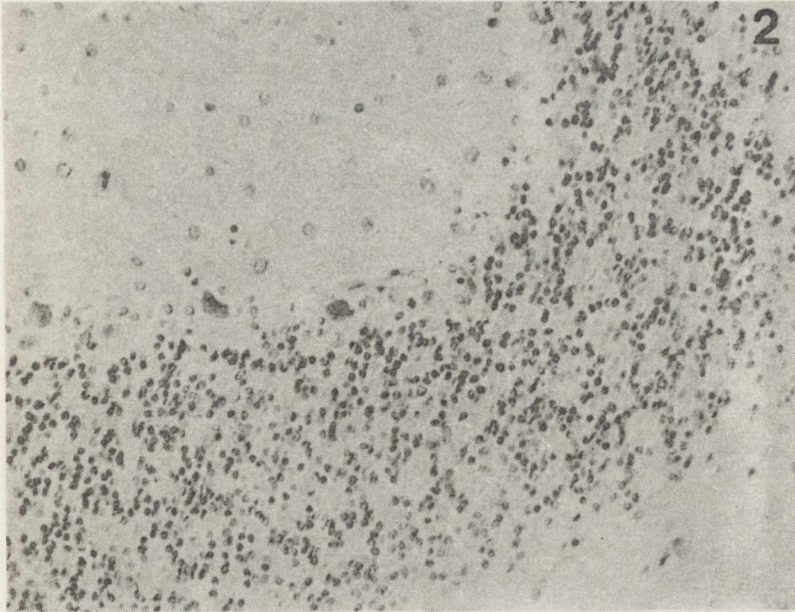
*Fig. 1.* Purkinje cells showing homogenous changes. 6 months of VPA administration. HE.  $\times 400$   
*Ryc. 1.* Komórki Purkinjego wykazujące cechy schorzenia homogenizacyjnego. 6 miesięcy podawania VPA. HE. Pow. 400 $\times$

thickness and only rarely it was narrowed. In some preparations a focal proliferation of Bergmann's glial cells was observed. Focal spongiosis followed by diffuse loss of ganglion cells was visible in the Purkinje cell layer (Fig. 4).

Ganglion cells of the deep cerebellar nuclei, in particular of dentate and fastigial ones showed degeneration of various intensity, though not frequently. Within those nuclei loss of nerve cells was observed, while some preserved neurocytes were hyperchromic and showed less or more advanced shrinkage (Figs 4 and 5). At places the structure of nuclei was loosened.

White matter of particular convolutions was frequently rarefied (Fig. 3). The lumen of many blood vessels was narrowed due to swollen endothelial cells. The structure of the vessel walls became blurred; in some cases around the vessels of greater caliber, mainly arteries, the perivascular space was widened and filled with exudate and red blood cells (Fig 6). Erythrorrhagies or somewhat larger hemorrhagic foci were found most often in the white matter of cerebellar convolutions (Figs 6 and 7). Nerve tissue around these extravasations was variously damaged showing disintegration of myelin sheaths.





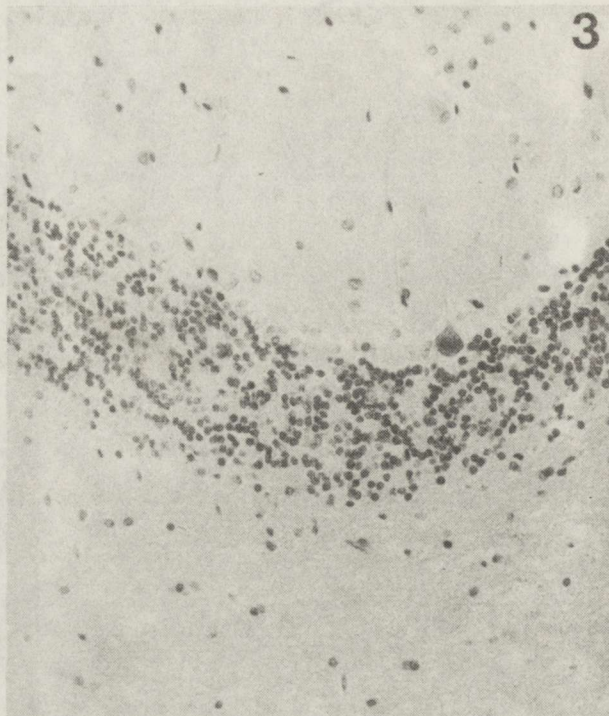
*Fig. 2.* Loss of Purkinje cells at the bottom of the sulcus. Preserved ganglion cells with homogenous changes, rarefied granular layer. 9 months of VPA administration. HE.  $\times 80$

*Ryc. 2.* Ubytki komórek Purkinjego na dnie rowka, zachowane komórki zwojowe z cechami schorzenia homogenizacyjnego, przerzedzenie warstwy ziarnistej. 9 miesięcy podawania VPA. HE. Pow.  $80 \times$

Taking into account the topography of Purkinje cell abnormalities we are of opinion that in most cases they were similar in intensity in the cerebellar hemispheres and in vermis. Peripheral folia exhibited less advanced changes than those lying deeper, near the white matter of the lobuli.

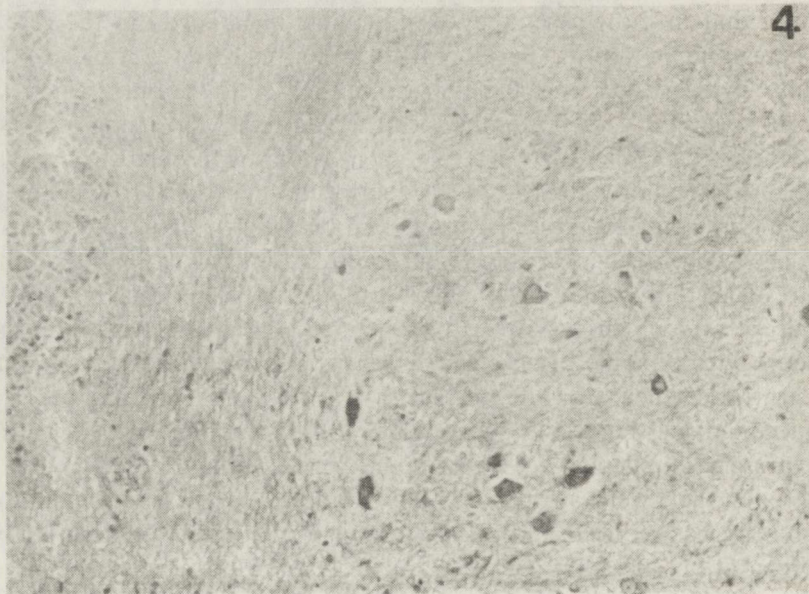
In rats given VPA for 6 months we observed tissue loosening in the brain stem. In those given VPA for 9 and 12 months a more loosened structure of the brain stem white matter was observed due to microvacuolization of the tissue (Fig. 8). Within some longitudinal tracts microcavities irregularly shaped were visible. They developed probably from confluent microvacuoles. Staining for myelin revealed only unimportant abnormalities of single myelin sheaths. In the group of rats which survived 12 months of experiment we could observe large neurocytes of some brain stem nuclei, mainly of gigantocellular nucleus and of ventral cochlear pontine nucleus, which were enlarged, showed blurred cell contours, dispersed Nissl's substance and disintegration of perikarya (Fig. 9). The preserved cell nuclei were at some places shrunken and pycnotic, at another ones they were swollen. As the result of neurolysis the number of ganglion cells was reduced and ghost cells were frequently visible (Fig. 10). In some preparations near the swollen and disintegrating neurocytes the other ones showing features of shrinkage were seen. Moreover, one could observe a rarefied neuropil in altered pontine nuclei.





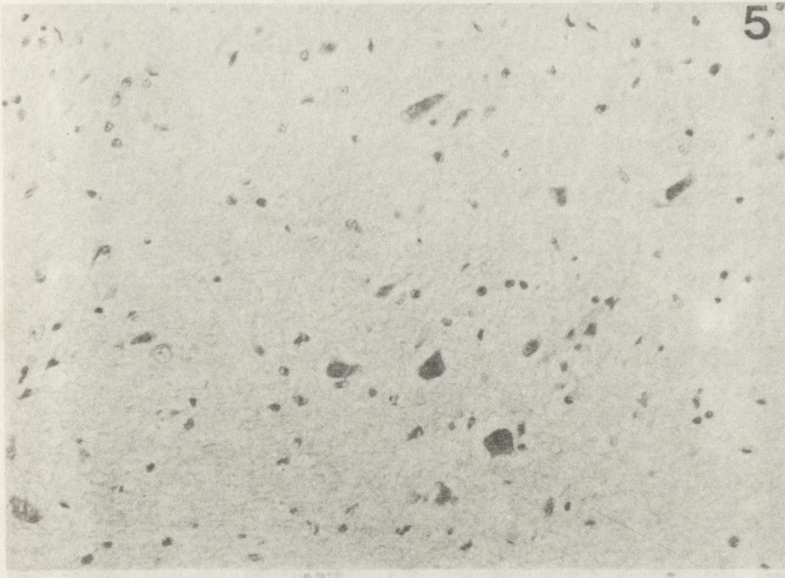
*Fig. 3.* Narrowing and rarefaction of granular layer. Extensive loss of Purkinje cells, single preserved Purkinje cell shrunken, white matter rarefied. 12 months of VPA administration. HE.  $\times 80$

*Ryc. 3.* Zwężenie i przerzedzenie warstwy ziarnistej, rozległe ubytki komórek Purkiniego, pojedyncza zachowana komórka zwojowa obkurczona, istota biała przerzedzona. 12 miesięcy podawania VPA. HE. Pow.  $80\times$



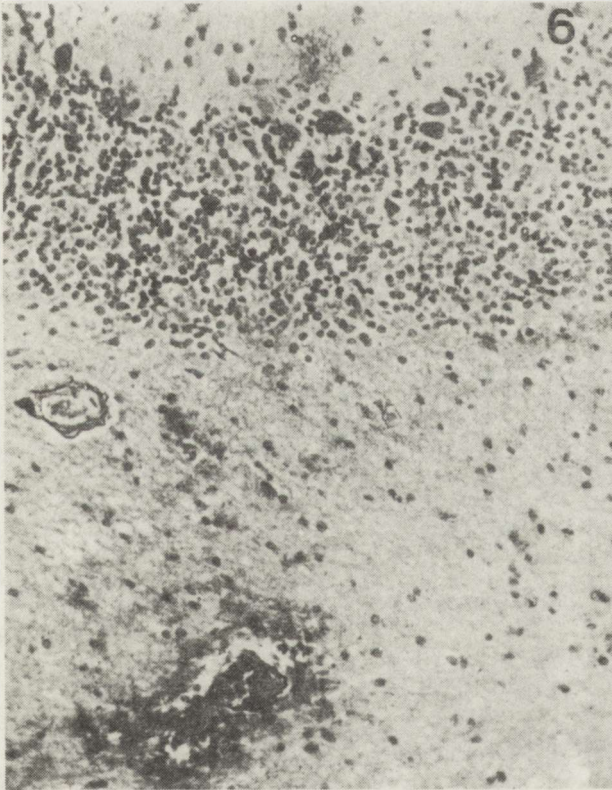
*Fig. 4.* Loss of ganglion cells of dentate nucleus. 9 months of VPA administration. Klüver-Barrera.  $\times 80$ .

*Ryc. 4.* Ubytek neuronów jądra zębatego. 9 miesięcy podawania VPA. Klüver-Barrera. Pow.  $80\times$



*Fig. 5. Loss of nucleus fastigii neurons. Preserved nerve cells hyperchromatic, shrunken. Loosening of tissue structure. 12 months of VPA application. HE.  $\times 120$*

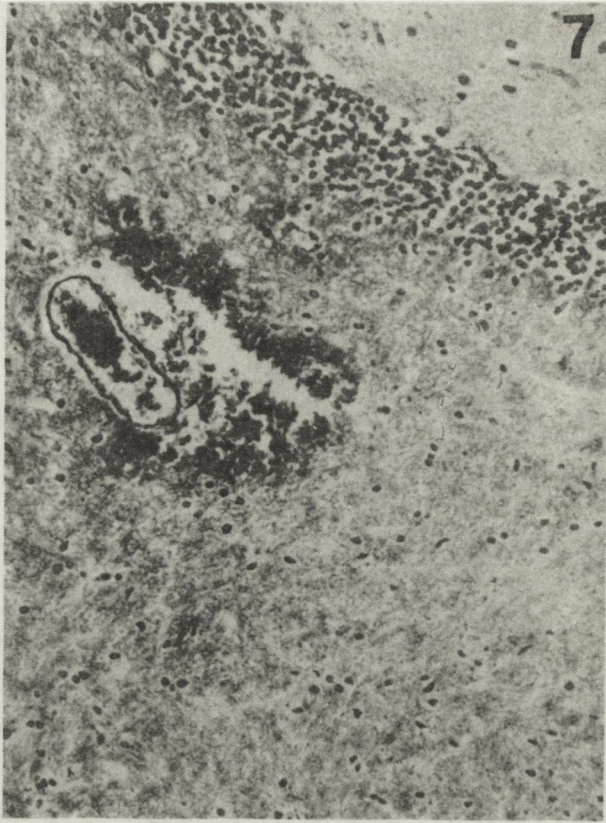
*Ryc. 5. Zanik neuronów jądra stropu. Zachowane neurony nadbarwliwe, obkurczone. Struktura tkanki rozrzedzona. 12 miesięcy podawania VPA. HE. Pow. 120  $\times$*



*Fig. 6. In widened perivascular space erythrorrhagies are visible. 9 months of VPA administration. Gomori impregnation.  $\times 100$*

*Ryc. 6. Poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowej z obecnością krwinkotoków. 9 miesięcy podawania VPA. Impregnacja met. Gomoriego. Pow. 100  $\times$*





*Fig. 7.* Fresh perivascular hemorrhage within white matter of convolution, narrowed granular layer and loss of Purkinje cells. 12 months of VPA administration. Gomori impregnation.  $\times 100$

*Ryc. 7.* Przynaczyniowe świeże ognisko krwotoczne w istocie białej podkorowej, zwężenie warstwy ziarnistej i zanik komórek Purkiniego. 12 miesięcy podawania VPA. Impregnacja met. Gomoriego.

Pow. 100  $\times$

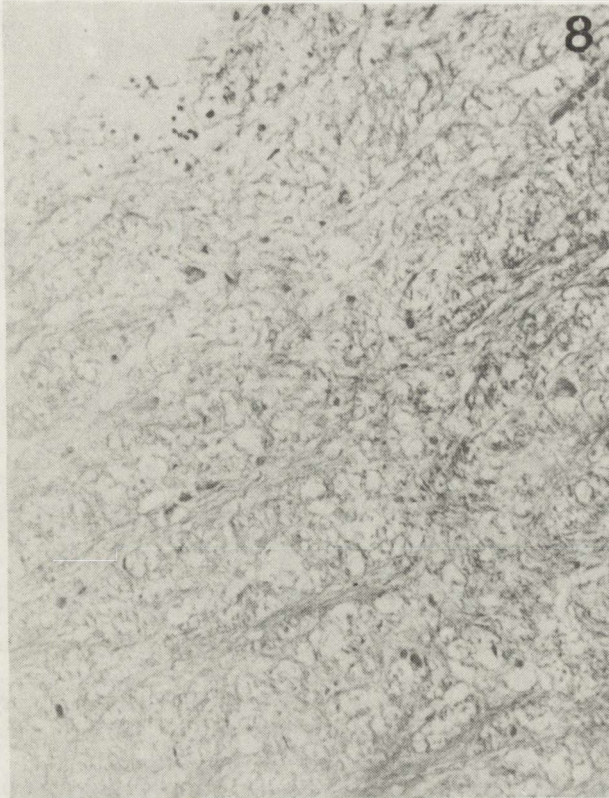
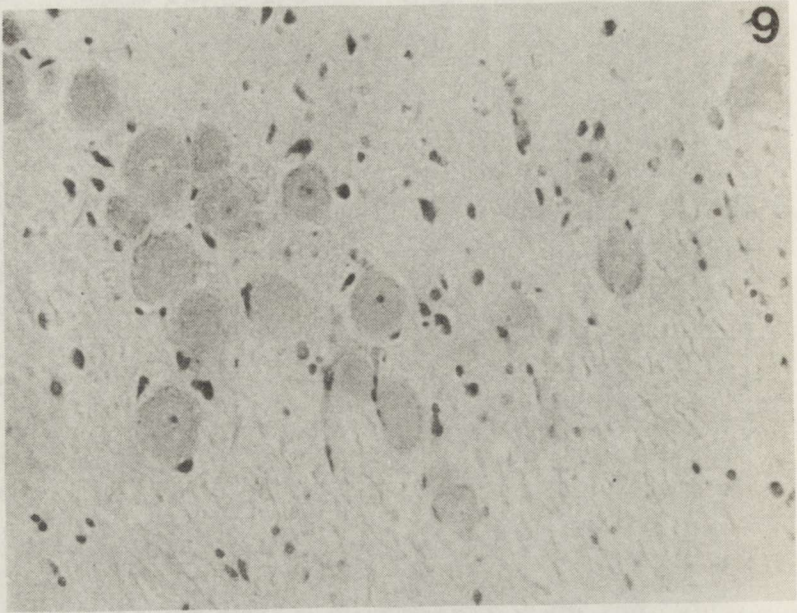


Fig. 8. Spongiosis within the pontine raphe. 9 months of VPA administration. Klüver–Barrera.  $\times 120$

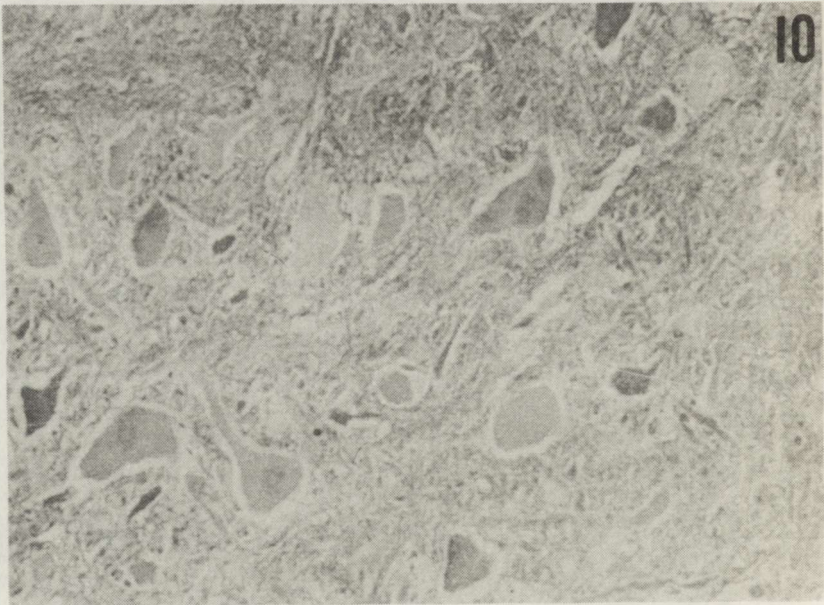
Ryc. 8. Zwyródnienie gąbczaste w obrębie szwu mostu. 9 miesięcy podawania VPA. Klüver–Barrera. Pow.  $120\times$





*Fig. 9.* Damage of neurons of ventral cochlear nucleus, loosening of tissue structure. 12 months of VPA administration. HE.  $\times 200$

*Ryc. 9.* Uszkodzenie neuronów jądra ślimakowego brzuszego, rozluźnienie struktury tkanki. 12 miesięcy podawania VPA. HE. Pow.  $120\times$



*Fig. 10.* Irreversible damage of large neurocytes of gigantocellular nucleus. Ghost-cells are visible. 12 months of VPA administration. Klüver-Barrera.  $\times 200$

*Ryc. 10.* Zmiany ciężkie dużych neuronów jądra olbrzymiokomórkowego, widoczne również cienie komórek zwojowych. 12 miesięcy podawania VPA. Klüver-Barrera. Pow.  $200\times$



Vascular plexuses of the fourth ventricle were initially strongly hyperemic and following 6, 9 and 12 months they became markedly edematous, too.

#### DISCUSSION

Long-term administration to rats of an anticonvulsant — Vupral in the dose of 200 mg/kg/day leads to a damage to several anatomical structures of cerebellum and brain stem. The harmful effects appear not earlier than after 6 months and during later stages of the experiment they become more intense. Morphological changes found in cerebellum and brain stem are not specific. They are wide-spread and of various intensity, without any topographic predilection.

Long-term application of anticonvulsant drugs in humans and in experimental animals can be the cause of functional disturbances and morphological alterations in CNS (Karkos 1972, 1973; Woodbury et al. 1972; Hyman 1979; Majkowski 1986). However, it should be mentioned that not all authors share this opinion, and so Dam (1970) who did not find organic lesions in the cerebellum of experimental animals given diphenylhydantoin threw away a possible toxic effect of this drug upon CNS.

It has been accepted that functional disturbances of CNS are brought about by the inhibitory action of anticonvulsant drugs on the synaptic transmission (Karkos 1973; Frey, Janz 1985; Majkowski 1986). As the cerebellum is a structure having neuronal connections of a multisynaptic type, this group of drugs weakens its function that results in cerebellar symptoms like ataxia (Karkos 1973). This fact has been confirmed in the present work. Morphological alterations observed by us in cerebellum which developed upon the long-term administration of VPA are closely related to those reported by Karkos (1973). This author describes structural changes which he already could observe in the cerebellum of rats given anticonvulsant drugs phenytoin, phenobarbital, ethosuximide and primidone after one and three months. These changes occurred much earlier in the animals used by him than in rats used in our experiments. We found evident lesions in ganglion cells not earlier than 6 months after starting the experiment. Herman et al. (1978) found similar neuropathological changes both in cerebellum and in the brain stem in rats after a long-term administration of neuroleptics — oxazepam and proprtylin.

Taking into account the time of appearance of morphological changes one can assume VPA as a markedly less neurotoxic drug comparing to traditional antiepileptics used in the experiments by Karkos (1973). However, certain authors, among others Coulter and Allen (1980) have pointed to the signs of CNS damage caused by VPA and introduced a term “valproic encephalopathy”. According to a view represented by several authors organic changes in CNS evoked by anticonvulsant drugs are mainly the result of toxic action due to overdosage (Karkos 1973; Frey, Janz 1985; Majkowski 1986). Excess of nonmetabolized anticonvulsants or toxic metabolites formed during their



transformation in the organism bring about nervous tissue damage acting directly upon parenchyma, i.e. cerebellar ganglion cells and glia, on the blood vessels and on the body internal organs. In the case of VPA it can affect liver, kidneys and pancreas (Suchy et al. 1979; Sussman, McLain 1979; Coulter, Allen 1980; Warter et al. 1983; Compostrini, Muclow 1985; Majkowski 1986). This in turn, can be the cause of secondary CNS lesions exemplified by the symptoms of encephalopathy due to a long-term application of VPA and resulting from hyperammonemia (Coulter, Allen 1980; Strolin et al. 1985; Compostrini, Muclow 1985; Marescaux, Ouwier 1985). Finally, there appeared signals that idiosyncrasy can be responsible for toxic effects of VPA on CNS (Majkowski 1986).

### CONCLUSIONS

1. Anticonvulsant drug Vupral given to rats for 1, 3, 6, 9 and 12 months at the dose 200 mg/kg/per day damages most of the anatomical structures of cerebellum. The earliest lesions appear after 6 months and become more intense during later phases of the experiment.

2. Morphological alterations are nonspecific; they are disseminated and of various intensity, without any particular topographic regularity. Homogenization and loss of Purkinje cells, rarefaction of the granular layer, focal proliferation of Bergmann's glia and tissue spongiosis at the border between molecular and granular layers dominated in the microscopic picture. Moreover, atrophy of ganglion cells of the dentate and fastigial nuclei, fragmentation and disintegration of some myelin sheaths, swelling of the vascular endothelial cells, widening of perivascular space with exudate and erythrorrhages were seen.

3. Long-term administration of VPA to rats leads to morphological changes in the brain stem which consist in rarefaction of the white matter, in particular that of the pons and to necrosis of large neurons of the gigantocellular and of the ventral cochlear nuclei.

### WPLYW KWASU WALPROINOWEGO NA OBRAZ MORFOLOGICZNY MÓZDZKU I PNIA MÓZGU SZCZURA

#### Streszczenie

W pracy wykazano, że lek przeciwpadaczkowy Vupral, podawany szczurom przez okres 1, 3, 6, 9 i 12 miesięcy w dawce 200 mg/kg masy ciała na dobę, powoduje uszkodzenie większości struktur anatomicznych mózdku pojawiające się najwcześniej po upływie 6 miesięcy i nasilające się u zwierząt z dłuższym przeżyciem. Zmiany morfologiczne w mózdku były nieswoiste, przeważnie rozsiane, o zróżnicowanym nasileniu. Obserwowano schorzenie homogenizacyjne i ubytki komórek Purkiniego, przerzedzenie warstwy ziarnistej kory, ogniskowy rozplam gleju Bergmanna, zanik neuronów jądra zębatego i jądra stropu, rozluźnienie struktury istoty białej zawojów mózdku, fragmentację i rozpad pojedynczych osłonek mielinowych, a także obrzmienie śródbłonek naczyńnych, poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych i krwinkotoki. Zmiany morfologiczne w obrębie pnia mózgu charakteryzowały się rozrzedzeniem struktury istoty białej,

zwłaszcza mostu, uszkodzeniem pojedynczych osłonek mielinowych oraz zanikiem dużych neuronów jądra olbrzymiokomórkowego tworzącego siatkowatego i jądra ślimakowego brzuszno mostu.

## REFERENCES

1. Chadwick D., Jenner P., Reynolds E. H.: Amines, anticonvulsants and epilepsy. *Lancet*, 1975, 1, 1425–1428.
2. Chiba K., Sukanuma T., Ishizaki T., Iriki T., Shirai Y., Neitch H., Hori M.: Comparison of steady state pharmacokinetics of valproic acid in children between monotherapy and multiple antiepileptic drug treatment. *J Pediatr*, 1985, 106, 653–658.
3. Cloyd J. C., Kriel R. L., Fischer J. H.: Valproic acid pharmacokinetics in children. Discontinuation of concomitant antiepileptic drug therapy. *Neurology*, 1985, 35, 1623–1627.
4. Collins G.: Cerebellar degeneration in thiamine-deficient rats. *Am J Pathol*, 1970, 58, 219–223.
5. Compostrini R., Muclow J. C.: Valproate induced hyperammonemia in two epileptic twins. *J Neurol*, 1985, 232, 167–175.
6. Coulter D. L., Allen R. J.: Secondary hyperammonemia: a possible mechanism for valproate encephalopathy. *Lancet*, 1980, 1, 1310–1311.
7. Dam M.: The number of Purkinje cells after diphenylhydantoin intoxication in monkeys. *Epilepsia*, 1970, 11, 199–206.
8. Dymecki J.: Padaczka. In: *Podstawy neuropatologii*. Eds: M. J. Mossakowski, J. Dymecki, M. Wender. Polish Medical Publishers, Warszawa, 1981, 580–587.
9. Eeg-Olofsson O., Lindskog U.: Acute intoxication with valproate. *Lancet*, 1982, 1, 1306–1307.
10. Franceschetti S., Hamon B., Heinemann V.: The action of valproate on spontaneous epileptiform activity in the absence of synaptic transmission and on evoked changes in  $Ca^{2+}$  and  $K^{+}$  in the hippocampal slices. *Brain Res*, 1986, 29.
11. Frey H. H., Janz D.: Antiepileptic Drugs. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 74. Springer, Berlin–Heidelberg–New York–Tokyo, 1985.
12. Herman Z. S., Szczurek B., Ważna-Boguńska C., Trzeciak H. I.: Zmiany neuropatologiczne w mózgu szczurów po długotrwałym stosowaniu neuroleptyków: oksazepam i protryptyliny. *Neuropat Pol*, 1978, 16, 533–543.
13. Hyman M. N., Dennis D. P., Sinclair K. G. A.: Tremor due to sodium valproate. *Neurology*, 1979, 29, 1177–1180.
14. Jakubiec E., Sobaniec W., Pelczar J.: Przeciwpadaczkowe działanie kwasu walproinowego. *Materiały Naukowe "Chemia Leków" (87)*, 1988, 69–73.
15. Karkos J.: Mechanizm działania ubocznego i toksycznego leków przeciwpadaczkowych. *Pol Tyg Lek*, 1972, 27, 1411–1415.
16. Karkos J.: Wpływ leków przeciwpadaczkowych na obraz morfologiczny mózgu szczurów. *Neuropat Pol*, 1973, 11, 429–439.
17. Lewis J. H., Zimmerman H. J., Garret C. T., Rosenberg E.: Valproate-induced hepatic steatogenesis in rats. *Hepatology*, 1982, 2, 870–873.
18. Löscher W.: Valproate induced changes in GABA metabolism at the subcellular level. *Biochem Pharmacol*, 1981, 30, 1364–1366.
19. Majkowski J.: Padaczka. Polish Medical Publishers, Warszawa, 1986.
20. Marescaux C., Ouwier R. A.: Adaptation of hepatic ammonia metabolism after chronic valproate administration in epileptic treated with phenytoin. *Eur Neurol*, 1985, 25, 191–198.
21. Markiewicz D., Dymecki J.: Dynamika zmian morfologicznych w mózgu myszy z padaczką audiogenną po wywołanych doświadczalnie gromadnych napadach drgawkowych. *Neuropat Pol*, 1978, 16, 73–81.
22. Meyler L., Herxheimer A.: Side effects of drugs. *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1968.
23. Reynolds E. H.: Mental effects of anticonvulsants, and folic acid metabolism. *Brain*, 1968, 91, 197–205.



24. Sobaniec W., Rudziński P., Jankowicz E., Sobaniec-Łotowska M., Kułak W.: Cardiazol-induced seizures and the concentrations of lipid peroxides in brain of rats under the influence of valproic acid and vitamin E. *Neuropat Pol*, 1989, 27, 229–236.
25. Strolin Benedetti M., Ruignx J.F., Dostert P.: Mécanismes d'action et toxicologie biochimique de l'acide valproïque. *L'Encephale*, 1984, 10, 177–188.
26. Suchy F.J., Balistreri W.F., Buchino J.J., Sondheimer J.M., Bates S.R.: Acute hepatic failure associated with the use of sodium valproate. Report of two fatal cases. *New Engl J Med*, 1979, 300, 962–966.
27. Sussman N. M., McLain L. W. Jr.: A direct hepatotoxic effect of valproic acid. *J. Neurol.* 1979, 242, 1173–1174.
28. Tarnowska-Dziduszko E.: Obraz morfologiczny mózdzku w przebiegu padaczki. *Neuropat Pol*, 1976, 14, 31–39.
29. Van Duijn H., Backmann M.: Dipropylacetic acid (Depakine) in experimental epilepsy in the alert cat. *Epilepsia*, 1975, 4, 601–616.
30. Wallace S.J.: Use of ethosuximide and valproate in the treatment of epilepsy. *Neurol Clin*, 1986, 4, 601–616.
31. Wares S., Millward-Sadler G. H.: Acute liver disease associated with sodium valproate. *Lancet*, 1980, 2, 1110–1113.
32. Warter J.M., Imler M., Marescaux C., Chabrier G.: Sodium valproate-induced hyperammonemia in the rat: role of the kidney. *Eur J Pharmacol*, 1983, 87, 177–182.
33. Woodbury D.M., Penry J.K., Schmidt R.P.: *Antiepileptic drugs*. Raven Press, New York, 1972.
34. Wyllie E., Wyllie R., Rothner A.D.: Valproate induced hyperammonemia in asymptomatic children. *Clin Res*, 1982, 30, 797 A.

Authors' address: Clinic of Neurology, School of Medicine, 24a, M. Skłodowskiej-Curie Str., 15-276 Białystok, Poland

Zakład Narodowy im. Ossolińskich – Wydawnictwo. Wrocław 1990.  
Objętość: ark. wyd. 10,50; ark. druk. 9,50; ark A<sub>1</sub> – 12,7.  
Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 4370/89



E. Kida, E. Matyja: Excitotoxin-mimicking effect of zinc upon the ultrastructure of rat hippocampus <i>in vitro</i> . . . . .	547
J. Dymecki, W. J. Freed: Effects of transplantation of cross-species <i>substantia nigra</i> into the lateral ventricle of rats with experimentally induced hemiparkinsonism . . . . .	557
H. Kroh: Glial elements in experimental cerebral sarcomas . . . . .	573
E. Kida, M. Niemczewska, H. Rudnicka, J. Baumritter: Word deafness syndrome with lateralized, progressive action myoclonus, epilepsy and cerebellar signs. Coexistence of multifocal and system, assymetrical CNS degeneration . . . . .	583
W. Sobaniec, E. Jankowicz, M. Sobaniec-Łotowska: Effect of valproic acid on the morphology of the rat cerebellum and brain stem . . . . .	593

SPIS TREŚCI

T. Zalewska: Wapniowo-zależna degradacja białek w ośrodkowym układzie nerwowym	447
M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, E. Sroczyński: Wolne kwasy tłuszczowe istoty białej mózgu starzejącego się szczura	467
A. Godlewski: Badania kario- i cytofotometryczne oligodendrogleju starzejącego się mózgu szczura	477
J. Węgiel, E. Medyńska, W. Dziedziak, W. Szirkowiec-Gmurczyk, J. Dymecki: Morfologiczna ocena składników tkankowych i komórkowych prążkowania, gałki bladej i istoty czarnej szczura 7-dniowego	491
G. Szumańska, R. Gadamski, M. J. Mossakowski: Aktywność cykazy adenylowej w zakończeniach synaptycznych odcinka CA <sub>1</sub> rogu Amona u chomika mongolskiego	505
A. Kapuściński, W. Hilgier: Eikosanoidy w mózgu i osoczu szczura po resuscytacji ze stanu śmierci klinicznej	519
J. Kałuża, D. Adamek, W. Mieżyński: Morfologiczne wykładniki zmian w ośrodkowym układzie nerwowym w sinicznych i bezsinicznych wadach wrodzonych serca w wieku rozwojowym. Stan komórek nerwowych i ich wypustek oceniony metodami barwnymi, impregnacyjnymi i w mikroskopie elektronowym. Część I. Rozwój dendrytów na podstawie badań metodą Golgiego	527
E. Kida, E. Matyja: Obraz zmian ultrastrukturalnych wywołanych w hodowli hipokampa przez cynk, imitujący uszkodzenia typowe dla pobudzających neurotoksyn	547
J. Dymecki, W. J. Freed: Wyniki międzygatunkowych transplantacji istoty czarnej do komory bocznej mózgu szczurów z doświadczalnie wywołanym parkinsonizmem	557
H. Kroh: Elementy glejowe w doświadczalnych mięsakach śródmózgowych	573
E. Kida, M. Niemczewska, H. Rudnicka, J. Baumritter: Zespół głuchoty słownej z współistniejącymi postępującymi niesymetrycznymi miokloniami, padaczką i objawami mózdkowymi w przebiegu ogniskowych oraz układowych zmian zwyrodnieniowych w ośrodkowym układzie nerwowym	583
W. Sobaniec, E. Jankowicz, M. Sobaniec-Łotowska: Wpływ kwasu walproinowego na obraz morfologiczny mózdku i pnia mózgu szczura	593

CONTENTS

T. Zalewska: Ca <sup>2+</sup> -mediated degradation of central nervous system (CNS) proteins	447
M. Wender, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, E. Sroczyński: Free fatty acids in cerebral white matter of senile rat brain	467
A. Godlewski: Karyo- and cytophotometric studies on the oligodendroglia of ageing rat brain	477
J. Węgiel, E. Medyńska, W. Dziedziak, W. Szirkowiec-Gmurczyk, J. Dymecki: Morphometric evaluation of tissue and cell composition of <i>caudate-putamen</i> , <i>pallidum</i> and <i>substantia nigra</i> in 7-day-old rat	491
G. Szumańska, R. Gadamski, M. J. Mossakowski: Ultrastructural studies on adenylate cyclase (AC) activity in the CA <sub>1</sub> sector of Ammon's horn in Mongolian gerbil	505
A. Kapuściński, W. Hilgier: Eicosanoids in rat brain and plasma after resuscitation from clinical death	519
J. Kałuża, D. Adamek, W. Mieżyński: Morphological abnormalities in the central nervous system in cyanotic and non-cyanotic congenital heart failures in the developmental age. Nerve cells and their processes evaluated with staining methods, impregnation and in electron microscope. Part I. Development of dendrites estimated with the use of Golgi method	527