

Temp. C 165

PL ISSN 0028-3894



STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

TOM 28

1990

ZESZYT 1-2

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 28

1990

ZESZYT 1-2

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

Werner Jänisch (Berlin), 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: Teresa Miodowska

ADRES REDAKCJI

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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Maszynopis niniejszego nru przekazano Wydawcy 11.09.1989



JANINA RAFAŁOWSKA, EWA DOLIŃSKA, DOROTA DZIEWULSKA,
STANISŁAW KRAJEWSKI*

ZAWAŁY MÓZGU LUDZI W WIEKU ŚREDNIM I STARCZYM. I. ZABURZENIA PRZEPUSZCZALNOŚCI BARIERY KREW-MÓZG. W BADANIACH IMMUNOCYTOCHEMICZNYCH**

Klinika Neurologiczna Akademii Medycznej, Warszawa

* Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Większość prac dotyczących zaburzeń bariery krew – mózg (BBB) w niedokrwieniu, oparta jest na modelach doświadczalnych. Obserwacje pacjentów z udarem niedokrwinnym mózgu wykazują, że przebieg kliniczny udaru z długotrwałym często obrzękiem mózgu i narastaniem objawów klinicznych, różni się znacznie od przebiegu doświadczalnie wywołanego niedokrwienia. Obserwacje kliniczne wskazują również, że proces ten przebiega różnie w zależności od wieku. Często spotyka się przypadki prawie bezobjawowego przebiegu zakrzepu tętnicy szyjnej wewnętrznej u ludzi starych oraz dramatycznego przebiegu zakończonego zgonem u ludzi w wieku młodym i średnim. Różny przebieg kliniczny może być odbiciem odmiennego stanu uszkodzeń strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego. Nasze badania stanowią próbę porównania zaburzeń przepuszczalności naczyń we wczesnym okresie udaru niedokrwinnego u ludzi w wieku średnim i starym.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na mózgach chorych, którzy zmarli w przebiegu udaru niedokrwinnego mózgu. Materiał obejmował 6 przypadków zmarłych w wieku od 45 do 57 lat i 9 przypadków w wieku od 80 do 101 lat. W pierwszych pięciu dniach choroby porównywano zmiany w przypadkach w wieku średnim i starym. Powyżej 5 dnia oceniono 1 przypadek w wieku średnim (50 lat) oraz 4 przypadki starcze w wieku 101 lat, 87, 87 i 83 (6, 11, 12, 15 i 35 dzień udaru). Sekcję ogólną wykonano do 24 godz. po zgonie. Podstawową charakterystykę materiału przedstawiono w tabeli 1.

** Praca wykonana w ramach problemu węzłowego CPBP – 06-02. II.1.4.

Tabela 1. Materiał
Table 1. Material

Nr	Wiek (lata)	Okres przeżycia (dni)	Sekcja ogólna	Miażdżycza naczyń mózgu	Badanie makroskopowe mózgu
No	Age (yrs)	Survival time (days)	Postmortem examination	Brain vessels arteriosclerosis	Gross-examination of brain
1	57	1	<i>Infarctus cordis</i>	++	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. cerebri mediae dextrae. Oedema</i>
2	84	1	<i>Oedema pulmonum. Infarctus cordis</i>	+++	<i>Thrombosis a. basilaris</i>
3	53	2	<i>Embolia a. pulmonalis. Oedema pulmonum</i>	-	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. fossae Sylvii lateris dextri. Oedema</i>
4	80	2	<i>Miocardio-fibrosis dyspersa. Atherosclerosis universalis gradu magno</i>	+	<i>Thrombosis a. cerebri mediae sinistrae Encephalomalacia alba in reg. vascularisationis eiusdem arteriae. Oedema</i>
5	49	3	<i>Vitium mitrale cordis</i>	+++	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. cerebri mediae et anterioris dextrae</i>
6	88	3	<i>Oedema pulmonum. Hypertrophia ventriculi sinistri cordis</i>	++	<i>Encephalomalacia alba in reg. Vascularisationis a. cerebri anterioris dextrae. Oedema</i>
7	55	4	<i>Oedema pulmonum. Hypertrophia ventriculi sinistri cordis</i>	+	<i>Encephalomalacia alba in reg. vascularisationis a. cerebri mediae sinistrae. Oedema</i>
8	89	4	<i>Oedema pulmonum. Pneumonia</i>	+	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. cerebri posterioris sinistrae et a. cerebelli superioris</i>
9	45	5	<i>Pneumonia et mediastinitis</i>	-	<i>Encephalomalacia alba in reg. vascularisationis a. cerebri mediae dextrae</i>
10	86	5	<i>Pneumonia</i>	++	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. cerebri mediae sinistrae. Oedema</i>
11	101	6	<i>Pneumonia. Hypertrophia ventriculi sinistri cordis</i>	+++	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. fossae Sylvii lateris sinistri</i>
12*	87	11	<i>Infarctus cordis. Hypertrophia</i>	+++	<i>Encephalomalacia alba in reg. vascularisationis a. cerebri mediae dextrae</i>
13*	50	12	<i>Embolia thrombogenes aa. pulmonales</i>	++	<i>Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. cerebri mediae dextrae. Oedema</i>
14*	87	15	<i>Embolia a. pulmonalis</i>	+	<i>Encephalomalacia alba in reg. vascularisationis a. cerebri mediae dextrae</i>
15	83	35	<i>Pneumonia</i>	+	<i>Thrombosis a. carotis internae sinistrae. Encephalomalacia haemorrhagica in reg. vascularisationis a. cerebri mediae sinistrae. Oedema</i>

* Przypadki z nadciśnieniem tętniczym
Cases with arterial hypertension

Bloki tkankowe pobrane z ognisk zawałowych oraz z przeciwległej półkuli, traktowanej jako materiał porównawczy, utrwalono w 10% buforowej formalinie i zatapiano w parafinie. Skrawki do badań histologicznych barwiono rutynowo HE i według metody Klüvera – Barrery. Do oceny zmian przepuszczalności naczyń zastosowano technikę immunoperoksydazy pośredniej według Sternbergera i wsp. (1970) w celu uwidocznienia tkankowej i komórkowej lokalizacji następujących białek surowicy krwi: albuminy, IgG i makroglobuliny. Ponadto oceniono nacieki krwiopochodne za pomocą przeciwciał przeciwko alfa₁-antytrypsynie stanowiącej znacznik komórek histiocytarnych (McCombe i wsp. 1985; Kochi, Budka 1987).

Metoda immunoperoksydazy pośredniej polegała na kolejnych inkubacjach odparafinowanych preparatów, początkowo z surowicą normalną świni (1:100) przez 1 godz. w celu wygaszenia niespecyficznego tła, a następnie przez noc z wyżej wymienionymi przeciwciałami odpowiednio rozcieńczonymi: albumina (1:5000, Biomed, Polska), alfa₁-antytrypsyna (1:1000, Dakopatts, Dania), IgG (1:5000, Biomed, Polska) i makroglobulina (1:3000, Biomed, Polska). Po kilkakrotnym płukaniu w PBS skrawki inkubowano po 45 min, z przeciwciałami świni przeciwko globulinom królika (1:50, Dakopatts, Dania) oraz kompleksem peroksydazy-antyperoksydazy (Dakopatts, Dania). Reakcje uwidoczniono umieszczając preparaty w 0,05% roztworze diaminobenzydyny (Sigma, USA) z dodatkiem 0,01% wody utlenionej. Po skontrastowaniu hematoksyliną i odwodnieniu w alkoholach o wzrastających stężeniach, preparaty zamykano za pomocą De-Pe-X (Serva, RFN).

WYNIKI

Badania histopatologiczne

Przypadki w wieku 45–47 lat. We wszystkich przypadkach zawał krwotoczny zlokalizowany był w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. W pierwszych 2 dniach w obszarze martwicy nie stwierdzono odczynu komórkowego, poza pojedynczymi makrofagami skupionymi przy nielicznych naczyniach. Obszar zawału odgraniczony był miejscami od otoczenia girlandowym pasmem zgąbczałej tkanki. Obszar martwicy rozplywnej z tworzeniem się różnej wielkości jam, wypełnionych makrofagami obserwowano od 3 dnia udaru. Występowały one zarówno w korze, jak i w istocie białej. Otaczające je tkanki były rozrzedzone, w ich obrębie widoczne były odczynowe astrocyty. W 3 dniu obszar martwicy miejscami oddzielony był od przyległej martwicy niezupełnej wąskim pasmem tkanki z licznymi drobnymi naczyniami i makrofagami. W 4, 5 i 12 dniu zawału zmiany były podobne, ale nieco bardziej nasilone. W obrębie zgąbczałej tkanki obserwowano skupiska makrofagów, bardziej rozległe były obszary jamistego rozpadu i wyraźna reakcja astrocytów z tworzeniem postaci gemistocytarnych w tkankach otaczających zawał.

Przypadki w wieku 80–101 lat. Poza jednym przypadkiem zawału mostu (przyp. 2) ogniska martwicze zlokalizowane były w obszarze unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. W pierwszych dwóch dniach udaru w barwieniu HE stwierdzono jedynie nieregularne zgąbczenie tkanki bez cech rozbiórki. Niewielkie okołonaczyniowe skupiska granulocytów widoczne były w 3 i 4 dniu choroby. W tym też dniu zawał odgraniczony był od tkanek otaczających

girlandowatym pasmem zgąbczałej tkanki. W 4 dniu choroby obszar zawału wykazywał nasilony stan gąbczasty. Na pograniczu martwiczo zmienionych i przyległych warstw kory rzadko obserwowano pałeczkowate komórki mikrogleju. Wyraźniejszy proces rozbiórki zawału w postaci skupisk makrofagów w obrębie zgąbczałej tkanki widoczny był w przypadku z 5-ciodniowym przeżyciem. Przypadek ten odznaczał się masywnymi przesiekami okołonaczyniowymi. Jednakże w 6 dniu choroby w przypadku zmarłego w wieku 101 lat, w obszarze zawału nie stwierdzono strukturalnych wykładników procesów rozbiórkowych, a jedynie nasilony stan gąbczasty wyznaczał brzeg martwiczej tkanki. Nieco mniej zgąbczałe tkanki otaczały ognisko zawału. W 11, 15 i 35 dniu proces rozbiórki mezodermalno-glejowej był wyraźnie zaawansowany i manifestował się obecnością licznych komórek żernych w ognisku udarowym. W obszarze martwicy niepełnej otaczającej ognisko zawału widoczny był rozplem reaktywnego astrogleju z tworzeniem postaci gemistocytarnych.

Badania immunocytochemiczne

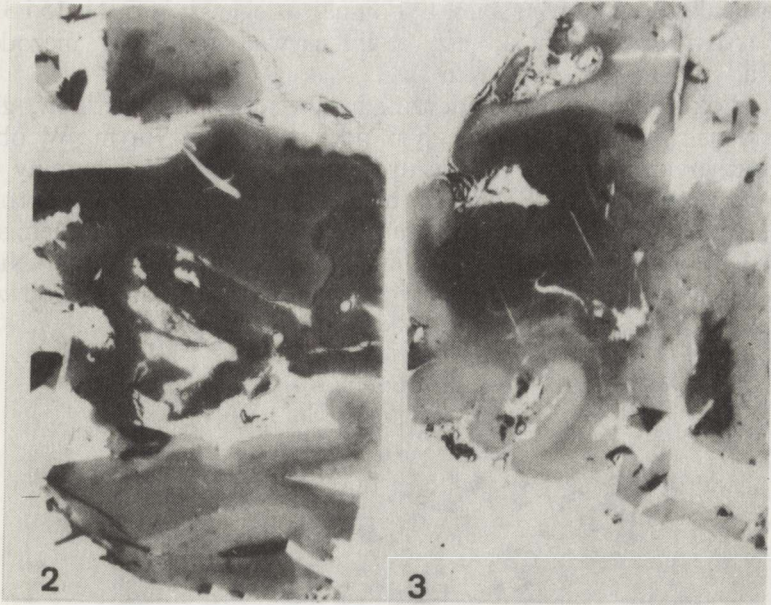
W badaniach immunocytochemicznych oceniano reakcję dyfuzyjną, okołonaczyniową i śródkomórkową. Rozległość reakcji dyfuzyjnej w badanych przypadkach przedstawiono graficznie na rycinie 20.

Albumina. Reakcja dyfuzyjna obecna była we wszystkich przypadkach, znacznie jednak rozleglejsza w wieku średnim, w którym, w przeciwieństwie do przypadków w wieku starczym, widoczna była od pierwszego dnia udaru (ryc. 1). W pierwszych 3 dniach udaru reakcja dyfuzyjna była mniej rozległa i intensywna w starszej grupie wieku (ryc. 1, 2, 3). Wyjątek w tym względzie stanowił przypadek Nr 3 (lat 53, 2 dzień), w którym odczyn immunohistochemiczny miał nieznaczne nasilenie. Należy zwrócić jednakże uwagę na fakt, iż w przypadku tym badany skrawek zawierał stosunkowo niewielki obszar martwicy krwotocznej, stanowiący brzeg ogniska zawałowego. W dalszych



Ryc. 1. Przyp. 1 (57 lat). Albumina. Wyraźna reakcja dyfuzyjna w obszarze zawału otoczonego girlandowatym pasmem zgąbczenia. Pow. 32 ×

Fig. 1. Case 1 (57 years). Albumin. Distinct diffuse reaction within infarct area surrounded by a festoon-like spongy tissue band. ×32

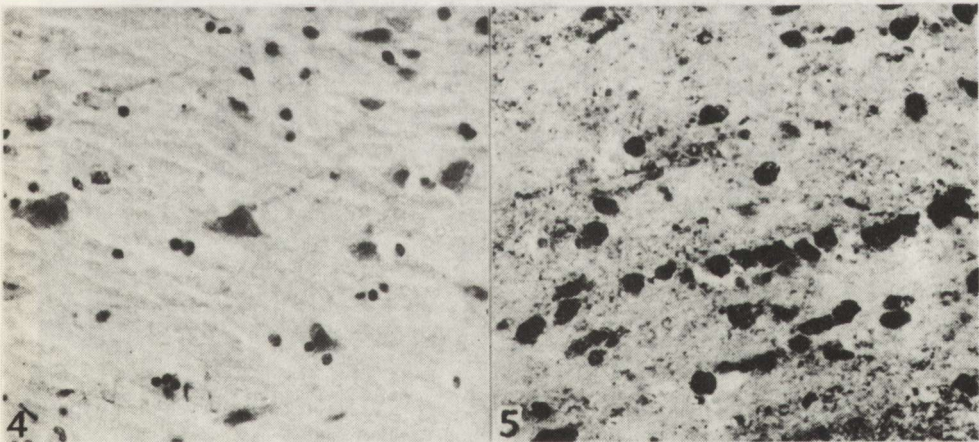


Ryc. 2. Przyp. 5 (49 lat). Albumina. Rozległa reakcja dyfuzyjna w obszarze zawału, szczególnie nasiloną w martwiczej korze. Pow. 1 ×

Fig. 2. Case 5 (49 years). Albumin. Extensive diffuse reaction within infarct area, especially pronounced in necrotic cortex. × 1

Ryc. 3. Przyp. 6 (88 lat). Albumina. Dyfuzyjna reakcja w trzonie jądra ogoniastego oraz w zwoju czołowym górnym i środkowym. Pow. 1 ×

Fig. 3. Case 6 (88 years). Albumin. Diffuse reaction within caudate nucleus body and in frontal superior and middle gyri. × 1



Ryc. 4. Przyp. 4 (80 lat). Albumina. Śródkomórkowa reakcja komórek nerwowych kory wyspy. Pow. 448 ×

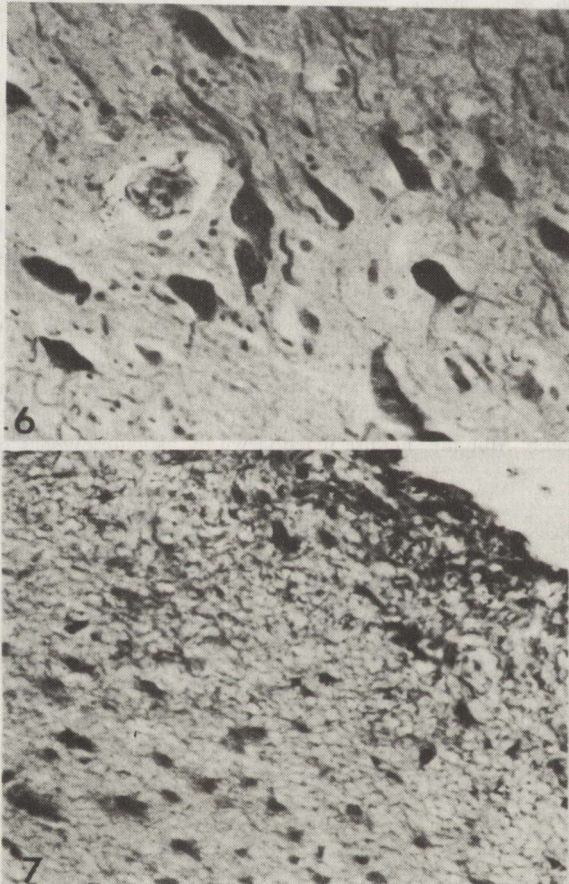
Fig. 4. Case 4 (80 years). Albumin. Intracellular reaction of insula cortex neurons. × 448

Ryc. 5. Przyp. 1 (57 lat). Albumina. Dyfuzyjna reakcja w skorupie. Śródkomórkowa reakcja makrofagów. Pow. 448 ×

Fig. 5. Case 1 (57 years). Albumin. Diffuse reaction within putamen. Intracellular reaction of macrophages. × 448

dniach nasilenie odczynu wzrastało. Był on najrozleglejszy w 5, 11, 15 i 35 dniu choroby (ryc. 20) w przypadkach z intensywną rozbiórką mezodermalno-glejową.

Reakcja okołonaczyniowa widoczna była w części przypadków, głównie charakteryzujących się dość rozległym odczynem dyfuzyjnym. W obszarze zawału odczyn immunohistochemiczny ujawniał obecność albuminy w komórkach nerwowych (ryc. 4), ścianach naczyń krwionośnych i w makrofagach (ryc. 5). W polach martwicy niezupełnej odczynowe astrocyty i gemistocyty wykazywały dodatnią reakcję na albuminę od 3 dnia choroby. Niekiedy śródkomórkowy odczyn widoczny był w okolicach oddalonych od zawału



Ryc. 6. Przyp. 1 (57 lat). Albumina. Śródkomórkowa reakcja komórek nerwowych i ich wypustek w polu h_2 sektora Sommera. Pow. 448 \times

Fig. 6. Case 1 (57 years). Albumin. Intracellular reaction of neurons and their processes in part h_2 of Sommer sector. $\times 448$

Ryc. 7. Przyp. 3 (53 lata). Albumina. Śródkomórkowa reakcja reaktywnych astrocytów podwysięciólkowych i komórek wyściółki. Pow. 448 \times

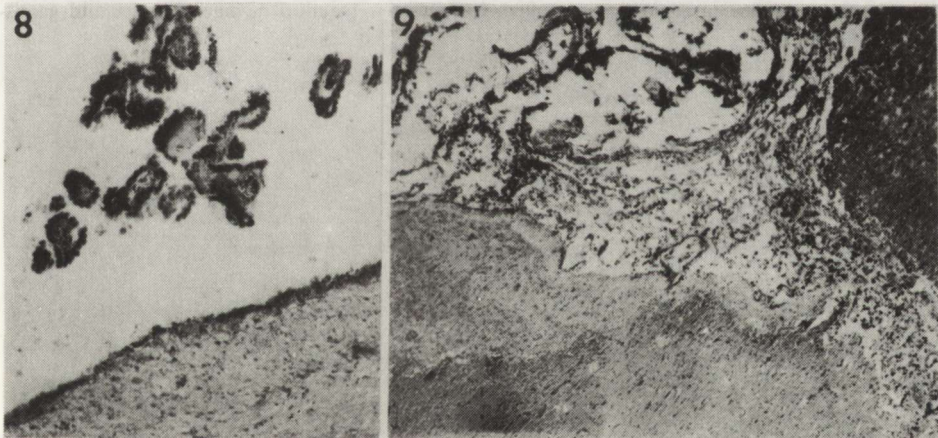
Fig. 7. Case 3 (53 years). Albumin. Intracellular reaction of subependymal active astrocytes and ependymal cells. $\times 448$

i występował w komórkach nerwowych (ryc. 6), odczynowych astrocytach (ryc. 7), oponach, wyściółce i splocie naczyniówkowym (ryc. 7, 8).

IgG. Reakcja dyfuzyjna, podobnie jak w odczynie na albuminę, występowała we wszystkich przypadkach. Była ona rozleglejsza i bardziej intensywna w przypadkach w średnim wieku (ryc. 9, 10) i pojawiała się już od 1 dnia zawału. Niekiedy była ostro odgraniczona od obszaru martwicy niezupełnej, otaczającej tkanki martwicze (ryc. 10). W starszej grupie odczyn dyfuzyjny IgG był bardzo nikły w pierwszych 4 dniach choroby, w późniejszych dniach był on wyraźniejszy i intensywniejszy (ryc. 11).

Reakcja okołonacyniowa występowała, przede wszystkim, w przypadkach z wyraźnym odczynem dyfuzyjnym. Śródkomórkowa reakcja immunohistochemiczna w obszarze zawału i przyległego obszaru martwicy niezupełnej występowała z różną intensywnością w komórkach nerwowych, makrofagach, odczynowych astrocytach i stwardniałych ścianach naczyń krwionośnych. Gemistocyty w obszarze martwicy niezupełnej wybarwione były w większości przypadków od 3 dnia choroby (ryc. 10). Odczyn śródkomórkowy w komórkach nerwowych i reaktywnych astrocytach w tkankach oddalonych od ogniska zawału obserwowano znacznie rzadziej niż w przypadku albuminy. Niekiedy wybarwione były opony przyległe do obszaru zawału (ryc. 9).

Alfa₂-makroglobulina. Niezależnie od grupy wieku zmarłych odczyn dyfuzyjny był znacznie mniej rozległy i intensywny niż w przypadku albuminy

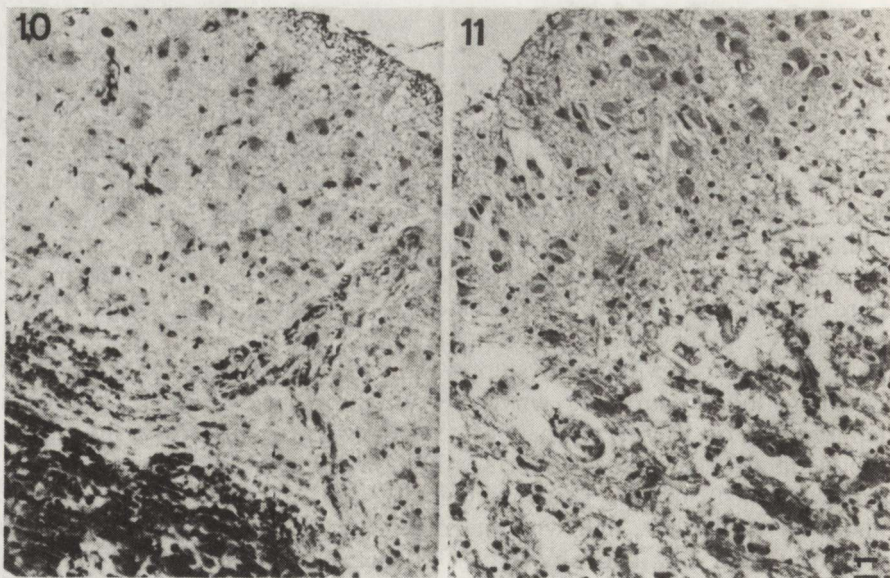


Ryc. 8. Przyp. 3 (53 lata). Albumina. Dodatnia reakcja komórek wyściółki i spłotu naczyniówkowego. Dyfuzyjne zabarwienie okolicy podwyściółkowej. Pow. 112 ×

Fig. 8. Case 3 (53 years). Albumin. Positive reaction of ependymal and chorioid plexus cells. Diffuse staining of subependymal region. × 112

Ryc. 9. Przyp. 5 (49 lat). IgG. Dyfuzyjna reakcja kory mózgu w obszarze zawału z zaoszczędzeniem warstwy drobinowej po jednej stronie. Dodatnia reakcja opon i ścian oponowych naczyń krwionośnych. Pow. 32 ×

Fig. 9. Case 5 (49 years). IgG. Diffuse reaction of cerebral cortex within infarct area with molecular layer spared on one side. Positive reaction of meninges and meningeal blood vessels. × 32

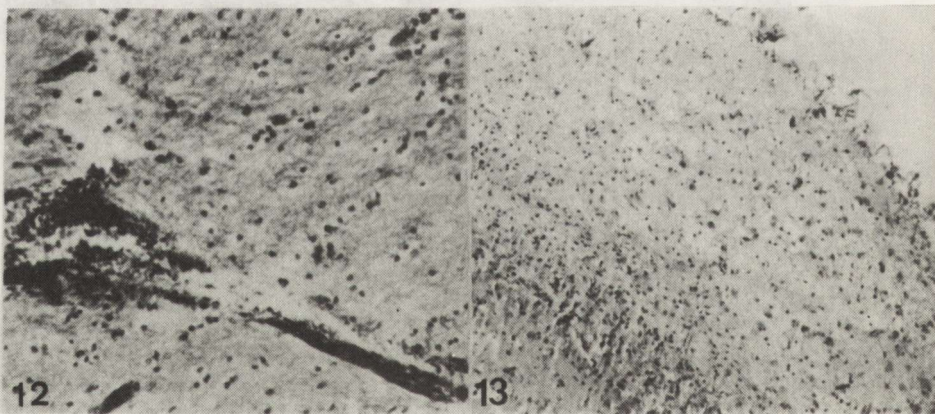


Ryc. 10. Przyp. 5 (49 lat). IgG. Intensywna reakcja dyfuzyjna w obszarze martwicy warstwowej kory, mniej intensywna w przyległej warstwie drobinowej. Śródkomórkowa reakcja gemistocytów w warstwie I. Pow. 224 ×

Fig. 10. Case 5 (49 years). IgG. Intensive diffuse reaction within laminar cortical necrosis, less intensive reaction in adjacent molecular layer. Intracellular reaction of molecular layer gemistocytes. × 224

Ryc. 11. Przyp. 12 (87 lat). IgG. Wyraźna reakcja dyfuzyjna w martwiczej tkance, słaba reakcja dyfuzyjna w przyległej, mniej zmienionej warstwie drobinowej. Śródkomórkowa reakcja makrofagów i gemistocytów. Pow. 224 ×

Fig. 11. Case 12 (87 years). IgG. Evident diffuse reaction in necrotic tissue. Slight diffuse reaction within adjacent molecular layer less changed. Intracellular reaction of macrophages and gemistocytes. × 224

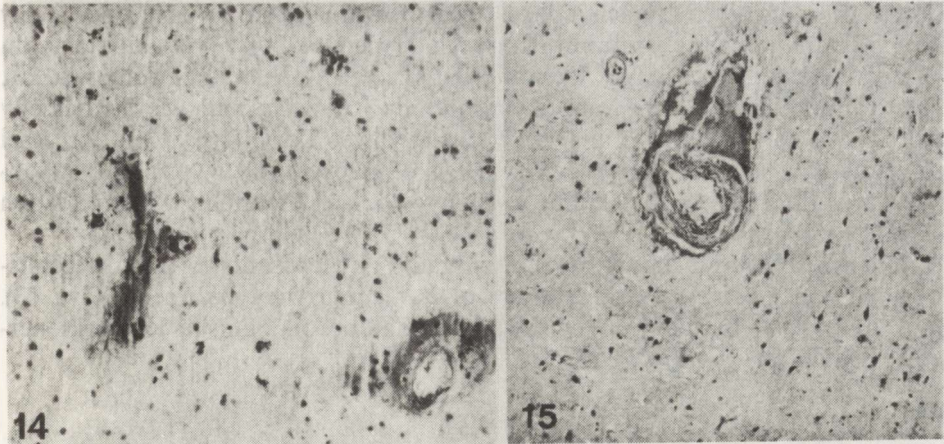


Ryc. 12. Przyp. 3 (53 lata). Alfa₂-makroglobulina. Okołonaczyniowa i dyfuzyjna reakcja w obszarze zawału. Pow. 224 ×

Fig. 12. Case 3 (53 years). Alpha₂-macroglobulin. Perivascular and diffuse reaction within infarct area. × 224

Ryc. 13. Przyp. 5 (49 lat). Alfa₂-makroglobulina. Dyfuzyjna reakcja w II i III warstwie kory. Śródkomórkowa reakcja reaktywnych astrocytów i gemistocytów. Pow. 112 ×

Fig. 13. Case 5 (45 years). Alpha₂-makroglobulin. Diffuse reaction within the 2nd and 3rd cortical layers. Intracellular reaction of reactive astrocytes and gemistocytes. × 112

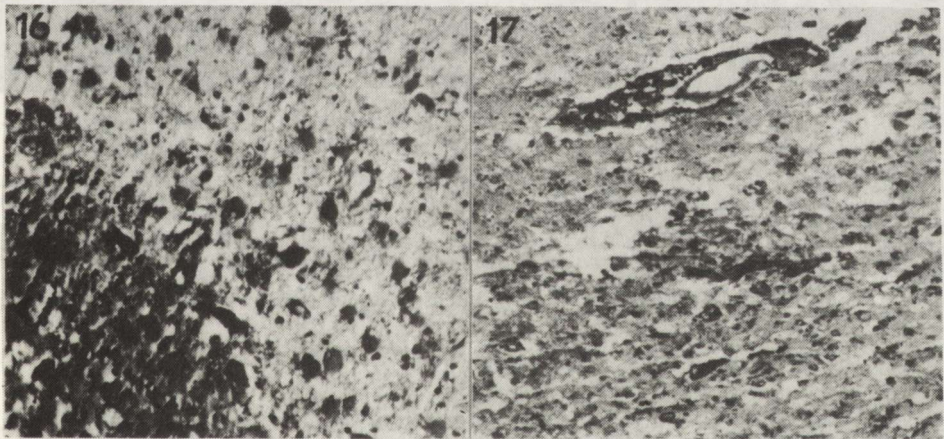


Ryc. 14. Przyp. 7 (55 lat). Alfa₂-makroglobulina. Reakcja okołonaczyniowa w górnych warstwach kory w obszarze zawału. Pow. 224 ×

Fig. 14. Case 7 (55 years). Alpha₂-macroglobulin. Perivascular reaction in upper cortical layers within infarct area. × 224

Ryc. 15. Przyp. 6 (88 lat). Alfa₁-antytrypsyna. Okołonaczyniowa oraz słaba dyfuzyjna reakcja w obszarze zawału. Pow. 112 ×

Fig. 15. Case 6 (88 years). Alpha₁-antitrypsin. Perivascular and slight diffuse reaction within infarct area. × 112



Ryc. 16. Przyp. 5 (49 lat). Alfa₁-antytrypsyna. Wyraźna reakcja dyfuzyjna w obszarze martwicy warstwowej. Śródkomórkowa reakcja makrofagów i gemistocytów w przyległej I warstwie kory. Pow. 224 ×

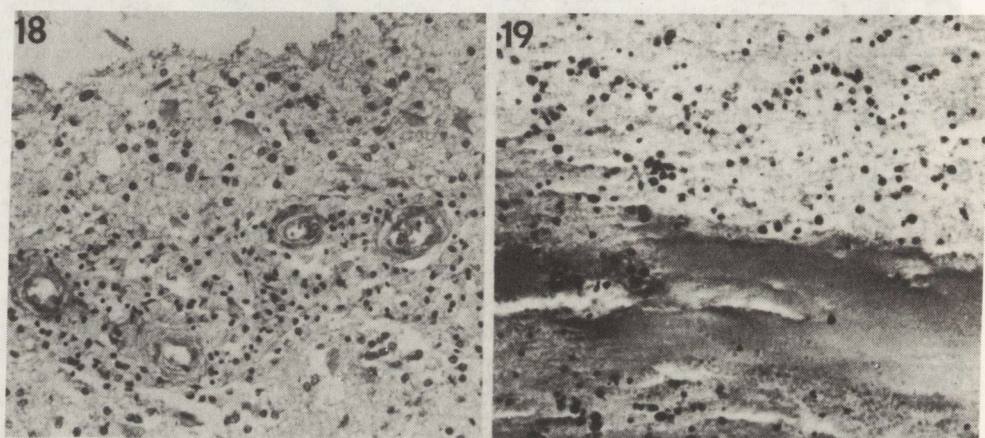
Fig. 16. Case 5 (49 years). Alpha₁-antitrypsin. Distinct diffuse reaction within laminar necrosis. Intracellular reaction of macrophages and gemistocytes in adjacent molecular cortical layer. × 224

Ryc. 17. Przyp. 13 (50 lat). Alfa₁-antytrypsyna. Wyraźna reakcja okołonaczyniowa i dyfuzyjna w obszarze zawału. Śródkomórkowa reakcja odczynowych astrocytów. Pow. 224 ×

Fig. 17. Case 13 (50 years). Alpha₁-antitrypsin. Distinct perivascular and diffuse reaction within infarct area. Intracellular reaction of macrophages and reactive astrocytes. × 224

i IgG. W pierwszych dniach udaru obserwowano jednak różnicę pomiędzy przypadkami w wieku średnim i starszym (ryc. 12 i 20). W wieku starszym rozległą reakcję dyfuzyjną stwierdzono jedynie w 15 i 35 dniu zawału (ryc. 20). Często ograniczona była ona wyłącznie do obszaru martwicy. Niekiedy widoczna była w obrębie martwicy warstwowej kory (ryc. 13). W części przypadków obecny był również odczyn okołonaczyniowy występujący w obszarze zawału (ryc. 14), szczególnie wyraźny w polach przesięku w przypadkach 10 i 15.

Odczyn śródkomórkowy był nikły i rzadko stwierdzano go tylko w gemistocytach i odczynowych astrocytach w obszarze martwicy niezupełnej (ryc. 13). Sporadycznie wybarwione były również oddalone od ogniska komórki nerwowe i splot naczyniówkowy.



Ryc. 18. Przyp. 12 (83 lata). Alfa₁-antytrypsyna. Lekkie dyfuzyjne wybarwienie podłoża. Śródkomórkowa reakcja gemistocytów oraz zeszkliwiałych ścian naczyń krwionośnych. Pow. 224 ×

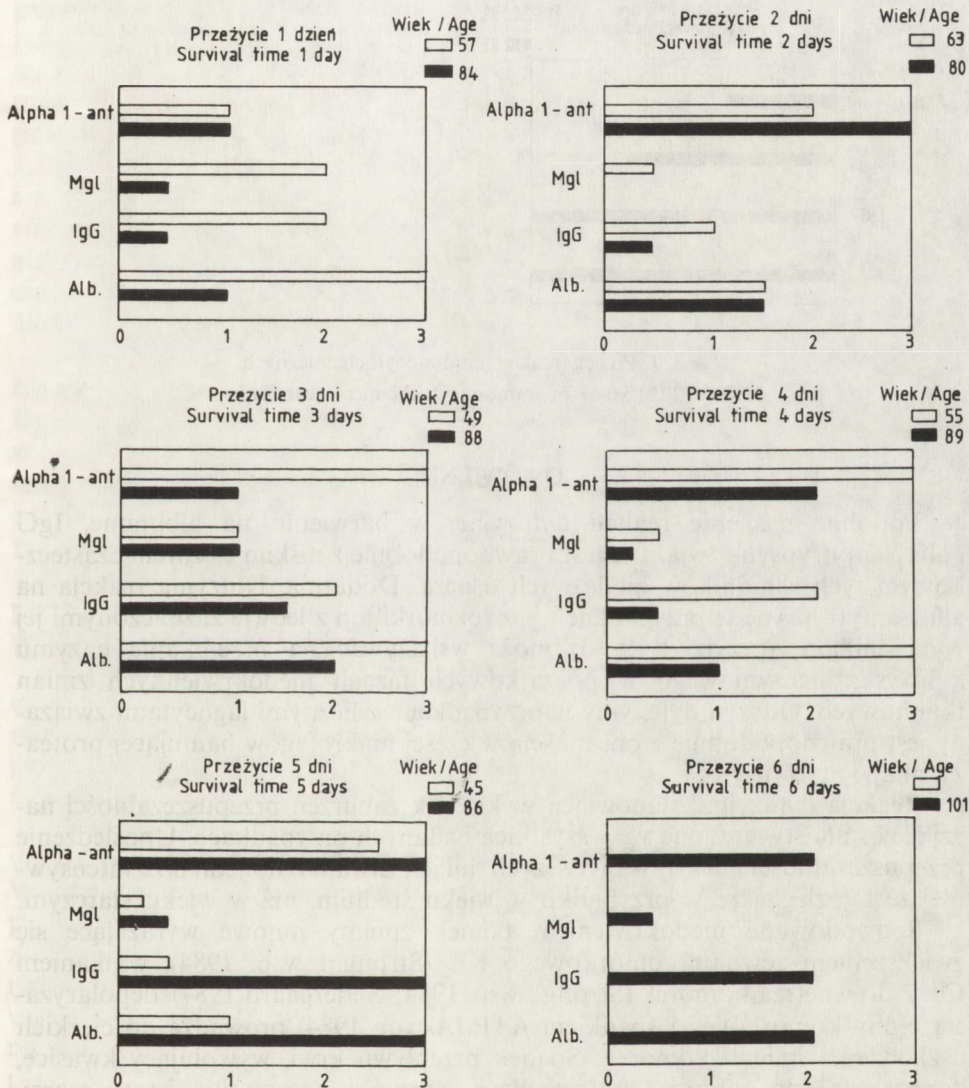
Fig. 18. Case 12 (83 years). Alpha₁-antitrypsin. Light diffuse staining of the background. Intracellular reaction of gemistocytes and hyalinized walls of blood vessels. × 224

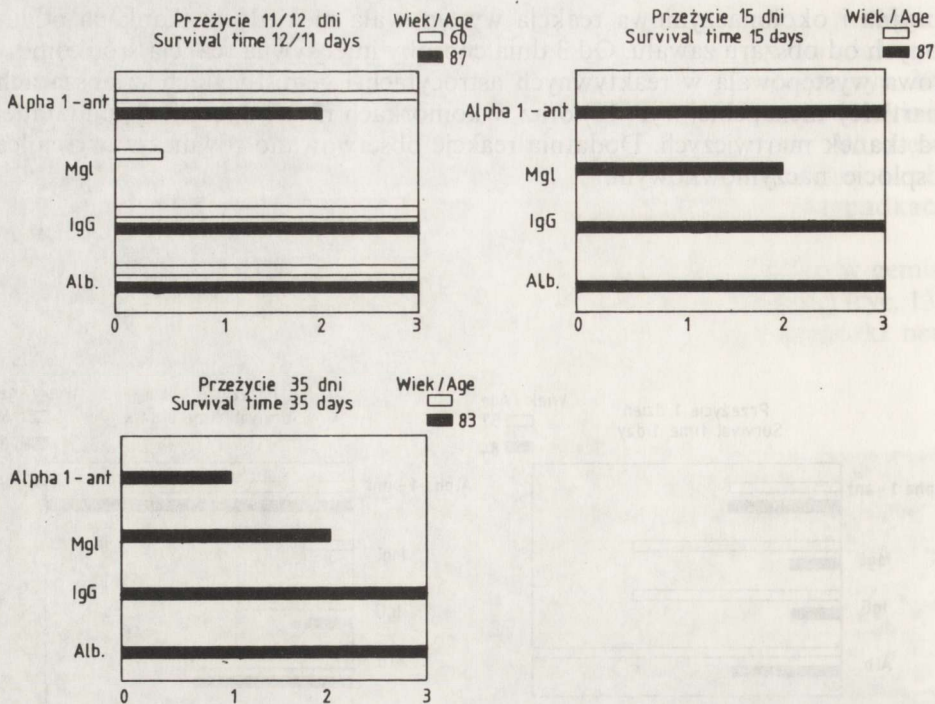
Ryc. 19. Przyp. 10 (86 lat). Alfa₁-antytrypsyna. Intensywna reakcja przesięku okołonaczyniowego. Pow. 224 ×

Fig. 19. Case 10 (86 years). Alpha₁-antitrypsin. Intensive reaction of the perivascular transudate. × 224

Alfa₁-antytrypsyna. Rozległość i intensywność odczynu dyfuzyjnego była podobna w obu grupach wieku, jedynie w 3 i 4 dniu udaru w grupie starszej był on mniej rozległy (ryc. 20). Reakcja dyfuzyjna występowała zarówno w przypadkach bez udziału makrofagów (ryc. 15) i przy ich ledwie zaznaczonej obecności, jak w przypadkach intensywnej rozbiórki mezodermalnej (ryc. 16). Nieco mniej intensywna była ona we wczesnych okresach zawału, nasilając się w okresach późniejszych (ryc. 17, 18), kiedy intensywnie wybarwione były przesięki okołonaczyniowe (ryc. 19). Wyjątek stanowił przypadek starczy w 2 dniu zawału, w którym nie stwierdzono reakcji dyfuzyjnej w ogóle. Dy-

fuzyjna i okołonaczyniowa reakcja występowała niekiedy w tkankach oddalonych od obszaru zawału. Od 3 dnia choroby intensywne reakcje śródkomórkowa występowała w reaktywnych astrocytach i gemistocytach w obszarach martwicy niezupełnej (ryc. 16) oraz w komórkach nerwowych kory, oddalonych od tkanek martwiczych. Dodatnią reakcję obserwowano również w wysięłce i splocie naczyniówkowym.





Ryc. 20. Zasięg reakcji immunocytochemicznych
Fig. 20. Extent of immunocytochemical reactions

OMÓWIENIE

Podobne nasilenie reakcji dyfuzyjnej w barwieniu na albuminę, IgG i alfa₁-antytrypsynę związane jest prawdopodobnie z niskim ciężarem cząsteczkowym tych składników białkowych osocza. Dodatnia dyfuzyjna reakcja na alfa₁-antytrypsynę w przypadkach bez rozbiórki lub z ledwie zaznaczonymi jej wykładnikami (przyp. 1, 2, 3) może wskazywać na przenikanie enzymu z łożyska naczyniowego w początkowych fazach niedokrwiennych zmian tkankowych. Odczyn dyfuzyjny w przypadkach z licznymi fagocytami związany jest prawdopodobnie z obecnością w części makrofagów hamującej proteazy alfa₁-antytrypsyny.

Reakcja dyfuzyjna, stanowiąca wykładnik zaburzeń przepuszczalności naczyń, została stwierdzona we wszystkich badanych przypadkach. Upośledzenie przepuszczalności naczyń w pierwszych dniach zawału było jednakże intensywniejsze i rozleglejsze w przypadku w wieku średnim, niż w wieku starym.

Spowodowane niedokrwieniem tkanek zmiany jonowe wyrażające się zwiększeniem zewnątrzkomórkowego K⁺ (Strong i wsp. 1984), wnikaniem Ca²⁺ do wnętrza komórek (Strong i wsp. 1984; Nedergaard 1987), depolaryzacją błony komórkowej i spadkiem ATP (Astrup 1984) prowadzą do ciężkich uszkodzeń i śmierci komórek. Spadek przepływu krwi, wywołujący kwasicę, doprowadza do zaburzeń autoregulacji naczyń i poszerzenia istoty szarej,

uchwytnego w tomografii komputerowej (Kinkel i wsp. 1980). Narastająca kwasica zwiększa przepuszczalność bariery krew-mózg (Klatzo 1987), a powstające mleczany (Rafałowska i wsp. 1978) stanowią dodatkowy czynnik uszkadzający tkanki (Paljärvi 1984). Dojrzewanie zmian morfologicznych (Klatzo 1975) prowadzi do dalszego wzrostu przepuszczalności BBB (Mrsulja i wsp. 1978) i przejawia się zarówno głębokimi zaburzeniami metabolicznymi, jak i procesem rozbiórki tkanek. Należałoby sądzić, że w każdym zawałe mózgu, wywołanym zatrzymaniem lub znacznym spadkiem przepływu w dużym naczyniu tętniczym dochodzi do przedstawionych powyżej zmian. Jednakże w przeciwieństwie do koncepcji Ingrama i wsp. (1974) o upośledzeniu funkcji BBB z wiekiem, nasz materiał wskazuje, że w przypadkach starczych uszkodzenie BBB narastało wolniej i było być może mniejsze. Dane o zmniejszonej przepuszczalności naczyń mózgu w wieku starczym są bardzo skąpe. Jedyne informacje na ten temat przedstawia Quadbeck (1982). Zjawisko to może być uwarunkowane przez szereg czynników. Jednym z nich może być obniżony metabolizm starczego mózgu, przystosowujący się przez wiele lat do zaburzeń przepływu mózgowego. Niedokrwienie tkanek może wywoływać mniejsze i wolniej narastające dojrzewanie zarówno zmian morfologicznych, jak i zaburzeń metabolicznych, w tym również kwasicy. Być może mają w tym również udział zmiany w stanie błon komórkowych występujące w wieku starczym. Na obecność tych procesów wskazywałyby, między innymi, jakościowe i ilościowe zmiany w mielinie istoty białej mózgu (Niebrój-Dobosz i wsp. 1986; 1988; 1989).

Według koncepcji Cervósa-Navarro i wsp. (1983), kolagen włósniczkowej błony podstawnej jest częścią układu regulującego przepuszczalność naczyń. Być może dodatkowym czynnikiem zmniejszającym ich przepuszczalność w wieku starczym są występujące w nich zmiany włókniste. Aktywowany wreszcie w martwicy proces pinocytozy (Katzman i wsp. 1977; Westergaard i wsp. 1978; Bakay, Lee 1968) związany jest z wysoką aktywnością enzymatyczną komórek śródbłonna włósniczek (Kreutzberg, Toth 1983; Vorbrodtt i wsp. 1983). Nie można wykluczyć, że zaawansowany wiek może mieć wpływ na procesy enzymatyczne w tych komórkach, pomimo braku danych na ten temat w dostępnym nam piśmiennictwie.

Wzmiankowane wyżej czynniki mogą wpływać na mniej nasilone i jakby opóźnione zaburzenia przepuszczalności naczyń w pierwszych dniach udaru niedokrwienego w wieku starczym. Po kilku dniach jednak zaburzenia przepuszczalności naczyń w wieku średnim i starczym mają podobny charakter i nasilenie.

Przedstawiony przez nas materiał wykazuje obecność białek surowicy krwi w tkankach mózgu przez wiele dni, a nawet tygodni od początku choroby. Wydaje się, że zjawisko to może być tłumaczone w dwojaki sposób. Po pierwsze może ono być następstwem wczesnego „jednorazowego” wycieku z łożyska naczyniowego i jego pozostawania w tkance w wyniku wolnego metabolizowania obcego dla niej białka. Z drugiej jednak strony może to być wynikiem długotrwałego lub powtarzającego się zaburzenia przepuszczalności naczyń w niedokrwienym udarze mózgu u człowieka. Za taką możliwością przemawiają zarówno niektóre badania kliniczne, jak i doświadczalne.

Doświadczalne zamknięcie tętnicy środkowej mózgu u małp powoduje, zależnie od wielkości zawału, zaburzenia mechanizmów barierowych przez okres pierwszych 3 tygodni zawału, przy czym restytucja funkcji bariery nie wykazuje zależności od wielkości zawału (Olsson i wsp. 1971). Dane dotyczące okresu zaburzeń przepuszczalności BBB w udarach niedokrwiennych człowieka są bardzo zróżnicowane w zależności od stosowanej metody badania. Na podstawie oceny stosunku albumin i alfa₂-makroglobulin w płynie mózgowo-rdzeniowym i surowicy krwi, zaburzenia BBB wykazano w większości przypadków udarów niedokrwiennych u ludzi w pierwszych 2 tygodniach od udaru, rzadko utrzymywały się one jednak przez 4 tygodnie (Hornig i wsp. 1983). W tomografii komputerowej zmiany świadczące o zaburzeniach autoregulacji naczyń po niedokrwieniu występują w 80% przypadków w ciągu 3 tygodni. W niektórych przypadkach zmiany te można było stwierdzić nawet w 4 miesiące po udarze (Kinkel i wsp. 1980).

Modele doświadczalne wskazują na korelację między wielkością obszaru uszkodzenia tkanek a spadkiem przepływu krwi (Tyson i wsp. 1984). Stwierdzono ponadto, że do spadku przepływu krwi i narastania zmian morfologicznych dochodzi również w tkankach otaczających zawał (Mies i wsp. 1983), a wahania w przepływie krwi doprowadzają do zwiększenia obszaru uszkodzenia (Paljärvi 1984). Obszar uszkodzenia zależy również od czasu trwania niedokrwienia (Westergaard i wsp. 1976). Jest faktem, iż w zróżnicowanych pod względem patogenezy udarach niedokrwiennych człowieka występują często dłuższe lub krótsze okresy zaburzeń hemodynamicznych związane ze spadkiem ciśnienia tętniczego krwi. Powoduje to możliwość narastania zmian tkankowych i obecność różnych stadiów morfologicznych niedokrwienia u tego samego chorego. Zwiększające przepuszczalność BBB nadciśnienie (Rapoport 1976; Westergaard i wsp. 1978; Nag, Harik 1987) oraz infekcje bakteryjne i wirusowe (Bakay 1962; Hänninen i wsp. 1980) występują często w przebiegu udaru. Mogą więc mieć wpływ na stan przepuszczalności BBB prowadząc do zmian w przepuszczalności naczyń mózgowych. W związku z tym u pacjentów z udarem niedokrwiennym istnieją duże trudności w przewidywaniu okresu zaburzeń przepuszczalności BBB. Trudno też wydzielić, suponowane przez niektórych autorów na podstawie modeli doświadczalnych, dwie fazy wzrostu przepuszczalności naczyń (Kuroiwa i wsp. 1985). W materiale ludzkim rozgraniczanie dwóch faz przepuszczalności BBB w zależności początkowo od naczyń powierzchownych, a następnie od nowo tworzących się w procesie rozbiórki (Mei Liu 1988), sprowadza zaburzenia w przepuszczalności BBB wyłącznie do procesu miejscowego. Niektórzy autorzy wskazują na niewątpliwą możliwość udziału we wzroście przepuszczalności BBB czynników ogólnoustrojowych związanych, między innymi, z płytkami krwi i działaniem pozamózgowych czynników neurohumoralnych (Dietrich i wsp. 1988).

Wydaje się przeto, że liczne czynniki mogą mieć wpływ na długotrwałość zaburzeń przepuszczalności bariery krew-mózg w warunkach klinicznych, a wiek pacjenta z wieloma nakładającymi się dodatkowymi, przebytymi i współistniejącymi procesami chorobowymi sprawia, że dane uzyskane w modelu doświadczalnym nie pokrywają się z danymi, uzyskanymi na podstawie oceny mózgu człowieka.

WNIOSKI

1. Zaburzenia przepuszczalności naczyń w udarach niedokrwiennych wydają się być w pierwszych dniach udaru mniejsze w wieku starszym niż w średnim.
2. Znaczne zwiększenie przepuszczalności naczyń w późniejszych okresach udaru w wieku starszym (podobne do stwierdzonych w wieku średnim) zdaje się wskazywać na bardziej stopniowe niż w wieku średnim narastanie tych zaburzeń.
3. Zaburzenia przepuszczalności naczyń w udarach niedokrwiennych człowieka są bardziej długotrwałe niż w modelach doświadczalnych niedokrwienia mózgu.

HUMAN BRAIN INFARCTS IN MIDDLE AND SENILE AGE.
I. BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY
IN IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDIES

Summary

Brains of the deceased in the age from 45 to 57 years (6 cases) and from 80 to 101 years (9 cases) with ischemic brain damage were studied. Technique of the peroxidase-antiperoxidase (Sterberger et al. 1970) was used for visualization of the brain tissue reactivity for albumin, IgG, alpha₁-antitrypsin and alpha₂-macroglobulin. In all cases the disturbances of the blood vessels permeability were found. The BBB deterioration within the first days of brain infarct seems to be smaller in senile age than in middle age. However, after some days senile blood vessels permeability increases and become similar in both age groups.

PIŚMIENNICTWO

1. Astrup J.: Ischemic penumbra results in incomplete infarction: is the sleeping beauty dead? *Stroke*, 1984, 15, 757–758.
2. Bakay L.: The cerebral uptake of tritiated tetracycline from blood and cerebrospinal fluid under normal conditions and in experimental pneumococcal meningitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1962, 21, 424–436.
3. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697–706.
4. Cervós-Navarro J., Artigas J., Mrsulja B. J.: Morphofunctional aspects of the normal and pathological blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, Suppl 8, 1–19.
5. Dietrich W. D., Prado R., Watson B. D., Nakayama H.: Middle cerebral artery thrombosis: acute blood-brain barrier consequences. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47, 443–451.
6. Hänninen P., Arstila P., Lang M., Salmi A., Panelius M.: Involvement of the central nervous system in acute uncomplicated measles virus infection. *J Clin Microbiol*, 1980, 11, 610–613.
7. Hornig C. R., Busse O., Derndorf W., Kaps M.: Changes in CSF blood-brain barrier parameters in ischaemic cerebral infarction. *J Neurol*, 1983, 229, 11–16.
8. Ingram C. R., Phegan K. J., Blumenthal H. T.: Significance of an aging-linked neuron binding gamma-globulin fraction of human sera. *J Gerontol*, 1974, 29, 20–27.
9. Katzman R., Clasen R., Klatzo I., Meyer J. S., Pappius H. M., Waltz A. G.: Brain edema in stroke. *Stroke*, 1977, 8, 510–540.
10. Kinkel W. R., Jacobs L., Kinkel P. R.: Grey matter enhancement: a computerized tomographic sign of cerebral hypoxia. *Neurology*, 1980, 30, 810–819.
11. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *The nervous system — the basic neuroscience*. Red.: D. B. Tower. Raven Press, New York, 1975, 313–322.

12. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 72, 236–239.
13. Kochi N., Budka H.: Contribution of histiocytic cells to sarcomatous development of the gliosarcoma. An immunohistochemical study. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 73, 124–130.
14. Kreutzberg G. W., Toth L.: Enzyme cytochemistry of the cerebral microvessel wall. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, Suppl 8, 35–41.
15. Kuroiwa T., Ting P., Martinez M., Klatzo I.: The biphasic opening of the blood-brain barrier to protein following temporal middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, 68, 122–129.
16. McCombe P. A., Clark P., Frith J. A., Hammond S. R., Stewart G. J., Pollard J. D., McLeod J. G.: α_1 -antitrypsin phenotypes in demyelinating disease: An association between demyelinating disease and the allele P and M3. *Ann Neurol*, 1985, 18, 514–516.
17. Mei Liu M.: Neovasculature and blood-brain barrier in ischemic brain infarct. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1988, 75, 422–426.
18. Mies G., Auer L. M., Ebhardt G., Traupe H., Heiss W.-D.: Flow and neuronal density in tissue surrounding chronic infarction. *Stroke*, 1983, 14, 22–27.
19. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Ito U., Fujimoto T., Walker J. T., Jr., Spatz M., Klatzo I.: Cerebral ischemia: some new aspects of postischemic period. W: Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension. Red.: M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. PZWL, Warszawa, 1978, 48–52.
20. Nag S., Harik S. J.: Cerebrovascular permeability to horseradish peroxidase in hypertensive rats: effect of unilateral ceruleus lesion. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 73, 247–253.
21. Nedergaard M.: Neuronal injury in the infarct border: a neuropathological study in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 73, 167–274.
22. Niebrój-Dobosz I., Rafałowska J., Barcikowska-Litwin M.: Brain myelin in senile patients with infarction. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 351–364.
23. Niebrój-Dobosz I., Rafałowska J., Łukasiuk M.: Does lipid changes influence the density of human brain myelin in aging? *Neuropat Pol*, 1989, 27, w druku.
24. Niebrój-Dobosz I., Wiśniewska W., Barcikowska-Liwin M.: Influence of aging on density of myelin fractions isolated from human white matter. A preliminary report. *Neuropat Pol*, 1988, 26, 19–25.
25. Olsson Y., Crowell R. M., Klatzo I.: Blood-brain barrier to protein tracers in focal cerebral ischemia and infarction caused by occlusion of the middle cerebral artery. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1971, 18, 89–102.
26. Paljärvi L.: Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: a topographic study with high-resolution light microscopy of early recovery in a rat model of severe incomplete ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 64, 89–98.
27. Quadbeck G.: cyt. wg Lee J. C.: Anatomy of the blood-brain barrier under normal and pathological conditions. W: Histology and histopathology of the nervous system. Red.: W. Haymaker, R. D. Adams, Ch. C. Thomas. Springfield, Illinois, 1982, 1, 798–870.
28. Rafałowska J., Friedman A., Karczewska E., Niebrój-Dobosz I., Tomankiewicz Z.: Ocena badań gazometrycznych oraz kwasu mlekowego w krwi tętniczej i płynie mózgowo-rdzeniowym w zawałach mózgu. *Neurol Neurochir Pol*, 1978, 12, 689–697.
29. Rapoport S. J.: Opening of the blood-brain barrier by acute hypertension. *Exp Neurol*, 1976, 52, 467–479.
30. Sternberger L. A., Hardy P. M., Jr., Cuculis F. F., Meyer M. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem Cytochem*, 1970, 18, 315–333.
31. Strong A. J., Fomlinson B. E., Vehables G. S.: Ischemic penumbra results in incomplete infarction: is the sleeping beauty dead? *Stroke*, 1984, 15, 755–756.
32. Tyson G. W., Teasdale G. M., Graham D. J., McCulloch J.: Focal cerebral ischemia in the rat: topography of hemodynamic and histopathological changes. *Ann Neurol*, 1984, 15, 559–567.
33. Vorbrodt A. W., Loosinsky A. S., Wiśniewski H. M.: Enzyme cytochemistry of blood-brain barrier (BBB) disturbances. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, Suppl 8, 43–57.
34. Westergaard E., Go G., Klatzo I., Spatz M.: Increased permeability of cerebral vessels to horseradish peroxidase induced by ischemia in Mongolian gerbils. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1976, 35, 307–325.

35. Westergaard E., Van Deurs B., Brønsted H. E.: Increased permeability of cerebral endothelium caused by acute hypertension. W: Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension. Red.: M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh. PZWL, Warszawa, 1978, 179–185.

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

Informacja Zarządu Głównego STOWARZYSZENIA NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

29 marca 1990 r. w Krakowie odbyło się Walne Zgromadzenie SNP, któremu przewodniczył Prof. dr Mieczysław Wender. Sprawozdanie z działalności Stowarzyszenia w okresie od 5 maja 1987 r. do 29 marca 1990 r. złożył ustępujący Prezes Prof. dr Józef Kałuża. Prof. dr Mirosław J. Mossakowski przedstawił sprawozdanie z działalności Redakcji kwartalnika „Neuropatologia Polska”.

Komisja Wnioskowa w składzie: dr Bogna Schmidt-Sidor, dr Józefa Dąbrowska i doc. dr Janusz Alwasiak przedstawiła następujące wnioski:

1. Zebrania naukowo-szkoleniowe SNP powinny być organizowane we współpracy z innymi Stowarzyszeniami i zawierać w programie więcej ciekawych przypadków klinicznych i neuropatologicznych.

2. Należy dołożyć wszelkich starań dla utrzymania czasopisma „Neuropatologia Polska” i publikowania prac wyłącznie w języku angielskim.

3. Należy popierać sprawę rozwoju specjalizacji z neuropatologii i zająć się propagowaniem tej specjalności wśród patologów i neuropatologów.

4. Przy wyjazdach na zagraniczne konferencje naukowe należy uwzględnić w większym stopniu niż dotychczas młodych pracowników naukowych.

5. Należy zmniejszyć ilość nagród Stowarzyszenia z 3 do 1 lub utrzymać 3 nagrody niekoniecznie połączone z nagrodą pieniężną.

Walne zgromadzenie podjęło uchwałę o podniesieniu składki członkowskiej do 50 000 zł rocznie.

W wyborach do Zarządu Głównego nowej kadencji, w oddzielnych głosowaniach wybrano: Prof. dr Mirosława Mossakowskiego na Prezesa Stowarzyszenia, Prof. dr Marię Dąborską na Wiceprezesa, Doc. dr Irminę Zelman na Redaktora Naczelnego „Neuropatologii Polskiej”. Do Zarządu wybrano: Prof. dr. Jerzego Dymeckiego, Doc. dr Krystynę Honczarenko, Doc. dr Danutę Maślińską i dr Halinę Weinrauder.

Na posiedzeniu 19 kwietnia 1990 r. Zarząd Główny ukonstytuował się następująco:

Prof. dr M. J. Mossakowski	— Prezes
Prof. dr M. Dąborska	— Wiceprezes (sprawy współpracy z ośrodkami i Towarzystwami zagranicznymi).
Dr H. Weinrauder	— Sekretarz
Prof. dr J. Dymecki	— Skarbnik (sprawy „Fundacji Polsko-Amerykańskiej”).
Doc. dr K. Honczarenko	— Członek Zarządu (sprawy członków Stowarzyszenia).
Doc. dr D. Maślińska	— Członek Zarządu (organizacja posiedzeń naukowych, kontakty ze Stowarzyszeniami krajowymi).

Sekretarz Zarządu Głównego
dr Halina Weinrauder

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

CEREBRAL ISCHEMIA REDUCES THE DENSITY OF ^{125}I -IODIPINE BINDING SITES IN THE RAT BRAIN

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

The introduction of tritiated 1,4-dihydropyridines (DHP) has greatly facilitated the identification and characterization of calcium channels in different tissues (Glossmann et al. 1982; Janis, Triggler 1983). Recent investigations have demonstrated that neurons have a number of different types of calcium channels. At least three types of voltage-sensitive calcium channels (VSCC) termed L (long), T (transient) and N (neuronal) have been characterized by electrophysiological methods. These types differ with respect to their single-channel conductance, gating behaviour, divalent ion selectivity, localization and regulation by toxins, enzymes and drugs (Nowycky et al. 1985; Miller 1987; Striessnig et al. 1988). It is now clear that DHP-receptors in the nervous system are associated with functional VSCC. Radiolabelled DHP's seem to be a good tool for biochemical investigations of VSCC — DHP sensitive L channels. One interesting property of L channels is their plasticity — the number of DHP binding sites in the brain change in several pathological conditions e.a. aging, cardiomyopathy, hypertension (Wagner et al. 1986). Thus, changes in L channel function may contribute to the changes in neuronal excitability associated with such states. Cerebral ischemia resulting in cell membrane damage can lead to alterations in energy metabolism (ATP) and membrane transport mechanisms sufficient to cause abnormal accumulation of intracellular calcium (Łazarewicz et al. 1978; Siesjö 1986). Moreover, protective effects of calcium channel blockers DHP-type drugs have been investigated by several authors (Steen et al. 1983; Fujisawa et al. 1986; Mossakowski, Gadamski 1987).

In the present study, a newly developed high affinity calcium channel ligand — ^{125}I -Iodipine (Ferry, Glossmann 1984) was employed to quantify the ligand binding sites in three brain regions during clinical death and following resuscitation.

MATERIAL AND METHODS

A 5 min clinical death was induced in adult female Wistar rats weighing 170–180 g under ether anesthesia, 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). Cardiopulmonary resuscitation was performed by external cardiac massage and artificial ventilation. Arrest of circulation and recovery after resuscitation in this experimental model was confirmed previously by means of pathophysiological methods including ECG, EEG and cerebral blood flow (Korpachev et al. 1982; Kapuściński 1987; Mossakowski et al. 1986). Animals were sacrificed in groups of five at the end of ischemia, and 15 min and 2 h after resuscitation. Five animals served as a control group. At indicated times the brains were removed in less than 30 sec and 3 brain regions were rapidly dissected on ice: CA₁ sector of hippocampus, frontal cortex and reticular formation of the medulla. Brain samples (ca. 10 mg) were immediately homogenized in 1.1 ml ice-cold 50 mM Tris-HCL buffer (pH 7.4) 10 strokes up-down with a glass-glass homogenizer; 0.1 ml homogenate was separated to check the protein content by the method of Lowry et al. (1951). The homogenates were rapidly frozen in liquid nitrogen and kept at -20°C until analysed. ^{125}I -Iodipine (Amersham, 2000 Ci/mmol, 1 mCi/ml) was used for saturation analysis and the binding assays. Saturation analysis was done for homogenates from control cortex at 6 free ligand concentrations ranging from 30 to 800 pmol/L in a final volume of 0.25 ml of 50 mM Tris-HCL buffer with about 5 μg of protein/assay for 2 h at 25°C prior to separation of bound and free ligand. Binding assays in homogenates from three brain regions were performed at 80 pM concentration of ^{125}I -Iodipine in the same way. Non-specific binding was measured in the presence of 1 μM unlabelled nimodipine (Bayer AG, Wuppertal, FRG) and was subtracted. Each determination was carried out in duplicate. Separation of bound and free radioligand was achieved by rapid dilution with ice-cold Tris buffer and filtration over Whatman GF/C filters, which was followed by 3 washings with the same buffer. Filters were counted for radioactivity in the Isocap 300 liquid scintillation system (Nuclear Chicago) with 56% efficiency. Eadie-Hofstee plots for saturation curves, and binding parameters were calculated according to Zivin and Waud (1982). Results were analysed by Student's test for correlated means.

RESULTS

The binding of ^{125}I -Iodipine in homogenates from cerebral cortex of the control group was saturable and of high affinity. Eadie-Hofstee plots for saturation curves, and binding parameters demonstrated a single class of high affinity binding sites with $K_D = 51 \pm 11$ pmol/L at 25°C , and $B_{\text{max}} = 418 \pm 43$ fmol per mg of protein ($n = 5$). Nonspecific binding measured in the presence of 1 $\mu\text{mol/L}$ nimodipine in the assay was in the range of 20–35% at the K_D concentration of ^{125}I -Iodipine.

Measurements of ^{125}I -Iodipine binding in control brains at one ligand concentration revealed uneven distribution of the binding sites in three brain regions. The density of binding sites was the highest in hippocampus followed by cerebral cortex and medulla (Tab. 1). At the end of 5 min clinical death significant decrease of binding sites was observed reaching 35%, 38% and 55% of control values for hippocampus, cortex and medulla respectively. Fifteen min after resuscitation the binding increased in all three regions. In hippocam-

Table 1. Specific binding of ^{125}I -Iodipine (fmol/mg protein) in homogenates from hippocampus, cerebral cortex and medulla of rat brain at the end of 5 min clinical death and after resuscitation

Tabela 1. Specyficzne wiązanie ^{125}J -jodipiny (fmol/mg białka) w homogenatach z hipokampa, kory i opuszki mózgu szczura w końcowym okresie śmierci klinicznej i po resuscytacji

Structure Struktura	Control Kontrola	End of clinical death Koniec śmierci klin.	Time after resuscitation Czas po resuscytacji	
			15 min	2 h (godz.)
Hippocampus Hipokamp	338.8 ± 23.9	117.6 ± 42.8**	236.2 ± 96.6	222.2 ± 124.7
Cortex Kora	271.4 ± 34.7	104.6 ± 62.4**	128.4 ± 44.2**	196.4 ± 58.3*
Medulla Opuszka	62.0 ± 18.9	34.2 ± 13.8**	44.4 ± 23.5	45.8 ± 15.5

Each value represents the mean ± S. D. of 5 animals

Każda wartość reprezentuje średnią ± S. D. z 5 zwierząt

* — $p < 0.05$

** — $p < 0.001$

pus and medulla it was not any more significantly different from control, however, in cerebral cortex it remained less than 50% of the control level. Two hours after resuscitation the binding in cerebral cortex increased but was still below the control level.

DISCUSSION

Results of saturation experiments from cerebral cortex are essentially in agreement with the data received by Ferry and Glossmann (1984) for guinea-pig brain membranes. The highest density of binding sites in hippocampus and the lowest in the medulla is also in keeping with the guinea-pig brain data reported by Glossmann et al. (1982). To our knowledge there are no data of ^{125}I -Iodipine binding to different regions of the rat brain.

Reduction of binding of different receptor ligands in the brain by ischemia has already been reported. A decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampus was observed in the recent study (Pylova et al. 1989), and a decrease of 5-HT₂ binding sites in frontal cortex of gerbil was determined in the carotid ligation model (Brown et al. 1988).

The mechanism underlying the ischemia-induced decrease in density of DHP binding sites remain to be investigated. With regard to the functional implications, if the decrease represents damage to VSCC, it may be responsible for a change in neuronal excitability accompanying ischemia. The fact that the drop in DHP binding sites was most pronounced in hippocampus may reflect and be causally related to the particular vulnerability of this structure to ischemia (Kirino 1982; Mossakowski, Gadamski 1987). The relatively rapid recovery of hippocampal binding may be consistent with metabolic hyperactivity of this region in the postischemic period (Meldrum et al. 1985; Mossakowski, Gadamski 1987). The relatively lowest drop in DHP binding and rapid recovery in medulla is in agreement with the early recovery of the spontaneous respiratory function observed in this model (Korpachev et al. 1982; Mossakowski et al. 1986; Majkowska-Wierzbicka 1989), but also with

the relative resistance of medulla to ischemia observed in clinical practice. The decrease of DHP binding in cerebral cortex at the end of clinical death was about the same as in hippocampus, however, the recovery was slowest and was not complete up to 2 h. This is in agreement with pathophysiological data received by Majkowska-Wierzbicka (1989) in the same experimental model, where recovery of EEG is relatively slow as compared to the recovery of spontaneous respiratory function, and does not become quite normal 2 h after resuscitation.

The results of this study indicate that ischemia produces instant conformational changes of voltage-sensitive calcium L channels in different brain regions.

ISCHEMIA MÓZGU ZMNIEJSZA GĘSTOŚĆ MIEJSC WIĄŻĄCYCH ¹²⁵J-JODIPINĘ W MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Oceniono wiązanie wysokiego powinowactwa liganda kanału wapniowego ¹²⁵J-jodipiny (pochodna 1,4-dwuhydropirydyny) w homogenatach z hipokampa, kory i opuszki mózgu szczura w końcowym okresie 5-minutowej śmierci klinicznej i 15 minut oraz 2 godziny po resuscytacji. W warunkach prawidłowych najwięcej miejsc wiążących stwierdzono w hipokampie, a najmniej w opuszce. W końcowym okresie śmierci klinicznej obserwowano zmniejszenie wiązania liganda w zakresach 35–55% wartości kontrolnych w następującej sekwencji: hipokamp > kora > opuszka. Po resuscytacji wiązanie liganda w hipokampie i opuszce wzrosło nie różniąc się od wartości kontrolnych, natomiast w korze po 2 godzinach było nadal znamienne niższe. Uzyskane wyniki wskazują, że niedokrwienie powoduje zmiany konformacji kanałów Ca²⁺ zależnych od potencjału typu L w różnych strukturach mózgu.

REFERENCES

1. Brown C. M., Kilpatrick A. T., Martin A., Spedding M.: Cerebral ischemia reduces the density of 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of the gerbil. *Neuropharmacology*, 1988, 27, 831–836.
2. Ferry D. R., Glossmann H.: ¹²⁵I-Iodipine, a new high affinity ligand for the putative calcium channel. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 1984, 325, 186–189.
3. Fujisawa A., Matsumoto M., Matsuyama T., Heda H., Wanaka A., Yoneda S., Kimura K., Komada T.: The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 748–752.
4. Glossmann H., Ferry D. R., Lübbecke F., Mewes R., Hoffmann F.: Calcium channels: direct identification with radioligand binding studies. *Trends Pharmacol*, 1982, 3, 431–437.
5. Janis R. A., Triggle D. J.: New developments in Ca²⁺ channel antagonists. *J Med Chem*, 1983, 26, 775–785.
6. Kapuściński A.: Mózgowy przepływ krwi w doświadczalnym modelu śmierci klinicznej u szczurów. *Neuropatol Pol*. 1987, 25, 287–298.
7. Kirino T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 1982, 239, 57–69.
8. Korpachev V. G., Lysenkov S. P., Tiel L. Z.: Modelirovanie klinicheskoy smerti i postreanimacionnoj boleznii u krysa. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 1982, 3, 78–80.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randal R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193, 265–275.
10. Łazarewicz J. W., Majewska M. D., Wróblewski J. T.: Possible participation of calcium in the pathomechanism of ischemic brain damage. In: *Pathophysiological, biochemical and morphological aspects of cerebral ischemia and arterial hypertension*. Eds.: M. J. Mossakowski, I. B. Zelman, H. Kroh, Polish Med Publ, Warsaw, 1978, pp. 79–86.

11. Majkowska-Wierzbicka J.: Pathophysiological characteristics of clinical death in rats. *Neuropatol Pol*, 1989 (in press).
12. Meldrum B., Evans M., Griffiths T., Simon R.: Ischemic brain damage: the role of excitatory activity and calcium entry. *Br J Anaesth*, 1985, 57, 44–46.
13. Miller R. J.: Multiple calcium channels and neuronal function. *Science*, 1987, 235, 46–52.
14. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ blokowania błonowych kanałów wejścia wapnia na rozwój niedokrwiennej uszkodzeń neuronów sektora CA₁ rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 439–450.
15. Mossakowski M. J., Hilgier W., Januszewski S.: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 471–489.
16. Nowycky M. C., Fox A. P., Tsejn R. W.: Three types of calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature (London)*, 1985, 316, 440–443.
17. Pylova S. I., Majkowska J., Hilgier W., Kapuściński A., Albrecht J.: Rapid decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampal CA₁ region following short-term global cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 1989 (in press).
18. Siesjö B. K.: Calcium and ischemic brain damage. *Eur Neurol*, 1986, 25, suppl 1, 45–50.
19. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. P.: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1983, 3, 38–48.
20. Striessing J., Meusburger E., Grabner M., Knaus H.-G., Glossmann H., Kaizer J., Schölkens B., Becker R., Linz W., Henning R.: Evidence for a distinct Ca²⁺ antagonist receptor for the novel benzothiazinone compound HOE 166. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 1988, 337, 331–340.
21. Wagner J. A., Reynolds I. J., Weisman H. F., Dudeck P., Weisfeld M. L., Snyder S. H.: Calcium antagonist receptors in cardiomyopathic hamster: selective increases in heart, muscle, brain. *Science*, 1986, 232, 515–518.
22. Zivin J. A., Waud D. R.: How to analyze binding, enzyme and uptake data: the simplest case, a single phase. *Life Sci*, 1982, 30, 1407–1422.

Acknowledgements. The author thanks Prof. Jerzy Łazarewicz for helpful advice and Dr. Jan Albrecht for critical reading of the manuscript.

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

EWA MATYJA, ELŻBIETA KIDA

PROTECTIVE EFFECT
OF THE CALCIUM ENTRY BLOCKER NIMODIPINE
ON HIPPOCAMPAL RAT CULTURES SUBMITTED TO ANOXIA

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

It is generally accepted that disturbances in cellular calcium homeostasis play an important role in cell death (Schanne et al. 1979; Borgers 1981; Farber, 1981; Siesjö 1981; Yanagihara, McCall 1982; Raichle 1983; Simon et al. 1984; Peters 1986; Siesjö 1986; Deshpande et al. 1987). So far calcium entry blockers have been widely employed as a protective agent in both myocardial infarction and ischemic brain stroke (Kazda et al. 1979; Harris et al. 1982; Kazda, Towart 1982; Alps et al. 1983; 1988; Steen et al. 1983; Fleckenstein et al. 1985; Barnett et al. 1986, Fujisawa et al. 1986). Although their beneficial effect has been mainly attributed to their powerful vasodilatory action (Kazda, Towart 1982; Mohamed et al. 1985) the possibility of a cytoprotective effect also exists (Van Rempts, Borgers 1982). Thus, the problem at which level vascular or/and cellular, the brain can be protected has not yet been clarified.

The present study was undertaken to examine the effect of nimodipine on the development of postanoxic cell damage in a tissue culture model of anoxia. The CNS culture model allows to eliminate the vascular factor, so important in ischemic stress *in vivo*. The neurocytoprotective effect of nimodipine was studied in the hippocampal formation, a structure of particularly high vulnerability to anoxia/ischemia.

MATERIAL AND METHODS

The organotypic cultures of the hippocampal formation were prepared from 2-3-day-old Wistar rats. The hippocampus was dissected out under sterile conditions from both cerebral hemispheres and cut coronally into thin slices, put on collagen-coated glass coverslips and placed in a Carrel flask. The cultures were grown in a medium consisting of 25% human serum and 75% Eagle Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with glucose to a final concentration of 600 mg% without any antibiotics. The cultures were maintained at 36.5°C and the medium was renewed twice weekly. On the 14th day *in vitro* some selected cultures were transferred for 10 and 20 minutes to a pure nitrogen atmosphere in a Carrel flask adapted for permanent gas flow. Control

cultures were grown in standard conditions. The sister cultures were pretreated with nimodipine in a dose of 10 and 100 μM added to the medium prior to exposure to nitrogen. Two and 24 hours and 3 and 7 days after anoxia both experimental cultures and the control ones were prepared for the electron microscope. The cultures were rinsed in cacodylate buffer pH 7.2, fixed in 1.5% glutaraldehyde for 1/2 h, postfixed in 2% osmium tetroxide, dehydrated in graded alcohols and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were counter-stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined in a JEM 1500 XB electron microscope.

RESULTS

The earliest neuronal abnormalities occurring 2 and 24 hours after 10- and 20-minute anoxia consisted of severe swelling of the mitochondria which contained only remnants of disrupted cristae, whereas the profiles of granular endoplasmic reticulum were not markedly dilated (Fig. 1). On the following days many large pyramidal neurons exhibited vacuolar degeneration (Fig. 2).

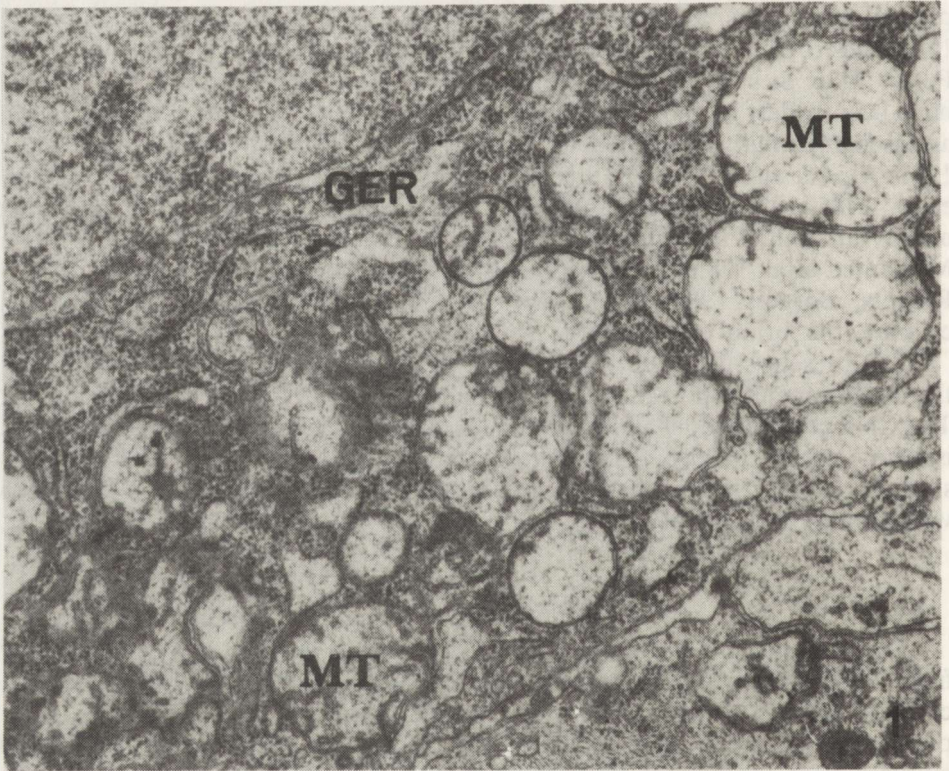


Fig. 1. Hippocampal culture, 14 days *in vitro* (DIV), 2 h after 10-min anoxia. Fragment of pyramidal neuron with swollen mitochondria (MT) and slightly dilated profiles of granular endoplasmic reticulum (GER). $\times 25\,000$

Ryc. 1. Hodowla hipokampa, 14 dni *in vitro* (DIV); 2 godziny po 10-minutowej anoksji. Fragment neuronu piramidowego z obrzmiałymi mitochondriami (MT) i lekko poszerzonymi kanałami ziarnistej siateczki śródplazmatycznej (GER). Pow. 25.000 \times

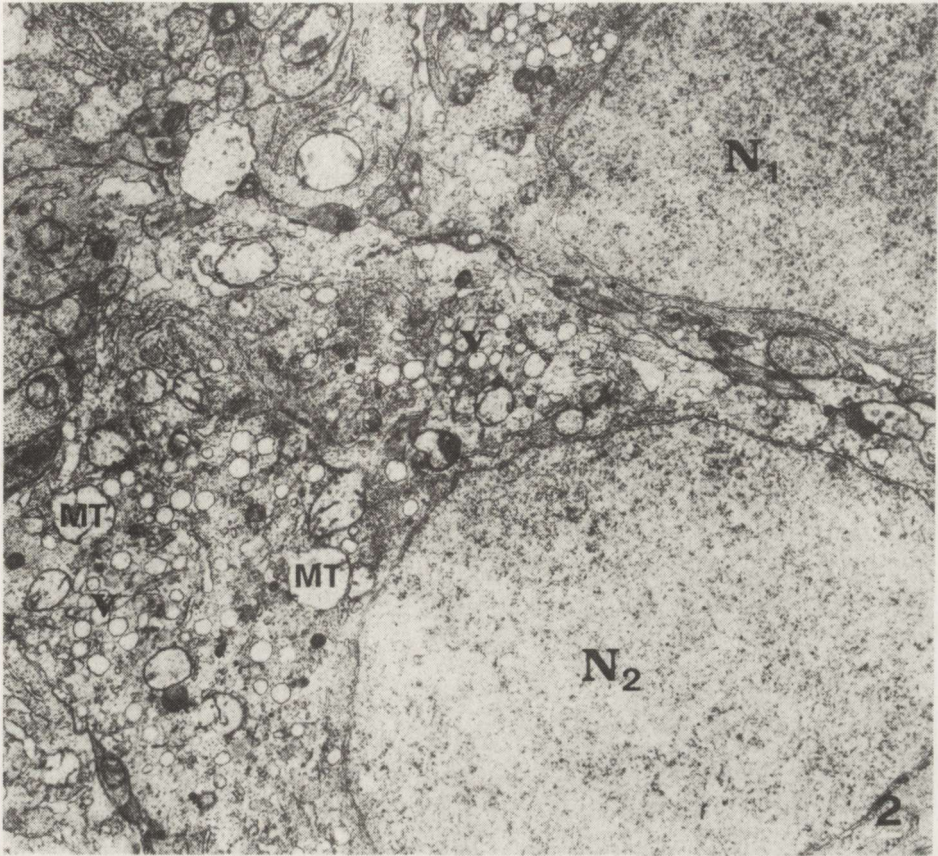


Fig. 2. Hippocampal culture, 14 DIV, 3 days after 10-min. anoxia. Two neurons (N_1 , N_2) exhibiting numerous small vacuoles (v) and swollen mitochondria (MT). $\times 10\,000$

Ryc. 2. Hodowla hipokampa, 14 DIV, 3 dni po 10-min. anoksji. Dwa neurony (N_1 , N_2) zawierające liczne małe wakuole (v) i obrzmiałe mitochondria (MT). Pow. 10.000 \times

In contrast to the pronounced pyramidal damage, the granular cells remained well preserved. In all groups of experimental cultures the presynaptic terminals were preferentially affected. Numerous axonal boutons were markedly swollen and depleted of synaptic vesicles, meanwhile the dendritic spines and other postsynaptic dendrites seldom showed ultrastructural abnormalities. There were also numerous swollen glial processes (Fig. 3). The earliest neuronal changes were accompanied by swelling of protoplasmic astrocytes (Fig. 4). In the later stages of postanoxic damage the most affected pyramidal neurons displayed condensed cytoplasm containing degenerated organelles. After 20-minutes anoxia the morphological changes were much more pronounced, some neurons exhibited total destruction of the cytoorganelles and nucleus. The neuropil showed extreme swelling of both glial and neuronal processes. Seven days after anoxia there was an increase in the number of fibrillary glia containing abundant gliofilaments and dense bodies.

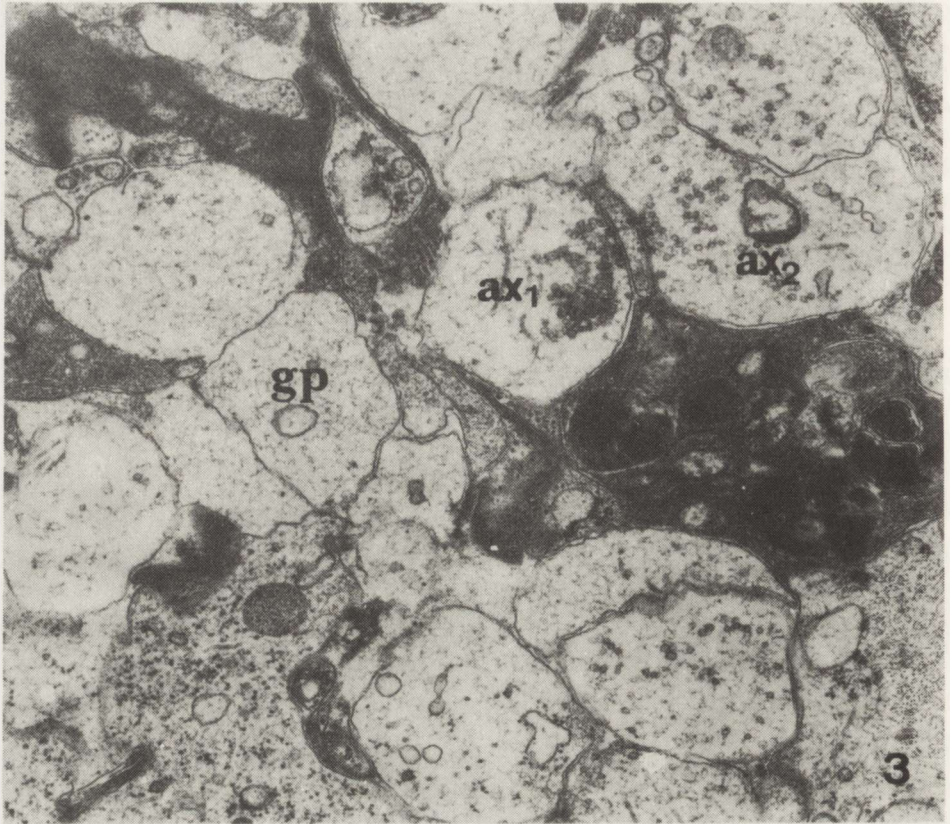


Fig. 3. The same culture. Neuropil composed of electron-lucent axonal boutons (ax_1 , ax_2) and numerous swollen glial processes (gp). $\times 20000$

Ryc. 3. Ta sama hodowla. Neuropil złożony z elektronowo-przeziernych kolbek aksonalnych (ax_1 , ax_2) i licznych obrzmiałych wypustek glejowych (gp). Pow. 20.000 \times

The effect of nimodipine on postanoxic changes depended on the dose of the drug and the survival time post anoxia. A small dose of nimodipine did not prevent progressive neuronal degeneration. After a short time (2 and 24 h) of survival following anoxia, severe mitochondrial swelling was the prominent feature of neuronal damage (Fig. 5). The protoplasmic astrocytes were markedly swollen and exhibited electron-lucent cytoplasm containing a few swollen mitochondria and slightly dilated profiles of granular endoplasmic reticulum (Fig. 6). However, in the later stages post anoxia the individual neurons seemed to be less affected. Some neurons exhibited numerous small vacuoles but the mitochondria were not so severely swollen (Fig. 7). The neuropil, however, was composed of numerous markedly swollen glial and neuronal processes (Fig. 8).

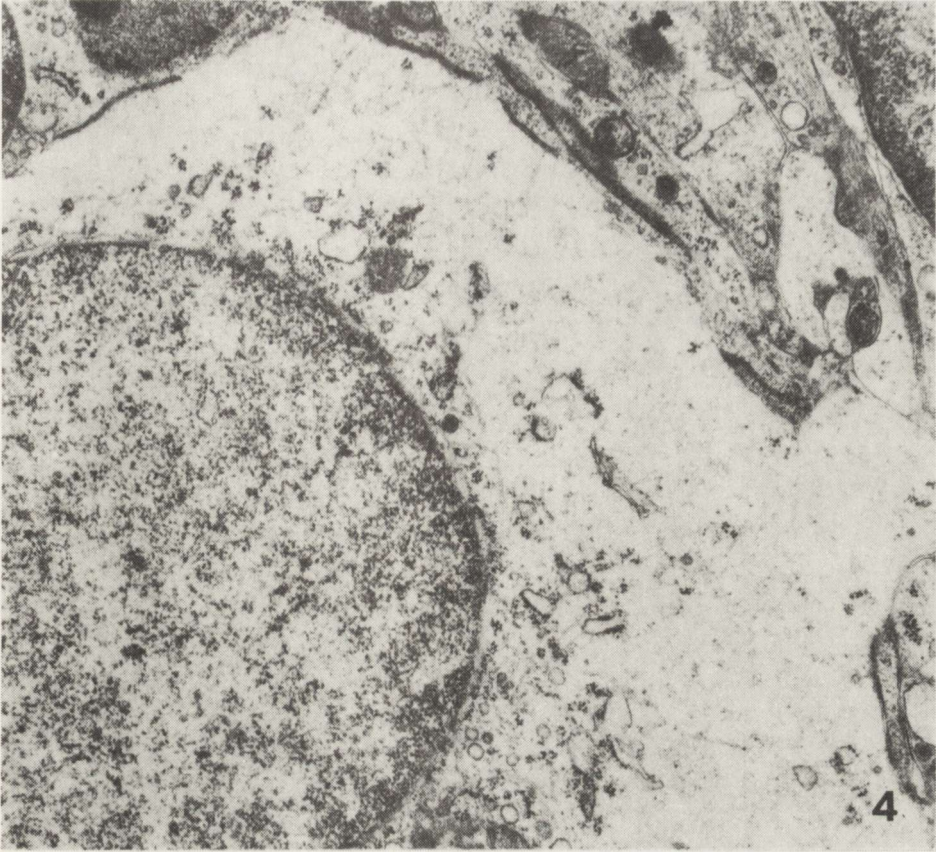


Fig. 4. Hippocampal culture, 14 DIV, 24 h after 10-min anoxia. Fragment of protoplasmic astrocyte. Severely swollen astrocytic cytoplasm containing slightly dilated profiles of granular endoplasmic reticulum. $\times 15000$

Ryc. 4. Hodowla hipokampa, 14 DIV, 24 godz. po 10-min. anoksji. Fragment astrocytu protoplazmatycznego. Cytoplazma astrocytu znacznie obrzmiała, zawierająca nieco poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej. Pow. 15.000 \times

A higher dose of nimodipine exerted only a slight protective effect against the early postanoxic changes of the neuronal cytoplasm including swelling of the mitochondria (Fig. 9). Nevertheless, this dose of the drug proved sufficient to prevent the development of late postanoxic cell damage. On the 3rd and the following days after 10- and 20-minute anoxia the majority of pyramidal neurons showed good ultrastructural preservation of the organelles (Fig. 10). Densely packed neuropil did not reveal any morphological abnormalities and resembled that seen in the control material, with numerous synaptic contacts of various type (Fig. 11).

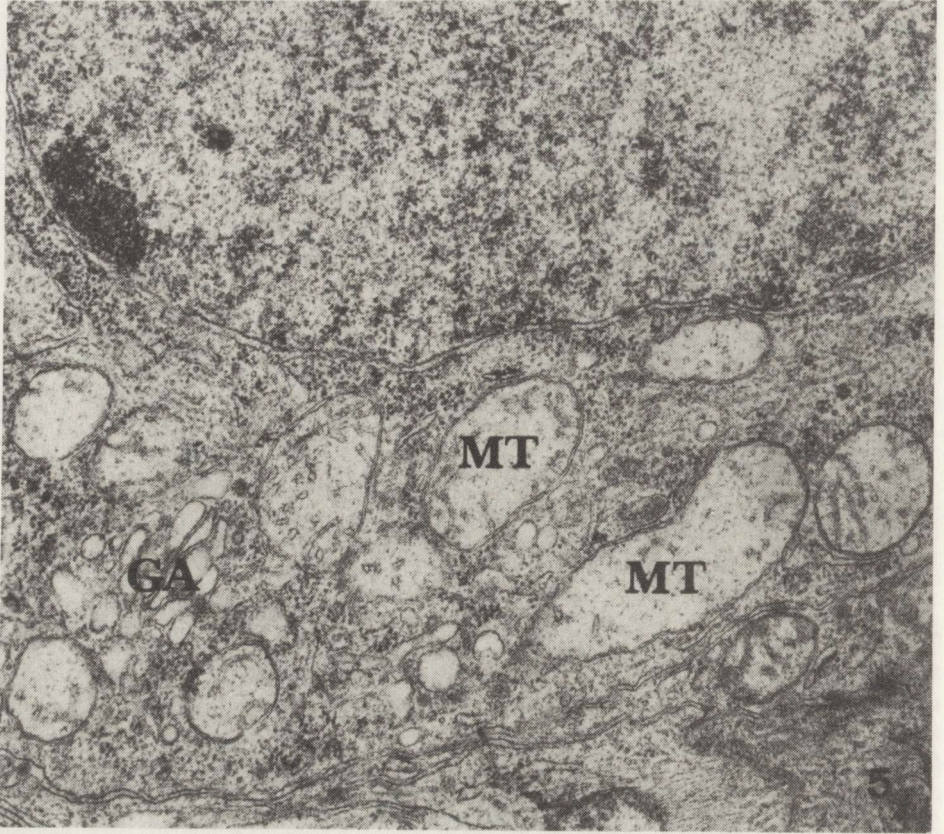


Fig. 5. Hippocampal culture, 14 DIV, 24 h after 10-min anoxia. Nimodipine (10 μ M) administered prior to anoxia. Fragment of neuron with severely swollen mitochondria (MT) and dilated cisternae of Golgi apparatus (GA). $\times 20\,000$

Ryc. 5. Hodowla hipokampa, 14 DIV, 24 godz. po 10-min. anoksji. Nimodipina w dawce 10 μ M podana przed anoksją. Fragment neuronu ze znacznie obrzmiałymi mitochondriami (MT) i poszerzonymi zbiornikami aparatu Golgiego (GA). Pow. 20.000 \times

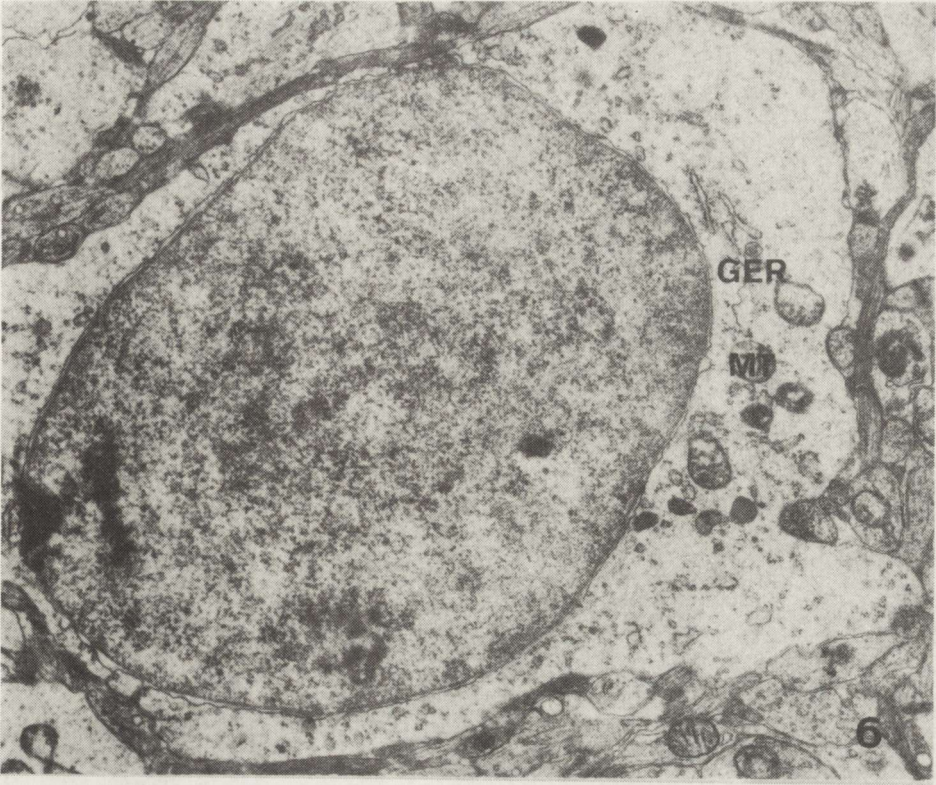


Fig. 6. The same culture. Electron-lucent cytoplasm of a protoplasmic astrocyte containing a few swollen mitochondria (MT) and slightly dilated profiles of granular endoplasmic reticulum (GER).
× 15 000

Ryc. 6. Ta sama hodowla. Astrocyt protoplazmatyczny z obrzmiałą elektronowo-przezierną cytoplazmą zawierającą pojedyncze mitochondria (MT) i nieznacznie poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej (GER). Pow. 15 000 ×

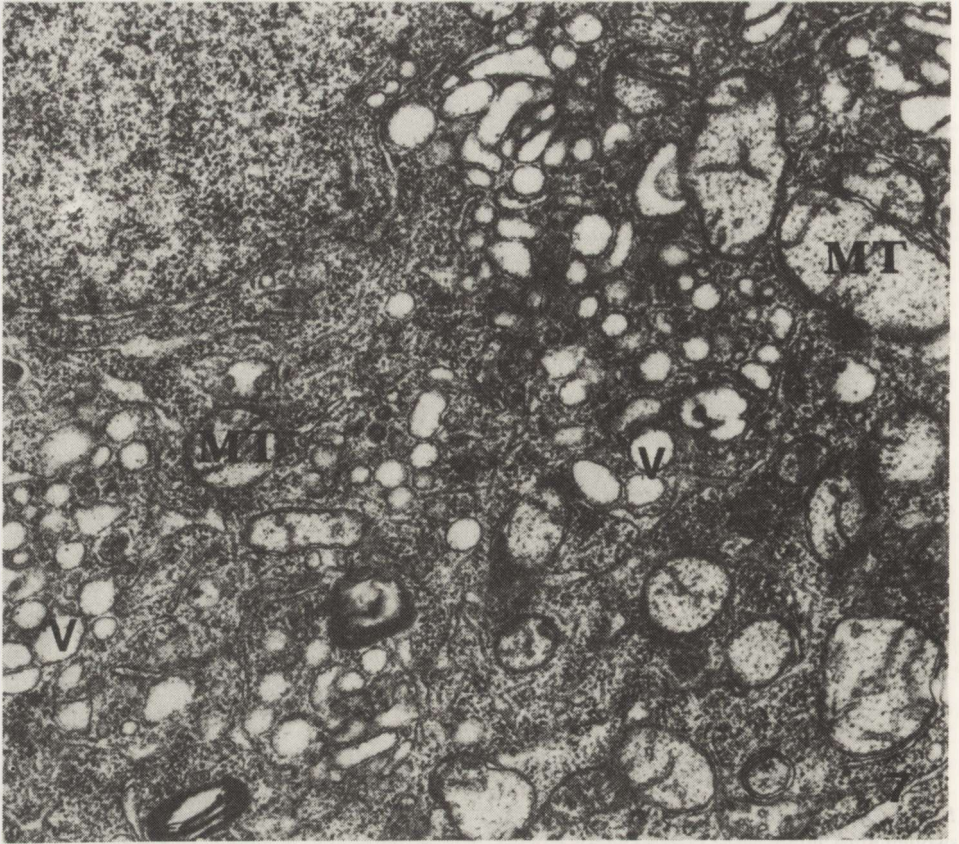


Fig. 7. Hippocampal culture, 14 DIV, 3 days after 10-min. anoxia. Nimodipine ($10\ \mu\text{M}$) administered prior to anoxia. Fragment of pyramidal neuron. Numerous small vacuoles (v) and swollen mitochondria (MT). $\times 20\ 000$

Ryc. 7. Hodowla hipokampa, 14 DIV, 3 dni po 10-min anoksji, $10\ \mu\text{M}$ nimodipiny podano przed anoksją. Fragment neuronu piramidowego. Liczne drobne wakuole (v) i obrzmiałe mitochondria (MT). Pow. $20\ 000\times$

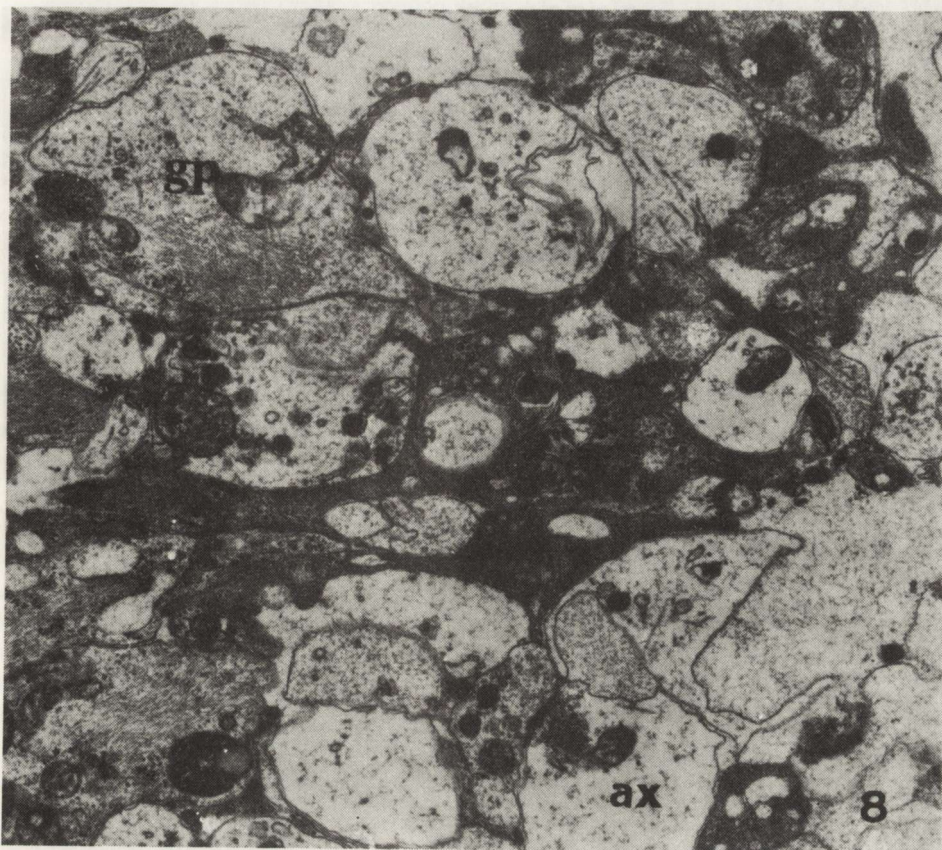


Fig. 8. The same culture. Neuropil composed of severely swollen neuronal and glial processes (gp). Swollen axonal boutons (ax). $\times 20\,000$

Ryc. 8. Ta sama hodowla. Neuropil zawierający znacznie obrzmiałe wypustki neuronalne i glejowe (gp). Widoczne obrzmienie kolbek aksonalnych (ax). Pow. $20\,000\times$

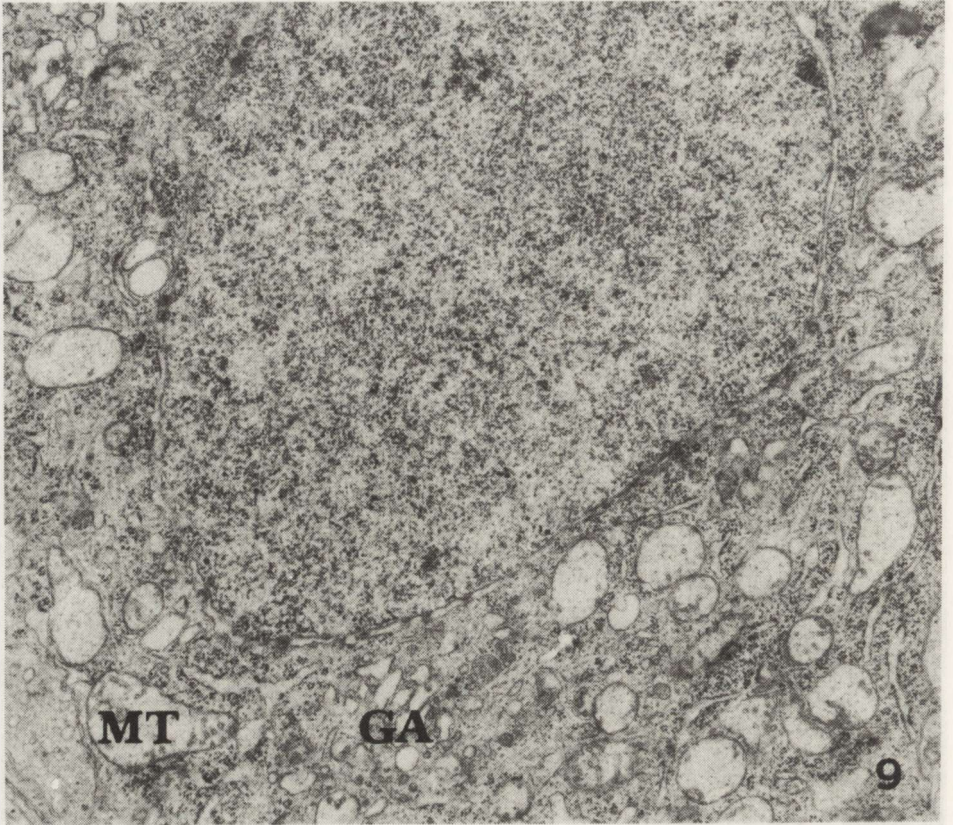


Fig. 9. Hippocampal culture, 14 DIV, 2 h after 20-min anoxia. Nimodipine (100 μ M) administered prior to anoxia. Pyramidal neuron exhibiting swollen mitochondria (MT), slightly dilated profiles of granular endoplasmic reticulum and Golgi cisternae (GA). $\times 15\,000$

Ryc. 9. Hodowla hipokampa, 14 DIV, 2 godz. po 20-min. anoksji. Nimodipina w dawce 100 μ M podana przed anoksją. Neuron piramidowy zawierający obrzmiałe mitochondria (MT), nieco poszerzone kanały siateczki śródplazmatycznej ziarnistej oraz cysterny aparatu Golgiego (GA).

Pow. 15.000 \times

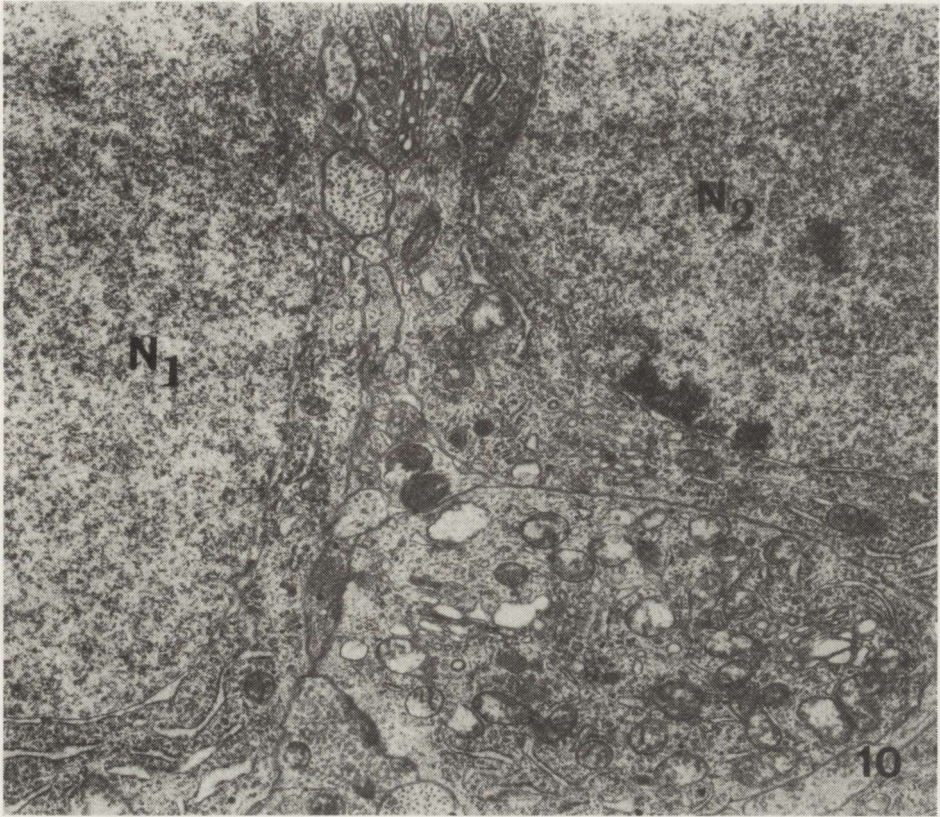


Fig. 10. Hippocampal culture, 14 DIV, 3 days after 20-min anoxia. Nimodipine ($100\ \mu\text{M}$) administered prior to anoxia. Two pyramidal neurons (N_1 , N_2) exhibit well preserved cytoplasmic organelles. $\times 15\ 000$

Ryc. 10. Hodowla hipokampa, 14 DIV, 3 dni po 20-min anoksji. Nimodipina ($100\ \mu\text{M}$) podana przed anoksją. Dwa neurony piramidowe (N_1 , N_2) z prawidłowo zachowanymi organelami komórkowymi. Pow. $15.000\times$

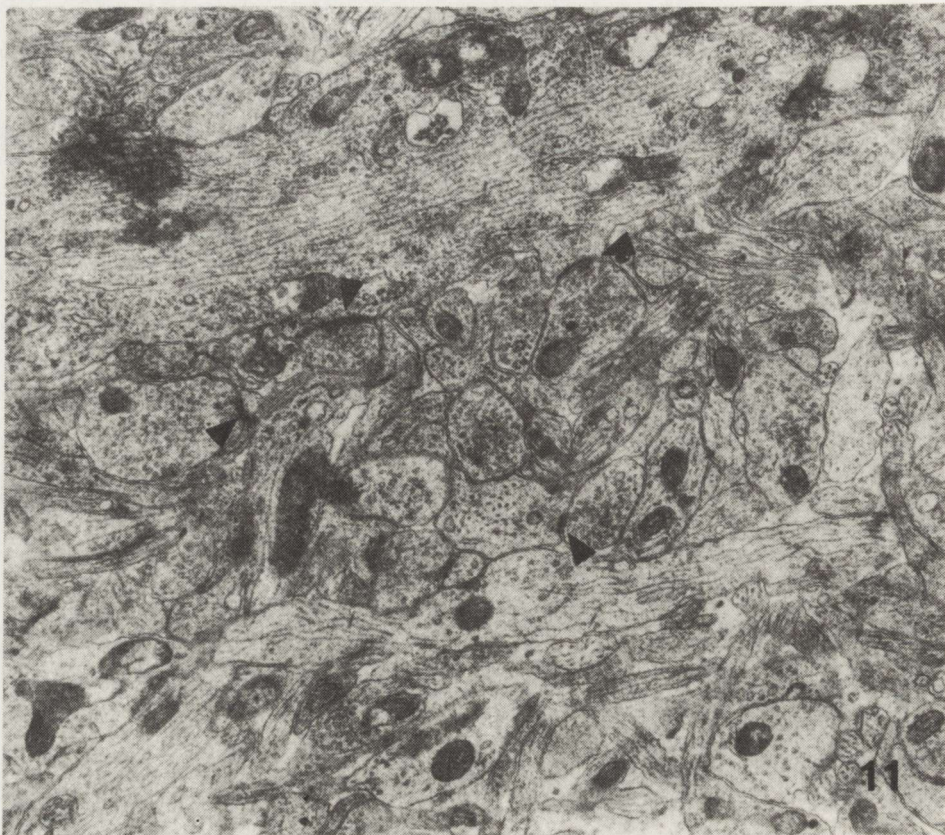


Fig. 11. The same culture. Densely packed neuropil composed of neuronal and glial processes. Numerous synaptic contacts (arrows). $\times 16\,500$

Ryc. 11. The sama hodowla. Zbity neuropil zawierający wypustki neuronalne i glejowe. Liczne połączenia synaptyczne (strzałki). Pow. $16\,500\times$

DISCUSSION

The results of the present study indicate that nimodipine administered to the culture medium can protect tissue from anoxic cell damage, however, its effectiveness depends not only on the dose, but also on the time of survival post anoxia. The high dose of nimodipine sufficiently prevented only the development of late postanoxic changes, whereas the early mitochondrial swelling proceeded even in the presence of the drug. So far many experimental studies have employed several calcium antagonists with varying results probably depending on the differences in the anoxic/ischemic model, animal species, dose and route of drug administration. Thus, some experiments revealed no beneficial effect of nimodipine, when the agent was given post- and not prior to ischemia (Vibulsresth et al. 1987). Since the postischemic tissue damage is a complex phenomenon and results from a variety of pathogenic factors, the protective effect of calcium entry blockers could be interpreted in different ways. In the majority of experimental models *in vivo*, the beneficial effect of

nimodipine seemed to be related to the postischemic hypoperfusion of the brain (Kazda et al. 1979; Harris et al. 1982; Kazda, Towart 1982; Steen et al. 1983; 1984; Mabe et al. 1986). In the tissue culture model, however, the vascular factor is excluded and only direct action of the drug on the cells may be considered. It is well known that a low concentration of calcium is maintained by a pump mechanism and inactivation of the ionic pump results in an increase of intracellular calcium and cell death. Calcium entry blockers might retard the cascade that leads to neuronal death by blocking different types of calcium channels (Meldrum et al. 1985).

The existence in the brain of highly specific dihydropyridine-binding sites located on neurons and concentrated in the synaptosomal fraction (Bellemann et al. 1982; 1983; Ferry, Glossmann 1982; Peroutka, Allen 1983; Quirion 1983; Miller, Freedman 1984; Turner, Goldin 1985) suggests that the calcium antagonist may act directly at the cellular level in addition to its well-known action on cerebral vessels. Some reports demonstrated, however, that this direct effect is more pronounced when flunarizine is used (Van Rempts, Borgers 1982; Van Rempts et al. 1983) instead of "slow-channel" type blockers such as nimodipine. Nevertheless, the cellular protection could be related with a decreased metabolic rate or membrane stabilization and preservation of calcium homeostasis. The results of the present ultrastructural study indicate that nimodipine administered in a sufficiently high dose, prior to the anoxic insult can exert a direct neurocytoprotective action and prevent the development of late neuronal injury independently of any vascular factors.

EFEKT OCHRONNY BLOKERA KANAŁÓW WAPNIOWYCH – NIMODIPINY NA HODOWLE HIPOKAMPA SZCZURA PODDANE ANOKSJI

Streszczenie

Oceniono wpływ nimodipiny na rozwój zmian poanoksyjnych struktury hipokampa *in vitro*. Zastosowanie modelu hodowli tkankowej pozwoliło na badanie bezpośredniego wpływu ochronnego nimodipiny na komórki nerwowe i glejowe, niezależnie od czynnika naczyniowego. Badania prowadzono na dojrzałych 14-dniowych hodowlach organotypowych hipokampa szczura poddanych działaniu 10- i 20-minutowej anoksji. Bezpośrednio przed anoksją podawano nimodipinę w dawce 10 i 100 μM . Hodowle oceniano w mikroskopie elektronowym po 2, 24 godz. oraz 3 i 7 dniach po anoksji. Stwierdzono, że nimodipina w mniejszej dawce nie wpływała na zmniejszenie poanoksyjnych uszkodzeń komórek nerwowych i glejowych. Nimodipina w dawce 100 μM wywierała efekt ochronny na rozwój późnych zmian poanoksyjnych, natomiast była nieskuteczna w zapobieganiu powstawania wczesnych odwracalnych zmian w postaci obrzęcia mitochondriów. Badania wykazały, że nimodipina w dostatecznie dużej dawce może wywierać bezpośredni efekt ochronny na komórki nerwowe niezależnie od czynnika naczyniowego, odgrywającego niewątpliwie dużą rolę w doświadczeniach *in vivo*.

REFERENCES

1. Alps B. J., Calder C., Hass W. K., Wilson A. D.: Comparative protective effects of nicardipine, flunarizine, lidoflazine and nimodipine against ischemic injury in the hippocampus of the Mongolian gerbil. *Br J Pharmacol*, 1988, 93, 877–883.
2. Alps B. J., Calder C., Wilson A. D., Scott-Park F. M.: The beneficial effect of nicardipine on the healing of myocardial infarcts in dogs. *Arzneimittelforschung*, 1983, 33, 1638–1646.

3. Barnett G. H., Bose B., Little J. R., Jones S. C., Friel H. T.: Effects of nimodipine on acute focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 884–890.
4. Bellemann P., Ferry D., Lübbecke F., Glossmann H.: (H^3)-nimodipine and (H^3)-nitrendipine as tools to identify directly the sites of action of 1,4-dihydropyridine calcium antagonists in guinea pig tissues. *Arzneimittelforschung*, 1982, 32, 361–363.
5. Bellemann P., Schade A., Towart R.: Dihydropyridine receptor in rat brain labelled with (H^3)-nimodipine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80, 2356–2360.
6. Borgers M.: The role of calcium in the toxicity of the myocardium. *J. Histochem*, 1981, 13, 839–848.
7. Deshpande J. K., Siesjö B. K., Wieloch T.: Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1987, 7, 89–95.
8. Farber J. L.: The role of calcium in cell death. *Life Sci*, 1981, 29, 1289–1295.
9. Ferry D. R., Glossmann H.: Evidence for multiple receptor sites within the putative Ca-channels. *Arch Pharmacol*, 1982, 321, 80–83.
10. Fleckenstein A., Frey M., Fleckenstein-Grün G.: Myocardial and vascular damage by intracellular calcium overload. Preventive action of calcium antagonists. In: Calcium entry blockers and tissue protection. Eds.: T. Godfraind, P. M. Vanhoutte, S. Govani, R. Paoletti. Raven Press, New York, 1985, 91–106.
11. Fujisawa A., Matsumoto M., Matsuyama T., Heda H., Wanaka A., Yoneda S., Kimura K., Komada T.: The effect of the calcium antagonist nimodipine on the gerbil model of experimental cerebral ischemia. *Stroke*, 1986, 17, 748–752.
12. Harris R. J., Branston N. M., Symon L., Bayhan M., Watson A.: The effects of a calcium antagonist, nimodipine, upon physiological responses of the cerebral vasculature and its possible influence upon focal cerebral ischemia. *Stroke*, 1982, 13, 759–766.
13. Kazda S., Hoffmeister F., Garther B., Towart R.: Prevention of the post-ischemic impaired reperfusion of the brain by nimodipine. *Acta Neurol Scand*, 1979, [Suppl 60], 72, 302–303.
14. Kazda S., Towart R.: Nimodipine: a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebrovascular action. *Acta Neurochir (Wien)*, 1982, 63, 259–265.
15. Mabe H., Nagai H., Takagi T., Umamura S., Ohno M.: Effect of nimodipine on cerebral functional and metabolic recovery following ischemia in the rat brain. *Stroke*, 1986, 17, 501–505.
16. Meldrum B. S., Simon R. P., Swan J. H., Evans M. C., Griffiths T.: Calcium loading of mitochondria in ischemia and *status epilepticus*: its reversibility and significance for pathologic outcome. In: Calcium entry blockers and tissue protection. Eds.: T. Godfraind, P. M. Vanhoutte, S. Govani, R. Paoletti. Raven Press, New York, 1985, 183–194.
17. Miller R. J., Freedman S. B.: Are dihydropyridine binding sites voltage sensitive calcium channels? *Life Sci*, 1984, 34, 1205–1221.
18. Mohamed A. A., Mendelow A. D., McCulloch J.: Effect of the calcium antagonist nimodipine on local cerebral flow and metabolic coupling. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1985, 5, 26–33.
19. Peroutka S. J., Allen S. G.: Calcium channel antagonist binding sites labeled by 3H -nimodipine in human brain. *J Neurosurg*, 1983, 59, 933–937.
20. Peters T.: Calcium in physiological and pathological cell function. *Eur Neurol*, 1986, 25, 27–44.
21. Quirion R.: Autoradiographic localization of a calcium channel antagonist, 3H -nitrendipine, binding sites in rat brain. *Neurosci Lett*, 1983, 36, 267–271.
22. Raichle M. E.: The pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol*, 1983, 13, 2–10.
23. Schanne F. A. X., Kane A. B., Young E. E., Farber J. L.: Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*, 1979, 206, 700–702.
24. Siesjö B. K.: Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1981, 1, 155–185.
25. Siesjö B. K.: Calcium and ischemic brain damage. *Eur Neurol*, 1986, 25, 45–56.
26. Simon R. P., Griffiths T., Evans M. C., Swan J. H., Meldrum B. S.: Calcium overload in selectively vulnerable neurons of the hippocampus during and after ischemia: electronmicroscopic study in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1984, 4, 350–361.
27. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. D.: Nimodipine improves cerebral blood flow and neurologic recovery after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1983, 3, 38–43.
28. Steen P. A., Newberg L. A., Milde J. H., Michenfelder J. D.: Cerebral blood flow and

- neurologic outcome when nimodipine is given after complete cerebral ischemia in the dog. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1984, 4, 82–87.
29. Turner T. J., Goldin S. M.: Calcium channels in rat brain synaptosomes: identification and pharmacological characterization. *J Neurosci*, 1985, 5, 841–849.
 30. Van Rempts J., Borgers M.; Morphological assessment of pharmacological brain protection. In: Protection of tissue against hypoxia. Eds.: A. Wanguier, M. Borgers, W. K. Amery. Elsevier, Amsterdam, 1982, 263–274.
 31. Van Rempts J., Borgers M., Van Dael L., Van Syndhoven J., Van de Ven M.: Protection with flunarizine against hypoxic-ischaemic damage of the rat cerebral cortex. A quantitative morphologic assessment. *Arch Int Pharmacodyn*, 1983, 262, 76–88.
 32. Vibulsresth S., Dietrich W. D., Busto R., Ginsberg M. D.: Failure of nimodipine to prevent ischemic neuronal damage in rats. *Stroke*, 1987, 18, 210–216.
 33. Yanagihara T., McCall J. T.: Ionic shift in cerebral ischemia. *Life Sci*, 1982, 30, 1921–1925.

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

JANINA RAFAŁOWSKA, STANISŁAW KRAJEWSKI*, EWA DOLIŃSKA

THE BLOOD-BRAIN BARRIER (BBB) PERMEABILITY IN MULTIPLE SCLEROSIS**

Department of Neurology, School of Medicine, Warszawa

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

In experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and in chronic relapsing allergic encephalomyelitis (CR EAE) closely resembling multiple sclerosis (MS) (Lassmann, Wiśniewski 1979), changes in the blood-brain barrier (BBB) permeability occur almost simultaneously with perivascular inflammatory infiltrations (Kristensson et al. 1976; Ackerman et al. 1981). They appear both during the acute stage of disease and during the first relapse (Grundke-Iqbal et al. 1980). This indicates that they appear typically in the course of a very active demyelinating process.

A comparison of the morphological picture of MS in cases of patients deceased in young and middle age with the morphological changes in those dying in senile age, showed a more marked mononuclear phagocytes reaction and more intensive perivascular lymphocytic reaction in young MS cases (Rafałowska et al. 1988). The question arises, whether the intensity of inflammatory changes influences the blood-brain barrier permeability and whether the increased blood vessel permeability occurs only within active demyelinating lesions.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on autopsy material originating from 4 cases of multiple sclerosis, two of which were clinically diagnosed and two others in which diagnosis was based on the postmortem examination. Below are presented some basic data characterizing this material.

Case 1. Female patient, 33-year-old. Onset of the disease at the age of 16. Course of disease: at the beginning with remissions and relapses, after 24 years of age progressive. Clinical symptomatology: numerous, polysystemic symptoms characteristic of MS. Bedridden at the age 27. Duration of disease: 17 years. Clinical diagnosis: Multiple sclerosis. Cause of death according to postmortem examination: Embolism of pulmonary artery.

** Work supported by the Institute of Psychiatry and Neurology, agreement No R. 34.1.

Case 2. Male patient, 41-year-old. Onset of the disease at the age of 29. Course of the disease: at first with remissions and relapses, after 39 years of age progressive. Clinical symptomatology: numerous, polysystemic symptoms typical of MS. Bedridden at the age of 39. Duration of the disease: 12 years. Clinical diagnosis: Multiple sclerosis. Cause of death according to postmortem examination: pneumonia.

In both the above presented cases during final hospitalization the cerebrospinal fluid was not examined.

Case 3. Male patient, 76-year-old, with no data concerning the beginning of the disease and its course. As far as MS symptomatology is concerned, the only information available was that concerning retrobulbar neuritis at the age 56 (?). Cerebrospinal fluid during last hospitalization was normal. Cause of death according to postmortem examination: pneumonia.

Case 4. Female patient, 81-year-old with no data concerning the beginning of the disease. As far as the course of the disease is concerned, there were data on gait disturbances lasting for several years. For one month prior to hospitalization patient was incoherent and bedridden. No pathological changes of CSF were found. Cause of death according to postmortem examination: pneumonia.

Histopathology

In all cases autopsy was performed within 24 hours after death. Postmortem examination of the formalin-fixed brain and spinal cord in cases 1 and 2 confirmed clinical diagnosis of MS. In cases 3 and 4 concerning patients who died with diagnosis of the cerebral stroke aged 76 and 81 years, diagnosis of MS was established after gross examination of the brain. This revealed characteristic typically located periventricular plaques of demyelination. The results of histopathological examination were presented in the previous paper (Rafałowska et al. 1988).

Immunocytochemistry

For evaluation of the blood-brain barrier disturbances the technique of the peroxidase-antiperoxidase according to the method of Sternberger et al. (1970) was used. In the host serum proteins such as IgG, α_2 -macroglobulin and fibrinogen were visualized. The vascular network was displayed by antibodies factor VIII (F VIII, RAG) – as the marker of endothelial cells.

The histocytic cell infiltrations were revealed by their marker i.e. α_1 -antitrypsin. The immunocytochemical reactions were evoked in the following way: five- to eight-micrometer thick sections, deparaffinized and pretreated with the following reagents: 0.0125% trypsin for 1 hour, preincubation with 2% normal swine serum diluted with trisma-base buffer (TBS, Sigma, USA), pH 7.6. Thereafter, they were incubated over night with the following reagents: Fab fragment of IgG (1:6000, Biomed, Poland), α_2 -macroglobulin (1:3000, Biomed, Poland), fibrinogen (1:3000, Poland), α_1 -antitrypsin, and F VIII (RAG), all reagents 1:1000 (Dakopatts, Denmark). After rinsing in phosphate-buffered solution (PBS) at pH 7.6, the sections were submitted for one hour to incubation with secondary reagents that is: swine antibodies

against rabbit IgG (1:50) and rabbit-PAP-complex (1:200) (all antisera from Dakopatts, Denmark). The immune reactions were developed by 15 min incubation in 0.05% 3,3-diaminobenzidine tetrachloride (Sigma, St. Louis, USA) with addition of 0.01% H₂O₂. Afterwards, the sections counterstained with hemalum or not were dehydrated and mounted in DePeX (Serva, FRG) for examination in the light microscope. The immunocytochemical reactions were seen especially in areas with active or chronic demyelination, compared with surrounding e.g. normally-looking tissue.

RESULTS

Histopathological examination

In all cases within the active demyelinating areas, tissue congestion was found, involving mostly very small vessels. The perivascular transudate and ecchymoses were visible only in case 3 against a pale and somewhat rarefied background with scarcely dispersed cells. Reduced myelin staining and loosening of the active plaque structure was found in all cases. Proliferation of astrocytes with reactive forms was seen within the plaques in all cases, but the astroglial response at the edge of active plaques was more marked in cases 1 and 2 than in those concerning senile patients. Participation of activated microglial cells in active plaques was also more distinct in cases 1 and 2 than in senile ones. So was the intensity of the perivascular lymphocytic reaction within active demyelinating areas and subarachnoidal space. Participation of macrophages, monocytes and plasmatic cells was also more evident in young cases.

Immunocytochemical investigations

IgG of variable intensity was present within active (Fig. 1) and nonactive demyelinating areas. The most distinct reaction was found within old subependymal plaques (Fig. 2). Sometimes IgG was present in the perivascular space of the active demyelination or nearby (Fig. 3). In senile cases diffuse reaction was somewhat more intensive. Intracellular IgG reaction appeared in a part of macrophages and reactive astrocytes in both types of demyelinating lesions (Figs 4, 5). Within apparently normal tissues in neurons of deep cortex layers (Fig. 6) and even in nerve cells of basal ganglia the IgG reaction was also visible. Plasma and blood vessel walls of various size within recent and old demyelination lesions were stained for IgG. The meninges, adventitia of meningeal vessels and the glial limiting membrane even at a certain distance from the demyelinated areas were also stained. The reaction of lymphocytes to IgG was negative.

Alpha₂-macroglobulin. Within old plaques the diffuse reaction was somewhat weaker than that of IgG. It rarely occurred within active plaques (Fig. 7), in particular it was rarely found in the perivascular space of recent plaques. Alpha₂-macroglobulin stained slightly some macrophages and reactive astrocytes within recent and old plaques. Seldom and less intensively than IgG alpha₂-macroglobulin, plasma and blood vessel walls were stained (Fig. 7).

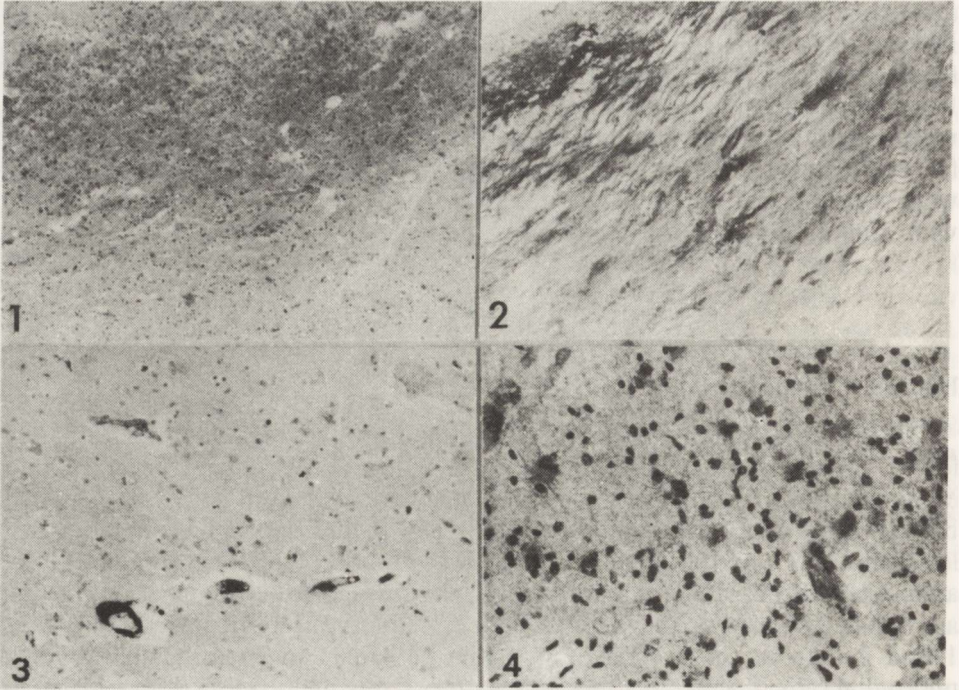


Fig. 1. Case 3. IgG. Diffuse reaction within a recent demyelination lesion with loosening of tissue structure. $\times 64$.

Ryc. 1. Przyp. 1. IgG. Rozlana reakcja dyfuzyjna w świeżym ognisku demielinizacji z rozrzedzeniem podłoża. Pow. $64\times$.

Fig. 2. Case 3. IgG. Extensive diffuse reaction within old subependymal plaque. $\times 128$

Ryc. 2. Przyp. 3. IgG. Intensywna reakcja dyfuzyjna w starej blaszce podwysciółkowej. Pow. $128\times$.

Fig. 3. Case 2. IgG. Perivascular and intracellular reaction of cortical nerve cells in the vicinity of active demyelination lesion. $\times 128$

Ryc. 3. Przyp. 2. IgG. Reakcja okołonaczyniowa oraz śródkomórkowa reakcja neuronów kory w pobliżu ogniska aktywnej demielinizacji. Pow. $128\times$.

Fig. 4. Case 1. IgG. Intracellular reaction of hypertrophic astrocytes, gemistocytes and microglial rod cells within recent plaque. $\times 256$

Ryc. 4. Przyp. 1. IgG. Śródkomórkowa reakcja przerostłych astrocytów, gemistocytów i pałeczek mikrogleju w aktywnej blaszce. Pow. $256\times$.

Sporadically an intracellular reaction was present in the nerve cells (Fig. 8) in the meninges and glial limiting membrane.

Fibrinogen. A diffuse and perivascular reaction was found both within active demyelinating areas (Figs 9, 10) and within old plaques. The intensive perivascular reaction in recent demyelinations was found only in case 4, in which abundant perivascular transudate (Fig. 11) was visible also in other stainings. An intracellular reaction of fibrinogen occurred in a part of macrophages, in reactive astrocytes and gemistocytes (Fig. 12) within recent and old plaques. Plasma and blood vessel walls within plaques were slightly stained. Sporadically neurons of deep cortical layers adjacent to the demyelination lesion were immunopositive.

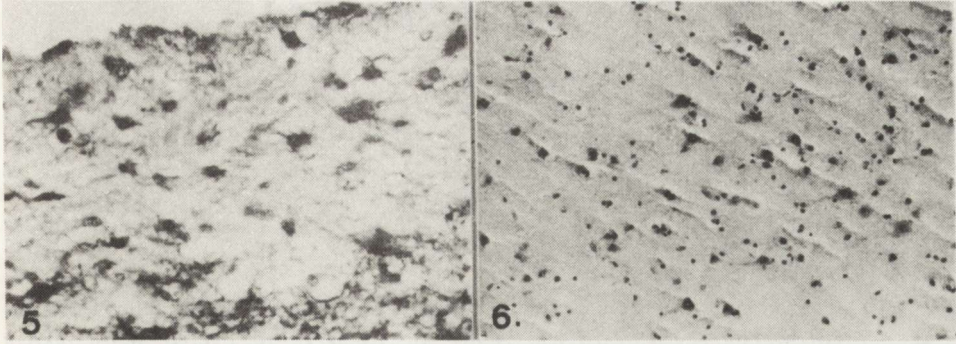


Fig. 5. Case 3. IgG. Intracellular reaction of subependymal glial cells within diffusely stained old subependymal plaque. $\times 256$

Ryc. 5. Przyp. 3. IgG. Śródkomórkowa reakcja gleju podwysięłkowego w obrębie dyfuzyjnie zabarwionej starej blaszki podwysięłkowej. Pow. 256 \times

Fig. 6. Case 1. IgG. Intracellular reaction in neurons of the 3rd cortical layer at a distance from the active demyelination. $\times 128$

Ryc. 6. Przyp. 1. IgG. Śródkomórkowa reakcja neuronów III warstwy kory oddalonej od aktywnej demielinizacji. Pow. 128 \times

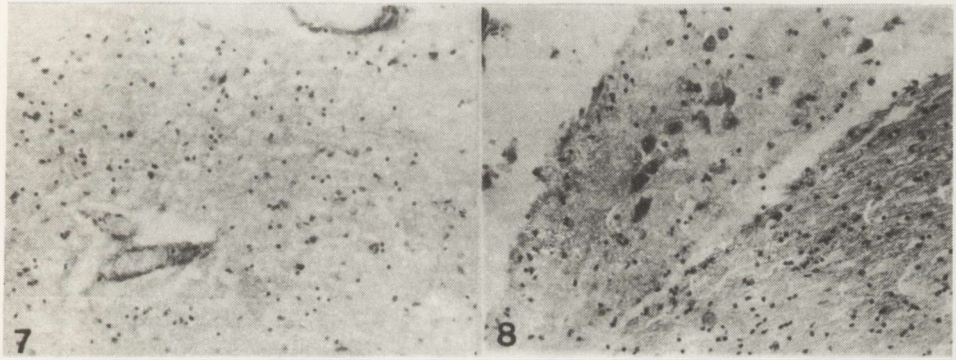


Fig. 7. Case 3. Alpha₂-macroglobulin. Within diffusely stained active plaque, intracellular reaction of hypertrophic astrocytes and blood vessel walls. $\times 128$

Ryc. 7. Przyp. 3. Alfa₂-makroglobulina. Na tle dyfuzyjnie zabarwionej aktywnej blaszki śródkomórkowa reakcja przerosłych astrocytów i ścian naczyń krwionośnych. Pow. 128 \times

Fig. 8. Case 3. Alpha₂-macroglobulin. Marked intracellular reaction of supracallosal gyrus neurons. $\times 128$

Ryc. 8. Alfa₂-makroglobulina. Wyraźna reakcja śródkomórkowa neuronów zakrętu nadspoidłowego. Pow. 128 \times

Factor VIII, which is a marker of blood vessel endothelium, occasionally stained diffusely recent (Fig. 13) demyelination areas; a somewhat more intensive reaction was observed within old plaques in cases 3 (Fig. 14) and 4. A remarkable perivascular reaction (Fig. 15) was found only in case 4 with the above mentioned extensive perivascular transudation. Endothelium, other elements of walls of small blood vessels and plasma filling their lumina were stained both within recent (Fig. 13) and old plaques (Fig. 14). An intracellular

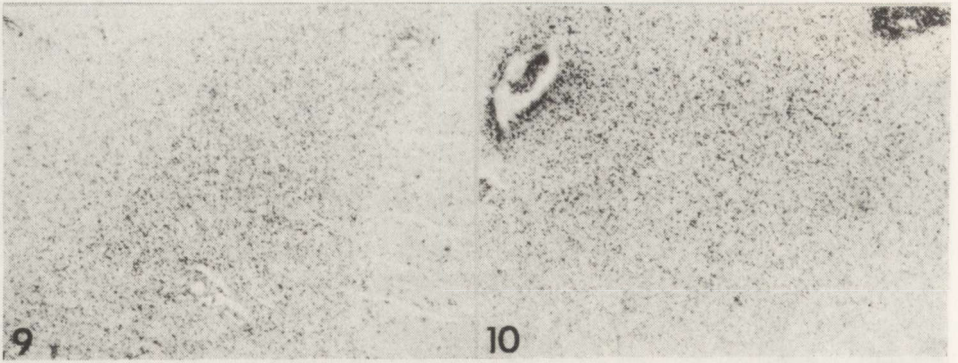


Fig. 9. Case 1. Fibrinogen. Weak diffuse reaction within active lesion of the convolution axis. $\times 64$
Ryc. 9. Przyp. 1. Fibrynogen. Słaba reakcja dyfuzyjna w aktywnym ognisku w osi zakrętu korowego. Pow. 64

Fig. 10. Case 1. Fibrinogen. Diffuse staining and perivascular reaction within recent plaque. Multilayer perivascular infiltrate. $\times 64$

Ryc. 10. Przyp. 1. Fibrynogen. Dyfuzyjne zabarwienie i okołonaczyniowa reakcja w świeżej blaszce. Wielowarstwowy naciek okołonaczyniowy. Pow. 64 \times

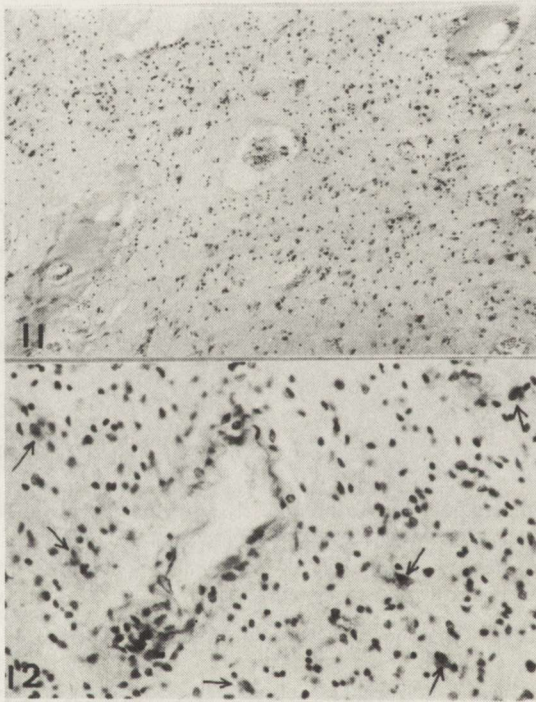


Fig. 11. Case 4. Fibrinogen. Diffuse reaction within recent demyelination lesion. Marked reaction of perivascular transudates. Intracellular reaction of hypertrophic astrocytes. $\times 64$

Ryc. 11. Przyp. 4. Fibrynogen. Dyfuzyjna reakcja w świeżym ognisku demielinizacji. Wyraźnie zabarwione przesieki okołonaczyniowe. Śródkomórkowa reakcja przerosłych astrocytów. Pow. 64 \times

Fig. 12. Case 1. Fibrinogen. Intracellular reaction of hypertrophic astrocytes (arrows) within active demyelination area. $\times 256$

Ryc. 12. Przyp. 1. Fibrynogen. Śródkomórkowa reakcja przerosłych astrocytów (strzałki) w aktywnym ognisku demielinizacji. Pow. 256 \times

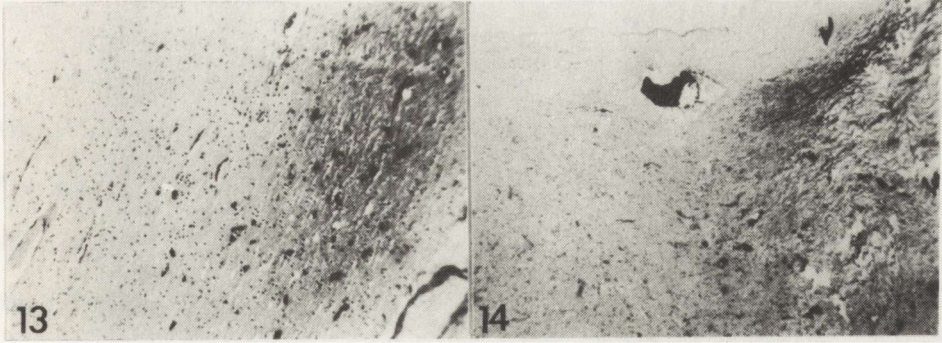


Fig. 13. Case 3. Factor VIII. Diffuse reaction of recent plaque within U-fibers. $\times 64$

Ryc. 13. Przyp. 3. Czynniki VIII. Dyfuzyjna reakcja w świeżej blaszce w obrębie U włókien. Pow. $64 \times$

Fig. 14. Case 3. Factor VIII. Diffusely stained old subependymal plaque with loosening of structure. Intensive reaction of plasma and blood vessel walls. $\times 25$

Ryc. 14. Przyp. 3. Czynniki VIII. Dyfuzyjne zabarwienie starej blaszki podwyściółkowej z rozrzedzonym podłożem. Intensywna reakcja osocza i ścian naczyń krwionośnych. Pow. $25 \times$

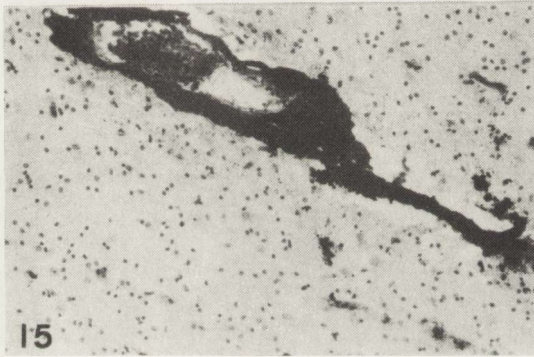


Fig. 15. Case 4. Factor VIII. Diffuse and perivascular reaction within active demyelination lesion. Intracellular reaction of hypertrophic astrocytes. $\times 128$

Ryc. 15. Przyp. 4. Czynniki VIII. Dyfuzyjna oraz okołonaczyniowa reakcja w aktywnym ognisku demielinizacji. Śródkomórkowa reakcja przerosłych astrocytów. Pow. $128 \times$

reaction sometimes occurred in reactive astrocytes and in neurons of the cortex adjacent to the active demyelinating area.

Alpha₁-antitrypsin. The diffuse reaction of various intensity more marked in cases 3 and 4, occurred more frequently within recent demyelination areas (Fig. 16). It was less frequent in old plaques (Fig. 17). A perivascular reaction took place mainly within active plaques, particularly in case 4 (Fig. 18). Intracellular reaction was visible in macrophages, active astrocytes and gemistocytes within recent (Figs 8, 16) and old lesions and in some cortical neurons in the neighbourhood of the demyelination area (Figs 19, 20). The results of studies are summarized in (Table 1).

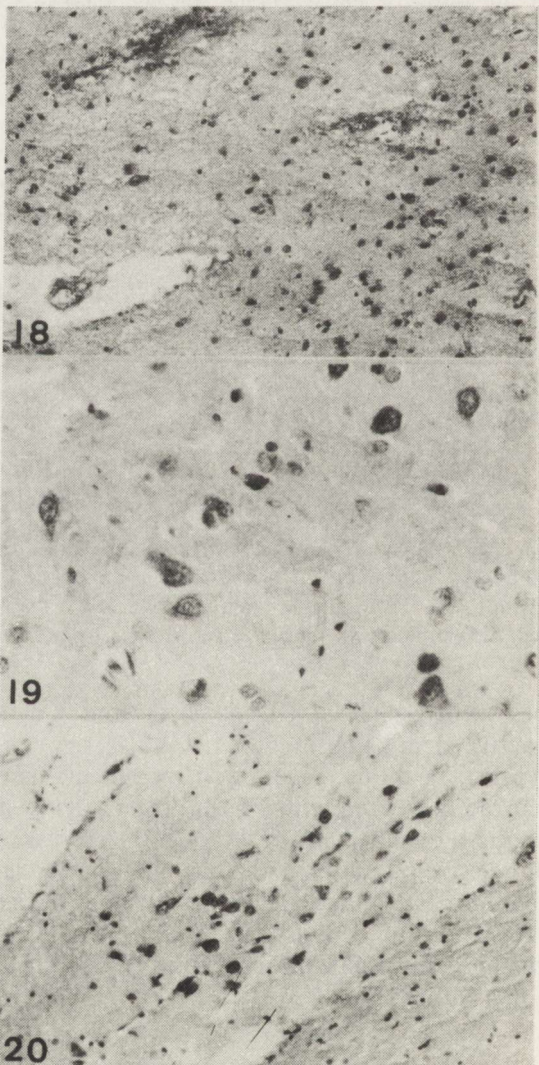
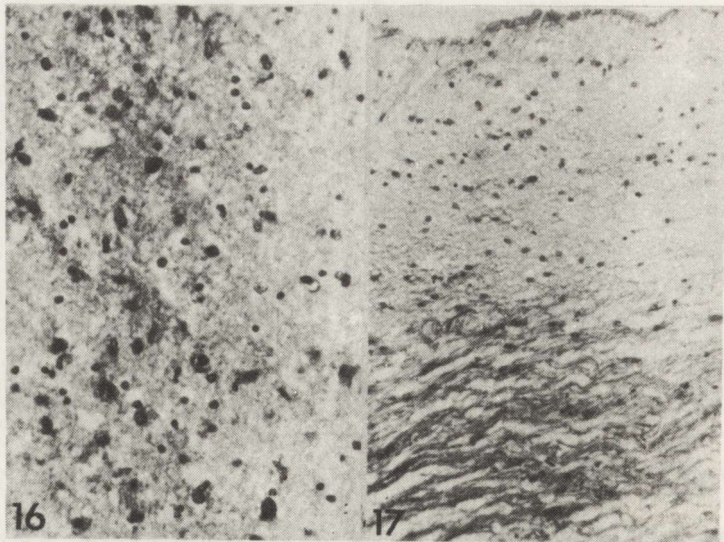


Fig. 16. Case 3. Alpha₁-antitrypsin. Diffuse reaction within recent plaque. Intracellular reaction of macrophages and reactive astrocytes. × 256

Ryc. 16. Przyp. 3. Alfa₁-antytrypsyna. Dyfuzyjna reakcja w świeżej blaszce. Śródkomórkowa reakcja makrofagów i reaktywnych astrocytów. Pow. 256 ×

Fig. 17. Case 3. Alpha₁-antitrypsin. Diffuse reaction within old subependymal plaque with loosening of structure. × 128

Ryc. 17. Przyp. 3. Alfa₁-antytrypsyna. Dyfuzyjna reakcja w starej blaszce podwyściółkowej z rozrzedzonym podłożem. Pow. 128 ×

Fig. 18. Case 4. Alpha₁-antitrypsin. Diffuse and perivascular reaction within active demyelination plaque. Intracellular reaction of hypertrophic astrocytes. × 128

Ryc. 18. Przyp. 4. Alfa₁-antytrypsyna. Okołonaczyniowa i dyfuzyjna reakcja w aktywnym ognisku demielinizacji. Śródkomórkowa reakcja przerosłych astrocytów. Pow. 128 ×

Fig. 19. Case 3. Alpha₁-antitrypsin. Marked intracellular reaction in neurons of deep cortical layers, nearby active demyelination of U-fibers. × 256

Ryc. 19. Przyp. 3. Alfa₁-antytrypsyna. Wyraźna śródkomórkowa reakcja neuronów głębokich warstw kory, przyległej do aktywnej demielinizacji U włókien. Pow. 256 ×

Fig. 20. Case 3. Alpha₁-antitrypsin. Marked intracellular reaction of supracallosal gyrus neurons. × 128

Ryc. 20. Przyp. 3. Alfa₁-antytrypsyna. Wyraźna śródkomórkowa reakcja neuronów zakrętu nadspoidłowego. Pow. 128 ×

DISCUSSION

In all stainings applied diffuse perivascular and intracellular reactions were present (Tab. 1). The diffuse reaction was found rather more frequently within demyelinated inactive areas, and was more distinct in senile cases. The perivascular reaction was slight and predominated in the regions of active demyelination.

Both diffuse and perivascular reactions may be considered as indicating an increase in the blood-brain barrier permeability. Increase of the BBB permeability in MS was described by Broman in 1964. The fluid leakage was accompanied by an increase of the number of pinocytotic vesicles in the cerebral vessels endothelium (Brown 1978). In EAE, i.e. in the experimental model resembling MS, leakage takes place both through an increase of the endothelial vesicular transport (Hirano et al. 1970; Claudio et al. 1988) as well as through the widened interendothelial spaces (Lampert, Carpenter 1965; Hirano et al. 1970; Claudio et al. 1988). It was emphasized that inflammatory changes appear within areas with an increase of the BBB permeability for serum proteins (Kristensson et al. 1976) and that the leakage is limited to vessels with inflammatory infiltrations (Ackerman et al. 1981). The increase of the BBB permeability is correlated with the migration of mononuclear phagocytes (Simmons et al. 1987). It was also demonstrated that severe inflammatory infiltrations are connected with significant damage of the BBB and with leakage of antimyelin antibodies, i.e. immunoglobulins against nerve tissue (Linnington, Lassmann 1987). It has been suggested that in chronic relapsing EAE changes in the distribution of anionic sites on the endothelial cell surface may influence the inflammatory cells attachment and subsequent migration of

Table 1. Results of immunocytochemical studies – intensity of reactions
 Tabela 1. Wyniki badań immunocytochemicznych – nasilenie odczynów

Case No Nr przypadku	Age (years) Wiek (lata)	Reaction Reakcja	IgG IgG		α_2 -macroglobulin α_2 -makroglobulina		Fibrinogen Fibrynogen		Factor VIII Czynnik VIII		α_1 -antitrypsin α_1 -antytrypsyna	
			demyelination active demielinizacja aktywna	nonactive nieaktywna	demyelination active demielinizacja aktywna	nonactive nieaktywna	demyelination active demielinizacja aktywna	nonactive nieaktywna	demyelination active demielinizacja aktywna	nonactive nieaktywna	demyelination active demielinizacja aktywna	nonactive nieaktywna
1	33	diffuse dyfuzyjna	+	+	-	±	±	+	±	-	±	+
		perivascular okołonaczyniowa	±	-	±	+	+	+	±	-	±	-
		intracellular śródkomórkowa	++	+	±	±	+	+	-	-	++	+
2	41	diffuse dyfuzyjna	++	++	-	+	-	+	-	±	±	+
		perivascular okołonaczyniowa	++	++	-	-	-	±	-	±	±	±
		intracellular śródkomórkowa	-	±	-	-	-	-	-	-	-	+
3	76	diffuse dyfuzyjna	++	+++	+	+++	-	+	+	++	++	++
		perivascular okołonaczyniowa	-	-	±	-	-	+	±	-	-	-
		intracellular śródkomórkowa	+	+	-	±	-	-	±	±	+	++
4	81	diffuse dyfuzyjna	++	+++	+	++	+	++	±	++	++	++
		perivascular okołonaczyniowa	+	-	++	-	++	-	+++	-	+++	-
		intracellular śródkomórkowa	+	+	+	+	+	+	+	-	++	-

those cells to perivascular tissues (Lossinsky et al. 1988). The above investigations and other authors' studies (Grundke-Iqbal et al. 1980; Juhler et al. 1986; Moore, Raine 1987) indicate that BBB damage takes place in the early period of the disease within active acute demyelination areas in which marked inflammatory infiltrations are present. It has been even noted, that in chronic relapsing EAE, closely resembling MS (Lassmann, Wiśniewski 1979), BBB damage was not observed within old demyelination lesions (Kitz et al. 1984). However, in our material a diffuse reaction appeared both within active demyelination areas as well as old plaques. In the latter, particularly those located subependymally it was found even more frequently. Only a few data from references confirm our findings on the presence of serum proteins within old demyelination lesions. Tavolato (1975) found IgG in old MS plaques. Krajewski and Asshauer (1986) performed correlative immunocytochemical and NMR investigations on hemispheric slices from the brains of patients deceased of MS. They showed the presence of albumin, IgG and alpha₂-macroglobulin both within active as well as nonactive demyelination areas. Within those lesions an increase of the magnetic resonance signal was found. The question arises whether within inactive demyelination areas blood serum proteins were maintained from the time of the pending active process of demyelination. If so, why were they not phagocitized? or, maybe, within old MS plaques damage of the BBB also takes place, although inflammatory changes are very slight or even non-existent. Old MS plaques showed frequently loosening of the tissue structure and a very small number of astrocytes. It is possible, that small blood vessels localized within the loosened, i.e. changed background are surrounded by a smaller number of astrocytic processes or processes of less efficient and/or changed astrocytes. Such vessels easily undergo impairment and may be more permeable to serum blood proteins. Moreover, the demyelinated fibers are more prone to imbibition with serum components because of increased axolemma permeability (Shintaku et al. 1987). It is also possible that the old subependymal plaques intensively stained in our cases are additionally penetrated by IgG present in the cerebrospinal fluid. In MS, in a long-lasting process of BBB damage, vascular endothelial cells, essential in the pathogenesis of the disease may probably play an essential role.

Antiendothelial antibodies damaging the endothelial cells cause the increase in number of micropinocytic vesicles, however, they do not evoke an inflammatory infiltrate (Hart et al. 1981). In MS antiendothelial cell antibodies and immune complexes may also play a pathogenetic role in the BBB damage (Tanaka et al. 1987).

Immunization of guinea pigs with the endothelial cell membrane fraction results in delayed hypersensitivity to this fraction and produces morphological changes very similar to MS alterations (Tsukada et al. 1987). It points to a possibility of acquiring antigenic properties by endothelial cells and provoking a humoral or cell reaction which leads in consequence to endothelial cells damage, i.e. to the BBB damage. Our material clearly indicates a greater perivascular inflammatory reaction in young cases than in senile ones (Rafałowska et al. 1988). It also shows that in young cases of MS with numerous active demyelination lesions vascular permeability was relatively

low. The disease lasted 17 years in case 1 and 12 years in case 2. The long duration of the disease influences the decrease of demyelination activity and intensity of perivascular infiltrates (Guseo, Jellinger 1975). In the chronic course of the disease the activity of suppressor cells increases (Antel et al. 1988).

In both our cases corticosteroid therapy, leading to a decrease of cellular infiltrates (Rojiani et al. 1988), was used. All these factors weakening the inflammatory-demyelinating process, may be indirectly involved in decreasing the blood vessels permeability in our young age cases. Intracellular immuno-reactions directed against different antigens involved reactive astrocytes, nerve cells and, from time to time, macrophages located within demyelination lesions and in surrounding tissues. The intracellular reaction for IgG is perhaps connected with the nonspecific binding of the latter with nervous tissue and vessels (Goust et al. 1984) and appears within some nuclei of the brain stem and spinal cord as well as pia mater and meningeal vessels (Fabian, Ritchie 1986). Cross-linking immunoglobulin reactions may also occur in contact with activated phagocytic cells acting as oxygen donor (Jasin 1987).

However, immuno-staining of some nerve cells (showing features of injury in HE staining) in all methods used except that for alpha₂-macroglobulin, suggests a possibility of cell membrane damage and inhibition of cells with proteins, characterized by a relatively low molecular weight. A similar mechanism may also concern reactive astrocytes.

As regards literature data on the remarkable prevalence of lymphocytes T within the demyelinating plaque (Traugott et al. 1983) and in perivascular infiltrates the intracellular lymphocytic reaction for IgG was not found in our cases.

To sum up it is worth noting that our material is not typical: two young cases with a very long course of the disease, after a very frequently repeated corticosteroid therapy, and two senile cases with a morphological picture modified by age (Rafałowska et al. 1988), do not allow general conclusions. Therefore, our material can only indicate that failure of vessel permeability occurs within active demyelination areas as well as old plaques, and that in MS in senile age permeability of the blood vessels may be somewhat greater owing to numerous additional pathogenic factors.

PRZEPUSZCZALNOŚĆ BARIERY KREW-MÓZG (BBB) W STWARDNIENIU ROZSIANYM

Streszczenie

W czterech przypadkach stwardnienia rozlanego oceniono zaburzenia przepuszczalności naczyń w aktywnych i starych ogniskach demielinizacji. Do oceny zaburzeń zastosowano metodę immunoperoxydazy pośredniej (wg Sternbergera i wsp. 1970) w celu uwidocznienia IgG, alfa₂-makroglobuliny, fibrynogenu, czynnika VIII oraz alfa₁-antytrypsyny. Stwierdzono różny stopień wzmożonej przepuszczalności naczyń dla wyżej wymienionych białek zarówno w świeżych, jak i starych blaszkach stwardnienia rozlanego.

REFERENCES

1. Ackerman H. P., Ulrich J., Heitz Ph. U.: Experimental allergic encephalomyelitis. Exsudate and cellular infiltrate in the spinal cord of Lewis rats. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1981, 54, 149–152.
2. Antel J., Brown M., Nicholas M. K., Blain M., Noronha A., Reder A.: Activated suppressor cell function in multiple sclerosis – clinical correlations. *J Neuroimmunol*, 1988, 17, 323–330.
3. Broman T.: Blood-brain barrier damage in multiple sclerosis. Supravital test observation. *Acta Neurol Scand*, 1964, 40, [Suppl 10], 21–24.
4. Brown W. J.: The capillaries in acute and subacute multiple sclerosis plaques: a morphometric analysis. *Neurology*, 1978, 28, 84–92.
5. Claudio L., Kress Y., Factor J. R., Norton W. T., Brosnan C. F.: Ultrastructural studies of the blood-brain barrier in acute experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47, 323 (Abstr.).
6. Fabian R. H., Ritchie T. C.: Intraneuronal IgG in the central nervous system. *J Neurol Sci*, 1986, 73, 257–267.
7. Goust J. M., Mangum M., Powers J. M.: An immunologic assessment of brain-associated IgG in senile cerebral amyloidosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1984, 43, 481–488.
8. Grundke-Iqbal J., Lassman H., Wiśniewski H. M.: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Immunohistochemical studies. *Arch Neurol*, 1980, 37, 651–656.
9. Guseo A., Jellinger K.: The significance of perivascular infiltrations in multiple sclerosis. *J Neurol*, 1975, 211, 51–60.
10. Hart M. N., De Bault L. E., Sadewasser K. L., Cancilla P. A., Henriquez E. M.: Morphologic effect of antibody to mouse brain endothelium *in vivo*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1981, 40, 84–91.
11. Hirano A., Dembitzer H. M., Becker N. H., Levine S., Zimmermann H. M.: Fine structural alterations of the blood-brain barrier in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1970, 29, 432–440.
12. Jasin H. E.: Cross-linking of immune complexes by human mononuclear phagocytes. *Inflammation*, 1987, 11, 117–129.
13. Juhler M., Laursen H., Barry D. J.: The distribution of immunoglobulins and albumin in the central nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neurol Scand*, 1986, 73, 119–124.
14. Kitz K., Lassmann H., Löwenthal A.: Blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: a correlative study between cerebrospinal fluid protein concentrations and tracer leakage in the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 63, 41–50.
15. Krajewski S., Asshauer J. K.: The correlation of neuropathological changes with post mortem nuclear magnetic resonance (NMR). *Proc 19th Danube Symposium for Neurological Sciences, Heidelberg*, 9–11 October 1986.
16. Kristensson K., Wiśniewski H. M., Bomstein M. B.: About demyelinating properties of humoral antibodies in experimental allergic encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1976, 36, 307–314.
17. Lampert P. W., Carpenter S.: Electron microscopic studies on the vascular permeability and the mechanism of demyelination in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1965, 24, 11–24.
18. Lassmann H., Wiśniewski H. M.: Chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis. Clinicopathological comparison with multiple sclerosis. *Arch Neurol*, 1979, 36, 490–497.
19. Lington C., Lassmann H.: Antibody responses in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis: correlation of serum demyelinating activity with antibody titre to the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MAG). *J Neuroimmunol*, 1987, 17, 61–69.
20. Lossinsky A. S., Badmajew V., Moretz R., Wiśniewski H. M.: Scanning and transmission electron microscopic studies of the mouse blood-brain barrier in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis (Cr EAE). *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47, 331 (Abstr.).
21. Moore G. R. W., Raine C. S.: Immunologic localization of IgG during autoimmune demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987, 46, 336 (Abstr.).
22. Rafałowska J., Krajewski S., Dolińska E., Barcikowska-Litwin M.: On modification of multiple sclerosis histopathological picture in advanced age. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 211–223.

23. Rojiani A. M., Princas J. W., Cho E. S.: Alteration of myelin degradation in electrolyte induced demyelination (EID) by steroid colchicine. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1988, 47, 307 (Abstr.).
24. Shintaku M., Hirano A., Liena J. F.: Increased diameter of demyelinated axons in chronic multiple sclerosis of the spinal cord. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1987, 46, 367 (Abstr.).
25. Simmons R. D., Buzbee T. M., Linthicum D. S., Mandy W. J., Chen G., Wang C.: Simultaneous visualisation of vascular permeability changes and leukocyte egress in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 74, 191–193.
26. Sternberger L. A., Hardy P. H. Jr., Cuculis F. F., Meyer M. G.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antiperoxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*, 1970, 18, 315–333.
27. Tanaka Y., Tsukada N., Koh Ch.-S., Yanagisawa N.: Antiendothelial cell antibodies and circulating immune complexes in the sera of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 1987, 17, 49–59.
28. Tavolato B. F.: Immunoglobulin G distribution in multiple sclerosis brain. *J Neurol Sci*, 1975, 24, 1–11.
29. Tourtellote W. W., Ma B. J.: Multiple sclerosis: the blood-brain barrier and the measurement of *de novo* central nervous system IgG synthesis. *Neurology*, 1978, 28, (Supl), 76–83.
30. Traugott U., Reinherz E. L., Raine C. S.: Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol*, 1983, 4, 201–221.
31. Tsukada N., Koh Ch.-S., Yanagisawa V. N., Okawa A., Behan W. M. H., Behan P. O.: A new model for multiple sclerosis: Chronic experimental allergic encephalomyelitis induced by immunisation with cerebral endothelial cell membrane. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 73, 259–266.

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

HALINA KROH

INTRAVASCULAR AXONAL DEBRIS IN THE EXPERIMENTAL DEMYELINATION PROCESS

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

The remnants of myelin sheaths and myelin figures in brain capillaries are casual findings demonstrated on transection of *nervus hypoglossus* in the rat (Fernando 1973). Presently debris of myelinated axons have been found in cerebral vessels of some mice treated with ethylnitrosourea (ENU). This observation is discussed with the purpose to elucidate the course of events resulting in intravascular disintegration of myelin sheaths.

MATERIAL AND METHODS

Sixteen mature, noninbred Swiss mice aged 72–272 days, nine of their offspring and eight controls in corresponding ages, altogether 33 animals, were used. Eight adults and 8 other females on the 15th day of pregnancy were injected into the tail vein with a single dose of ENU solution (80 mg/kg b.wt. in 0.9 NaCl buffered to pH 4.2–4.4). Maternal and adult mice were sacrificed 7–300 days after injection, the progeny and controls (injected with 0.9 NaCl solution) were killed at the corresponding age. After cardiac perfusion with 3% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (except 7-day-old mice) standard sections from 16 brain regions (Kroh, Luciani 1978) were routinely fixed in 2% OsO₄ in cacodylate buffer, ethanols, and propylene oxide and embedded in Epon 812. Semithin sections 0.5 μm thick were stained according to Richardson, the ultrathin sections cut on a Reichert PC2 ultratome were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss 10 transmission electron microscope.

RESULTS

Residues of myelin sheaths were identified within the lumen of cerebral vessels of 9 experimental animals either only in semithin sections or their myelin remnants were confirmed or disclosed in ultrathin sections. Two animals presented myelin profiles in two separate capillaries on the same section at close distance (Tab. 1).

Table 1. Myelin debris in cerebral vessels in 3 groups of mice
Tabela 1. Fragmenty mieliny w naczyniach mózgu u 3 grup myszy

Experimental group Grupa doświadczalna	Age (days) Wiek (dni)	Experimental days Dni doświadczenia	Localization Lokalizacja	Identification semithin Identyfikacja półcieńkie	ME ME
Offspring Potomstwo	48	48	<i>Cerebellum</i>		1
	60	60	<i>Truncus cerebri</i>	1	
	70	70	<i>Globus pallidus</i>		1
	300	300	<i>Cerebellum</i>	2	2
Mothers Matki	81	7	<i>Truncus cerebri</i>		1
	?	14	<i>Globus pallidus</i> <i>Ventriculus lat.</i>		1
	?	14	<i>Truncus cerebri</i> <i>Cortex cerebri</i>	2 2	1
Adults Dorośle	152	48	<i>Truncus cerebri</i>	1	1
	282	200	<i>Cortex cerebri</i>	1	

The common contents of the examined vascular cross-sections, beside residues of myelin profiles were red blood cells and remains of morphotomic elements, some of which resembled degenerated mitochondria, empty or vesicular membraneous structures. Single or numerous breakdown products of myelinated fibers in the capillary lumina rarely exhibited regular profiles, more often their shape was irregular, indented (Fig. 1). The lamellar structure, blurred in places could be distinguished in all myelin residues. Some myelin profiles contained mostly floccular, rarefied axoplasmic debris, whereas the better preserved ones also mitochondria (Fig. 2). In one case beside a vascular myelin-like body there was additionally a myelin-like figure on the surface of the ependymal cilia in the lateral ventricle (Fig. 3).

Another finding concerns two maternal mice presenting myelin within the vascular lumen and two adult animals without myelin residues in the capillaries. All of them (7th and 14th day of the experiment) presented in some regions vascular changes of varying degree up to necrosis of the capillary endothelium (Figs 4a, b, c and 5). Still another feature presented by the experimental 3-week-old offspring mouse and two controls (14 and 300 days old) was the protrusion into the lumen of a venous vessel of cellular elements filled with the lipid material, membraneous and lamellar structures penetrating vascular wall (Fig. 6a, b).

Beside vascular changes, the alterations of the nervous tissue of experimental maternal and adult mice with intravascular myelin debris consisted of small foci of degenerated myelin, small intercellular foci of substructural debris, accumulation of the lipopigment, lysosomes and dense bodies with linear densities in the cytoplasm of neurons and glia. In an offspring group such changes were exhibited only by the oldest 300-day-old mouse.

The cellular changes in the brains of control animals consisted of increasing with age accumulation of lipopigment, lysosomes, fat globules, and some degeneration of singular axons, and from the third month of an accumulation of subcellular breakdown products in the intercellular space.

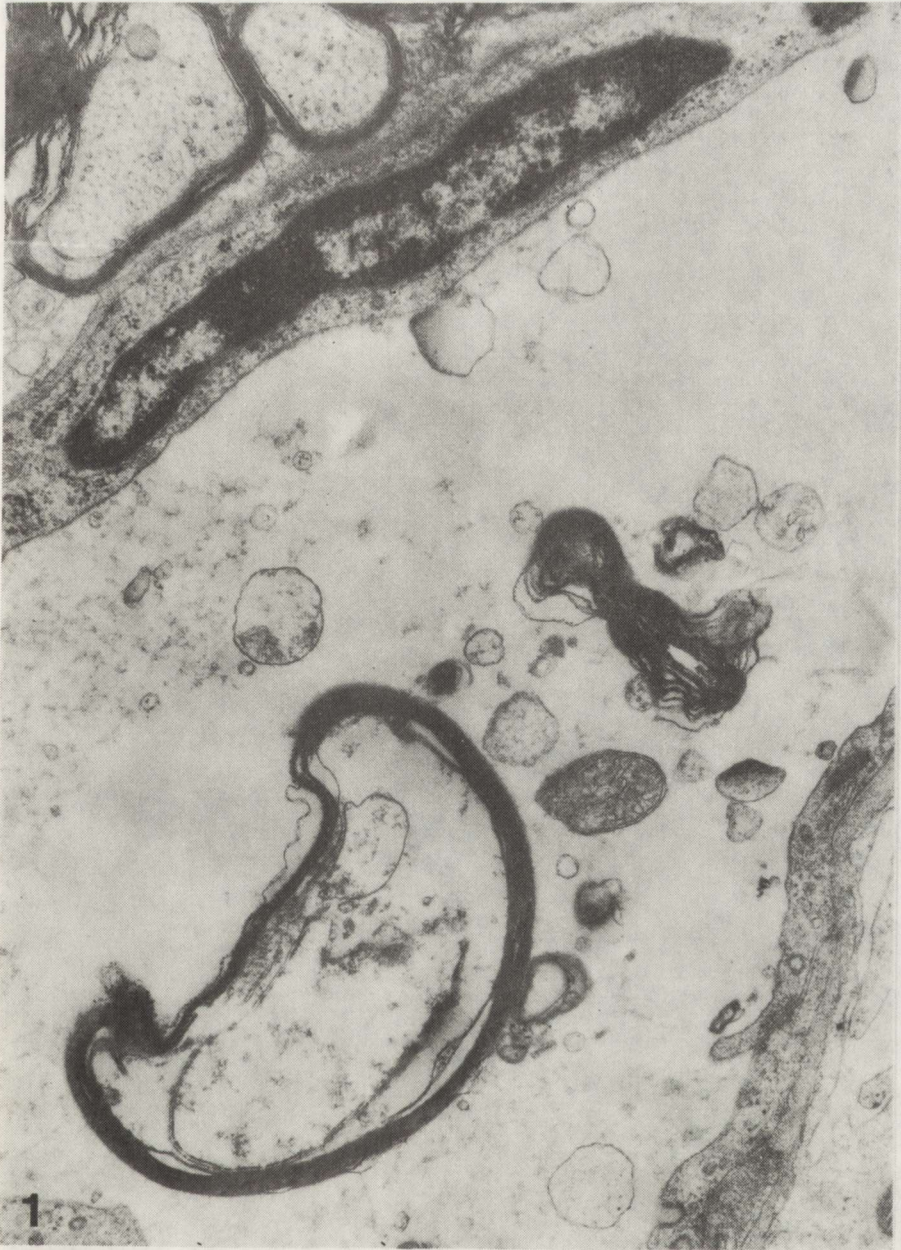


Fig. 1. Intravascular myelin profile with inner mesaxon. Brain stem, maternal mouse, 14 days of the experiment. $\times 12500$

Ryc. 1. Śródnacyniowy fragment mezasonu otoczonego mieliną. Pień mózgu, mysz matka, 14 dzień doświadczenia. Pow. $12.500 \times$

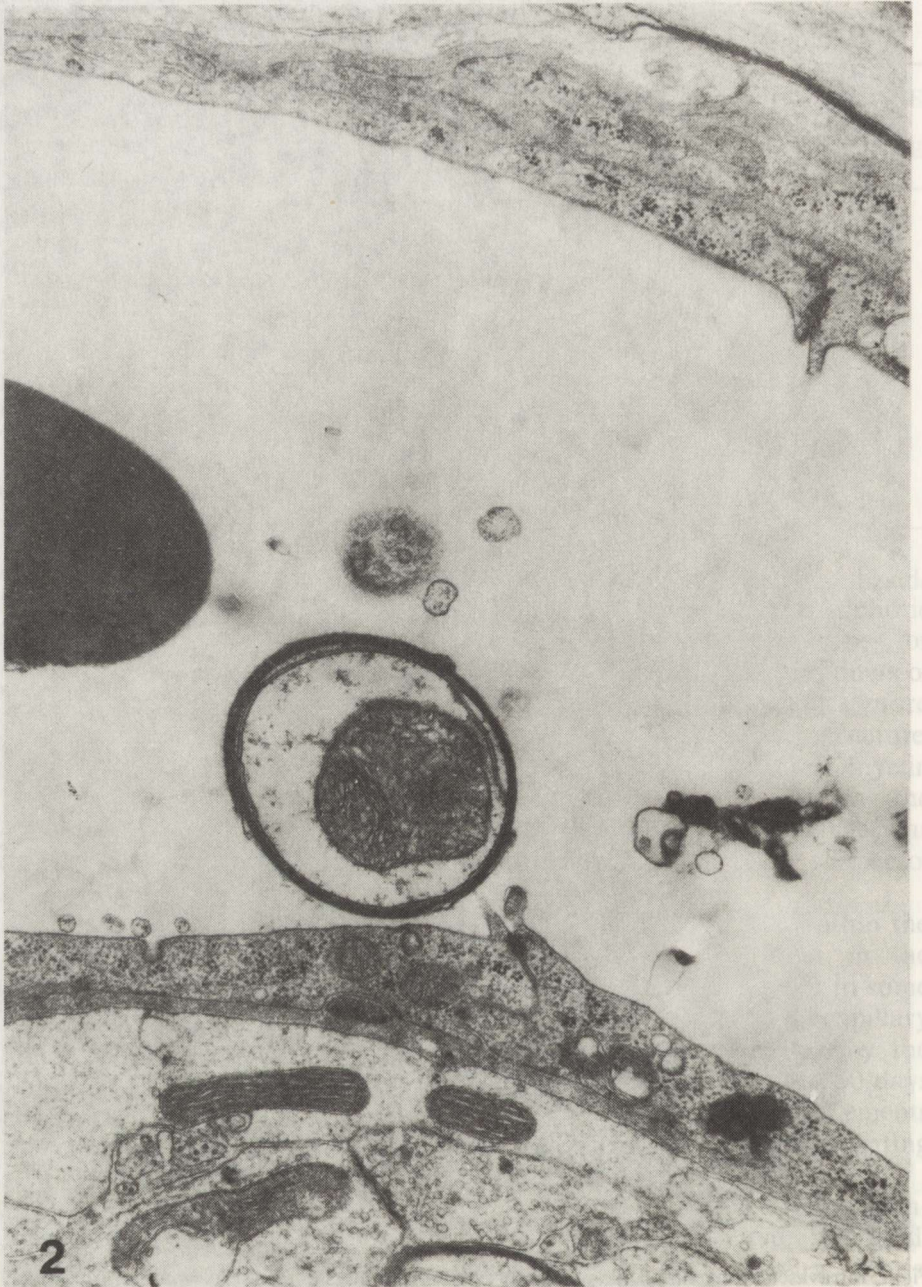


Fig. 2. Intervascular regular axonal profile containing axoplasm and a mitochondrion. Brain stem, maternal mouse, 14 days of the experiment. $\times 12500$

Ryc. 2. Śródnacyniowy prawidłowy zarys aksonu zawierającego aksoplazmę i mitochondrium. Pień mózgu, mysz matka, 14 dzień doświadczenia. Pow. $12.500\times$

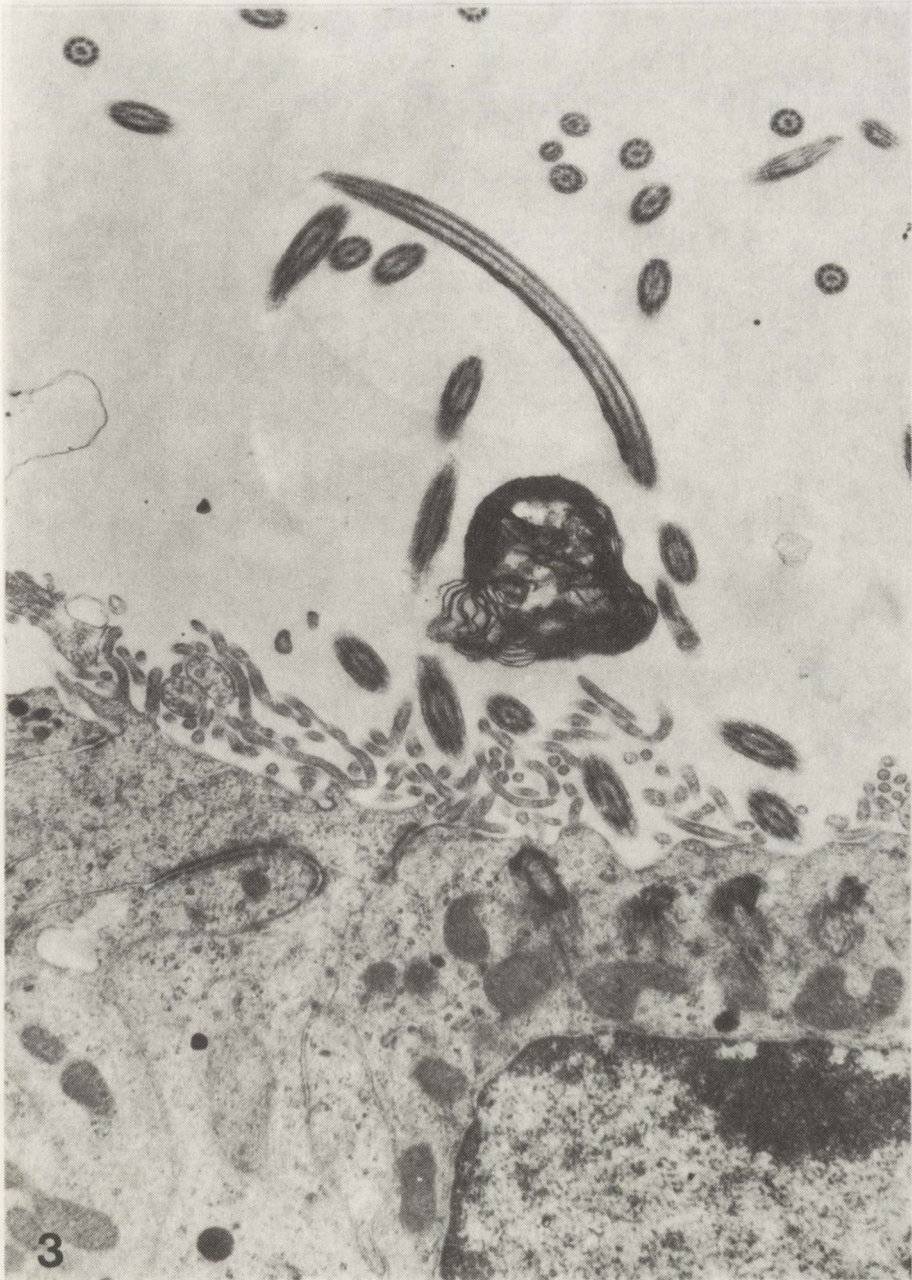


Fig. 3. Myelin-like body upon the ventricular ependymal cilia. Maternal mouse, 70 days of the experiment. $\times 8000$

Ryc. 3. Ciało mielinopodobne na powierzchni rzęsek wyściółki komory. Mysz matka, 70 dzień doświadczenia. Pow. 8.000 \times

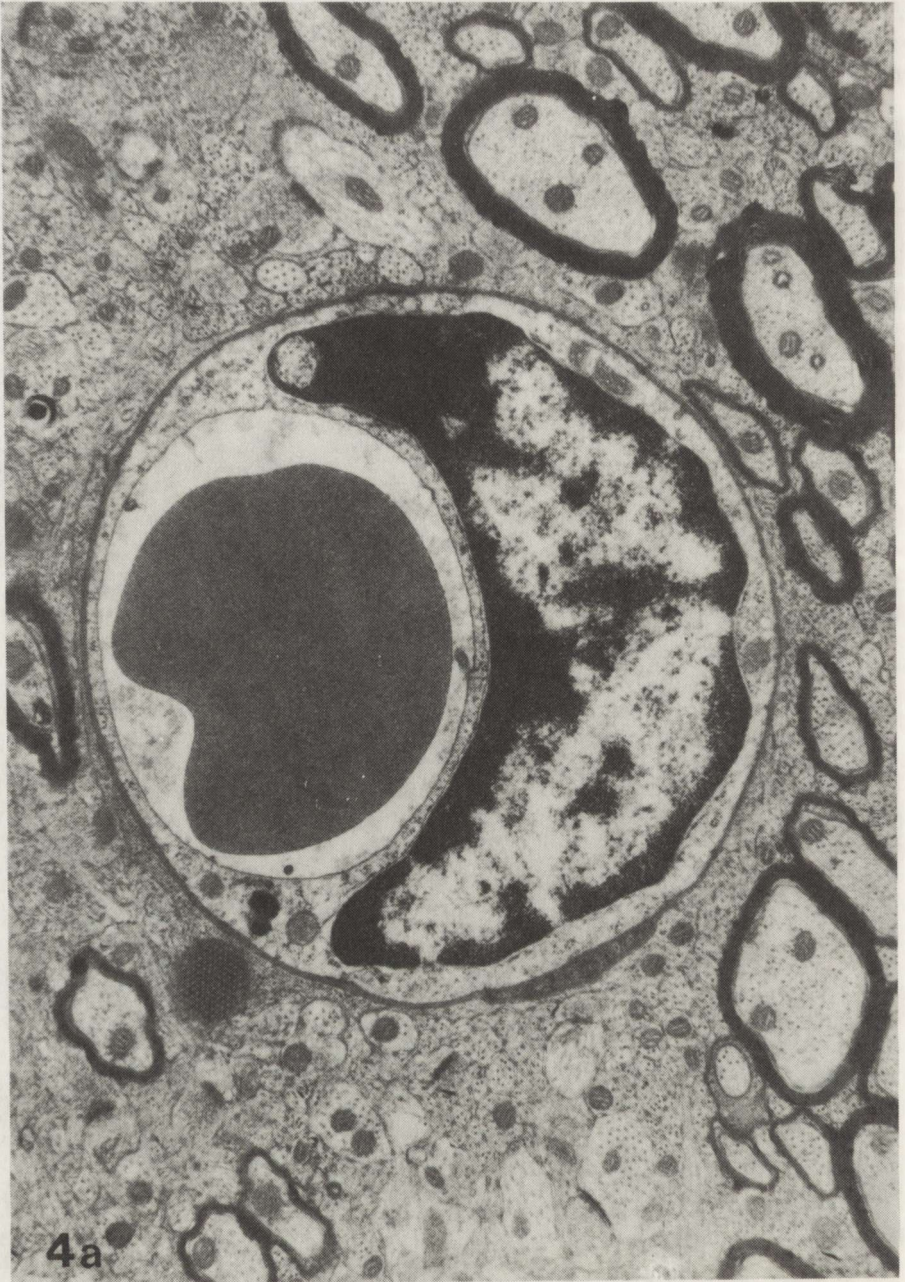


Fig. 4a. Capillary vessel from the frontal cortex of 81-day-old maternal mouse. 7 days of the experiment. Endothelial cytoplasm pale and rarefied. $\times 8000$

Ryc. 4a. Naczynie włosowate w korze czołowej myszy matki, wiek 81 dni, 7 dzień doświadczenia. Błona rozrzedzona cytoplazma komórki śródbłónka. Pow. $8.000 \times$

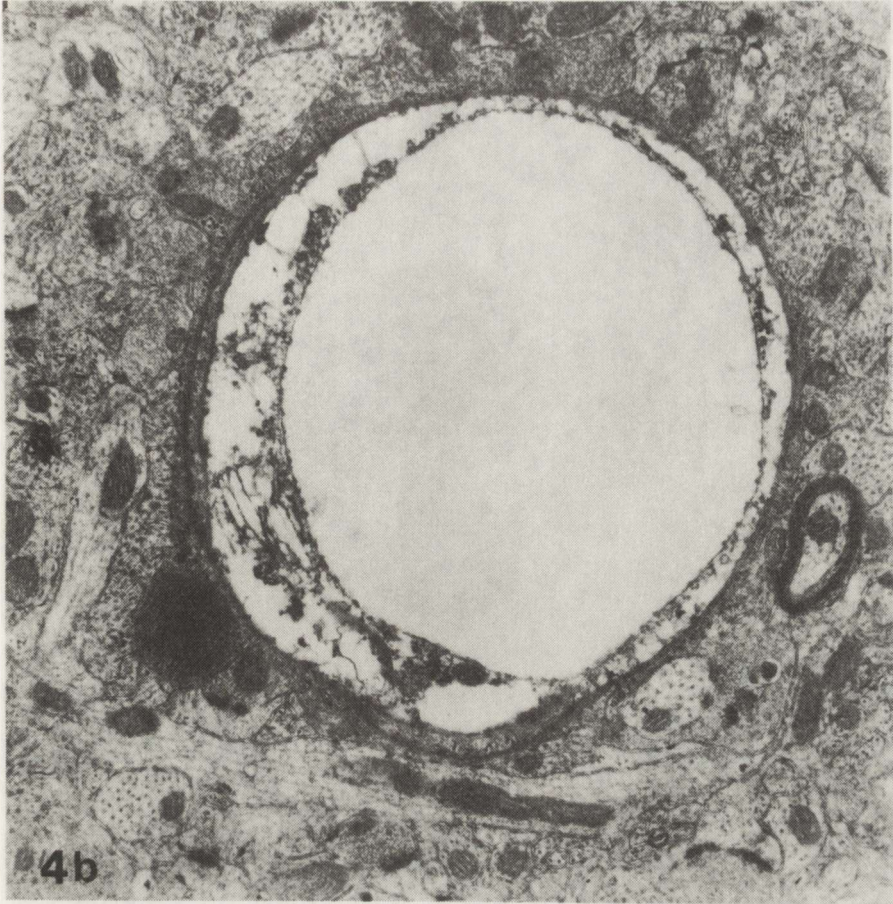


Fig. 4b. Capillary vessel from the frontal cortex of 81-day-old maternal mouse. 7 days of the experiment. Necrotic changes of the endothelial cells, tight junction destroyed. $\times 8800$

Ryc. 4b. Naczynie włosowate w korze czołowej myszy matki, wiek 81 dni, 7 dzień doświadczenia. Zmiany martwicze w śródbłonku, zniszczone połączenie ściste. Pow. $8.800 \times$



Fig. 4c. Capillary vessel from the frontal cortex of 81-day-old maternal mouse, 7 days of the experiment. Necrosis of the endothelial lining. Residues of tight junctions. $\times 8800$

Ryc. 4c. Naczynie włosowate w korze czołowej myszy matki, wiek 81 dni, 7 dzień doświadczenia. Martwica śródbłonna, pozostałości połączeń ścisłych. Pow. $8.800 \times$



Fig. 5. Necrotic endothelial cell, lysosome and myelin-like body in adjacent pericyte. Frontal cortex, maternal mouse 81 day-old, 7 days of the experiment. $\times 20400$

Ryc. 5. Zmiany martwicze w komórce śródbłonna, lizosom i ciało mielinopodobne w przylegającym perycyte. Kora czołowa, mysz matka, wiek 81 dni, 7 dzień doświadczenia. Pow. $20.400 \times$

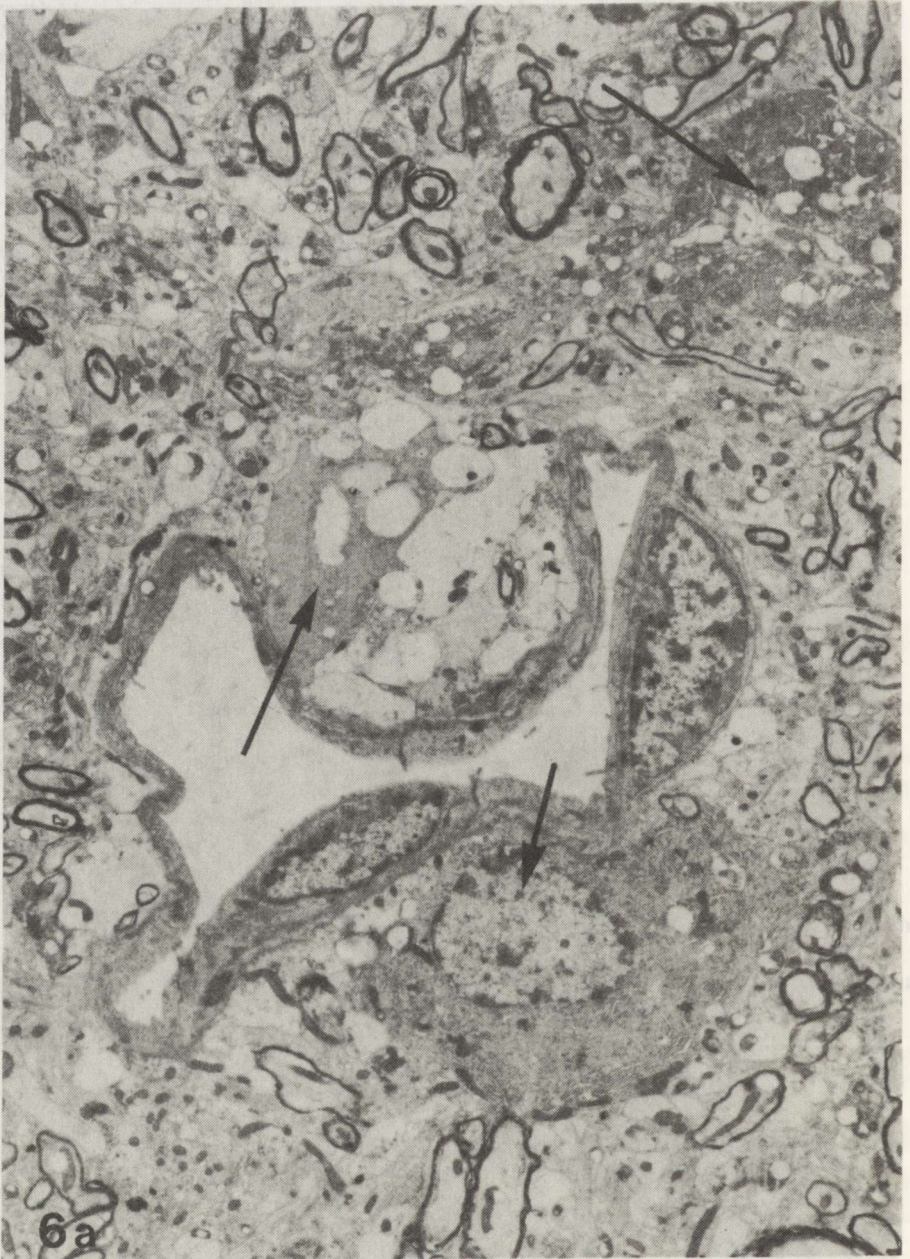


Fig. 6a. Three cells representing phagocytizing glia (arrows) protruding into postcapillary venule lined with intact endothelium. Brain stem, 21-day-old offspring mouse. $\times 2100$

Ryc. 6a. Trzy komórki o cechach gleju żernego (strzałki) wstawiają się do żyły zawłośniczkowej pokrytej prawidłowym śródbłonkiem. Pień mózgu. Mysz potonna, wiek 21 dni. Pow. $2.100 \times$

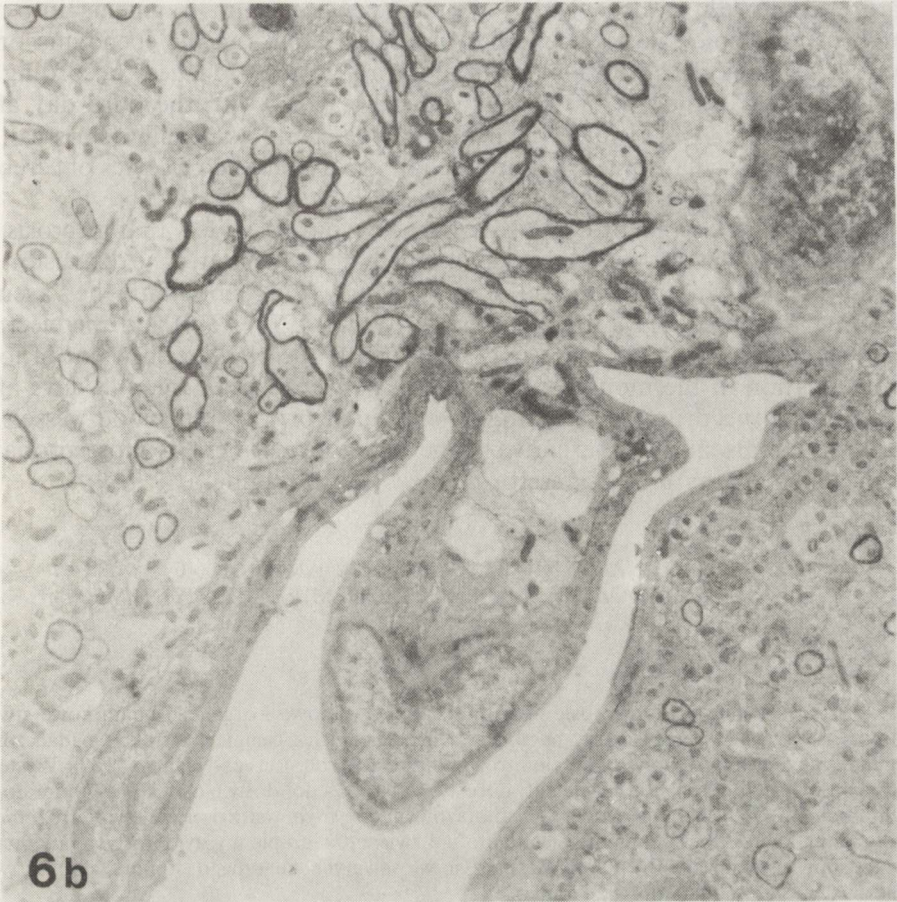


Fig. 6b. Protrusion of cell filled with membrane profiles and amorphous substance into the postcapillary venule. Globus pallidus. 21-day-old offspring mouse. $\times 2100$

Ryc. 6b. Wstawienie się komórki wypełnionej materiałem błoniastym i bezpostaciowym do żyły zawłośniczkowej. Gałka biała. Mysz potomna, wiek 21 dni. Pow. $2.100\times$

DISCUSSION

The presented material gave the opportunity to observe the breakdown products of myelin fibers in the brain vessels of all experimental groups; the debris have been demonstrated in the vascular lumen of 48–300-day-old offspring and in the adult and maternal mice during 7–200 experimental days.

The damage of cerebral capillaries observed in the maternal and adult mice during the first two weeks of the long-lasting experiment suggests that injury of the endothelium is an immediate effect of intravenous ENU injection. In human demyelination diseases such as multiple sclerosis and progressive multifocal leukoencephalopathy the release of breakdown myelin products from the nervous tissue into the cerebrospinal fluid has been demonstrated earlier (Herndon, Kasckow 1978). Fragments of myelin in the cerebrospinal fluid sediment were always extracellular and exhibited a characteristic periodicity. Only those with alternating lines were considered as being of true myelin

nature. The authors believe that the passage of myelin fragments into the cerebrospinal fluid takes place either through a breaks in the ependyma or in the pia and reject the idea of their removal by macrophages. According to Fernando (1973) the myelin is phagocytized starting with the third day after transection of *nervus hypoglossus* in the adult rat and as myelin debris can be found in the vascular lumen, in endothelial cells and in the pericytes of cerebral capillaries as well as in the Kupfer cells.

The results of the present experiment favour the idea that necrosis or transient damage to the endothelial cells might facilitate the extrusion of myelin breakdown products and other nervous tissue debris into the vascular system. Previous observations in the light (Kroh 1976, 1978) and the electron microscope (Kroh, Cervós-Navarro 1983) pointed to the development of focal demyelination in the mouse brain due to ENU not earlier than 48 days after injection of the drug. The finding of myelin debris in the blood vessels of mature animals during the earlier stage of the experiment is most probably connected with natural regressive changes during aging.

ŚRÓDNACZYNIOWE ELEMENTY AKSONALNE W DOŚWIADCZALNYM PROCESIE DEMIELINIZACYJNYM

Streszczenie

Resztki elementów włókien osiowych, tj. osłonki mielinowe i organelle komórkowe stwierdzono w naczyniach mózgu myszy na skrawkach półcienkich i cienkich w trakcie badań zmian demielinizacyjnych pod wpływem etylnitrozomocznika (Kroh, Cervós-Navarro 1983). Występowały one w trzech grupach u 9 zwierząt: dorosłych (48 i 200 dni dośw.), matek (7–70 dni dośw.) i ich potomstwa (48–300 dni dośw.) po jednorazowym dożylnym wstrzyknięciu etylnitrozomocznika (80 mg/kg.m.c.) w 15 dniu ciąży. Ponadto u 4 zwierząt w grupie myszy dorosłych oraz matek stwierdzono uszkodzenie śródbłonek naczyń włosowatych znacznego stopnia, do martwicy włącznie, w 7 i 14 dniu doświadczenia.

Wyniki obserwacji mogą świadczyć o donaczyniowym transporcie rozpadłych elementów włókien osiowych. Uszkodzenie śródbłonek naczyń we wczesnym okresie doświadczenia może ułatwiać ten transport.

REFERENCES

1. Fernando D. A.: Myelin debris in cerebral blood capillaries. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1973, 23, 260–264.
2. Herndon R. M., Kasckow J.: Electron microscopic studies of cerebrospinal fluid sediment in demyelinating disease. *Ann Neurol*, 1978, 4, 515–523.
3. Kroh H.: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Preliminary report. *Neuropatol Pol*, 1976, 14, 115–119.
4. Kroh H.: Multiple demyelinating foci induced with ethylnitrosourea in mouse brain. In: Brain tumors and chemical injuries to the central nervous system. *Proc Int Neuropath Symp.* Ed. M. J. Mossakowski. Pol Med Publ, Warsaw, 1978, 30–36.
5. Kroh H., Cervós-Navarro J.: Transformation of oligodendroglia: a para- or preneoplastic effect of ethylnitrosourea in mouse brain. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 59, 309–315.
6. Kroh H., Luciani A.: The effect of transplacental ethylnitrosourea on the fine structure of the adult mouse brain. I Nerve cell. *Neuropatol Pol*. 1978, 16, 449–460.

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

ELŻBIETA KIDA, EWA MATYJA

DYNAMICS AND PATTERN OF ULTRASTRUCTURAL
ALTERATIONS INDUCED BY QUINOLINIC ACID
IN ORGANOTYPIC CULTURE OF RAT HIPPOCAMPUS

Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Warszawa

Among various excitatory amino acids broadly investigated over the past few years, quinolinic acid (QUIN) aroused special interest due to its particular biological properties. QUIN represents an endogenous amino acid, whose cortical content increases during the aging process (Wolfensberger et al. 1983; Moroni et al. 1984). Regional variations in neuronal sensitivity (Perkins, Stone 1983; Schwarcz, Köhler 1983), selective vulnerability of particular nerve cells even in the same brain area (Schwarcz et al. 1983) and the age-dependent character of QUIN-induced lesions (Foster et al. 1983) were described in earlier studies. QUIN acts *via* selective activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, only one of the three recognized excitatory amino acid receptors, and thus is a major candidate for its endogenous ligand (Stone et al. 1987). However, the QUIN-specific subpopulation of the NMDA postsynaptic receptor, as well as the presence of the presynaptic QUIN receptor are also under consideration (Perkins, Stone 1985; Stone et al. 1987).

QUIN neurotoxicity, like that of other excitatory amino acids, seems to be closely related to its ability to depolarize directly neurons, this resulting in pathological membrane permeability changes and impaired ion homeostasis (Olney et al. 1971; Peters, Choi 1987; Rothman, Olney 1987). Recently, the involvement of the NMDA receptor in evoking brain damage associated with anoxia/ischemia, hypoglycemia, epilepsy and Huntington's disease is widely postulated (Ellison et al. 1987; Rothman, Olney 1987; Stone et al. 1987; Jones 1988). Thus elucidation of the still unclear pathomechanisms of QUIN cytotoxicity and their subsequent prevention might entail important clinical implications and eventually therapeutical approaches.

Morphological studies focused on the pattern of nerve cells injury induced by QUIN are scant, and only few of them include ultrastructural observations. Our previous experiments in organotypic (Kida et al. 1988) and dissociated (Khaspekov et al. 1989) cell culture of hippocampus showed that this structure is especially sensitive to QUIN action *in vitro*. However, in both the tissue culture techniques studied only well differentiated cultures showed morphological abnormalities. The present study was undertaken in order to

establish more precise characteristics of QUIN-induced ultrastructural alterations in the rat hippocampus and the dynamics and pattern of cell damage in the organotypic tissue culture model.

MATERIAL AND METHODS

The hippocampi from 2–3-day-old Wistar rats were dissected out under sterile conditions and cut parasagittally into small slices in Minimal Essential Medium (MEM). Each thin section was then placed on a collagen-coated glass coverslip, covered with two drops of nutrient medium and maintained in Maximow assemblies at 36.5°C. The nutrient medium, renewed twice weekly, consisted of 20% heat-inactivated human serum and 80% MEM (Earle's salts) supplemented with 600 mg% glucose. The cultures were regularly inspected in living state under a light microscope.

On the 21th day of growth *in vitro* (DIV) selected cultures were exposed to QUIN (Sigma) added to the nutrient medium at a concentration of 100 μ M or 1 mM. Sister cultures were grown in standard conditions. The experimental cultures after 2h, 24h and 3 and 7 days of QUIN addition, as well as control cultures were processed for electron microscopy according to routinely used methods. Briefly, the cultures were fixed in 1.5% cold glutaraldehyde for 1h, 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 100B electron microscope.

RESULTS

In the cultures exposed to 1 mM QUIN ultrastructural alterations were seen as early as 2h after QUIN administration, involving both the neuropil and the pyramidal nerve cells. In the neuropil numerous severely swollen dendritic processes were observed (Fig. 1). These profiles contained delicate, fibrillar material, few disarranged microtubules and enlarged mitochondria with disrupted cristae. Some of the dendritic processes or dendritic spines located in the outgrowth zone of the cultures were even more affected and showed focal disruption of protoplasmic membranes. However, not all dendrites underwent ultrastructural changes, and beside distinctly affected dendrites, numerous well preserved dendritic profiles were also found. Axon terminals were unchanged as compared with controls.

Ultrastructural alterations observed in pyramidal neurons 2 h after QUIN addition distinctly varied in intensity and character. In particular areas large clusters of cells were damaged, leaving unaffected only individual cells in between. In other areas haphazardly located damaged neurons, intermingled with well preserved ones were encountered. The most frequently observed changes consisted in prominent swelling of nerve cells perikarya manifesting an electron-lucent appearance. In the swollen cytoplasm only few damaged organelles were seen, such as mitochondria with disrupted or densely packed cristae, enormously dilated and degranulated granular endoplasmic reticulum channels, lipid droplets and small vacuoles. The nuclei in these cells manifested



Fig. 1. Swollen postsynaptic dendritic process (D) and intact axon terminal (A) in culture examined 2 h after 1 mM QUIN. $\times 12000$

Ryc. 1. Obrzmiała postsynaptyczna wypustka dendrytyczna (D) oraz prawidłowo zachowane zakończenie aksonalne (A) w hodowli ocenianej 2 godz. po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 12000 \times

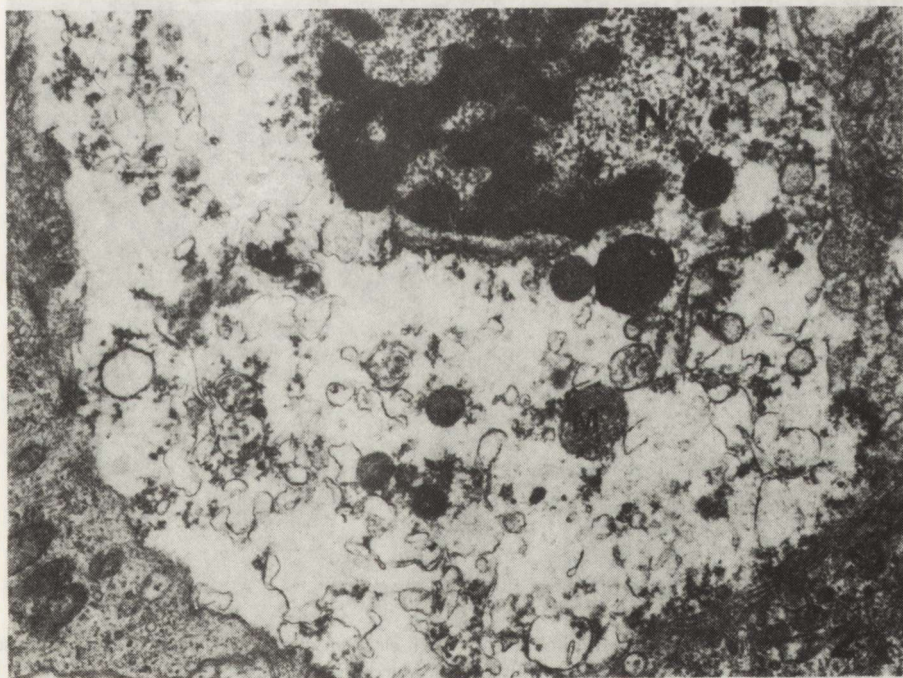


Fig. 2. Severely affected neuron with disintegrated nucleus (N) and damaged organelles including mitochondria (M) in culture examined 2 h after 1 mM QUIN. $\times 6000$

Ryc. 2. Bardzo znacznie uszkodzona komórka nerwowa zawierająca uszkodzone jądro (N) oraz organelle cytoplazmatyczne, w tym mitochondria (M), w hodowli ocenianej 2 godz. po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 6000 \times

clumping of chromatin and splitting or disruption of the nuclear envelope. In some cells disintegration of the organelles was even more pronounced (Fig. 2). Less frequently seen were pyramidal neurons containing numerous vacuoles in the cytoplasm, but usually intact other organelles (Fig. 3). In individual cells vacuoles formed by dilated profiles of granular endoplasmic reticulum channels and condensation of the cell cytoplasm were observed. In particular pyramidal neurons, sometimes in basket cells, the number of mitochondria was increased. They were usually large, with electron-transparent matrix and short cristae (Fig. 4). Glia showed no distinct pathology. Neurons manifesting the severe alterations described above, were not observed in cultures examined 24 h after QUIN addition. However, similar neuronal abnormalities with severe swelling of the cell cytoplasm and clumping of nuclear chromatin could be found in cultures exposed to lower QUIN concentration (100 μ M), but at later periods, 24 h after QUIN administration. In some of the swollen neurons the organelles, usually severely damaged, were accumulated in the perinuclear area (Fig. 5). The remaining cytoplasm was devoid of organelles, had an electron-lucent appearance or contained delicate, fibrillar material. The nucleus showed clumping of chromatin and disruption of the nuclear envelope. In other affected, swollen nerve cells the cytoplasm contained numerous membraneous structures, patches of electron-dense material and few severely damaged

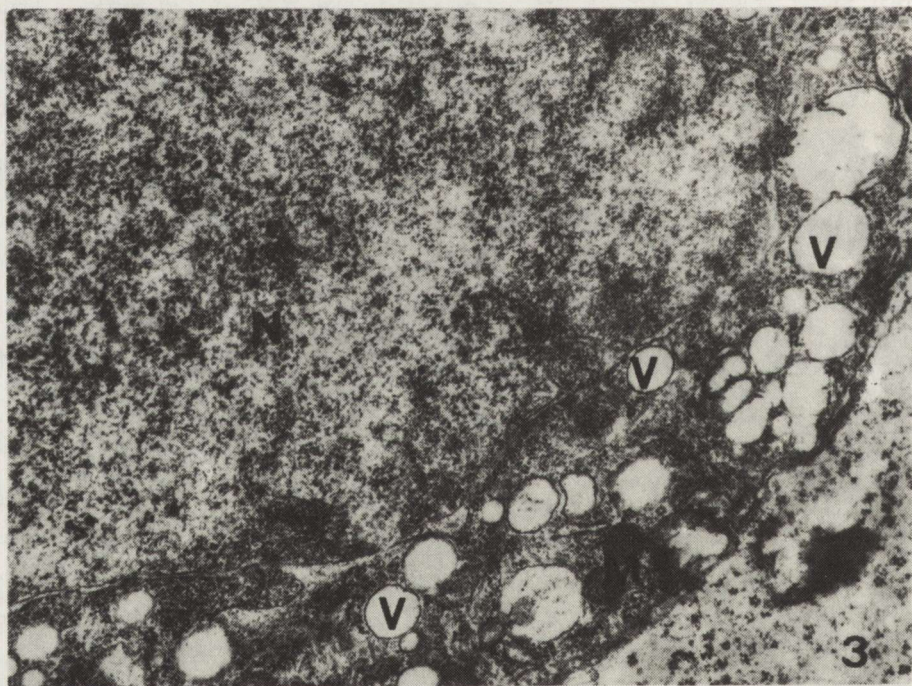


Fig. 3. Numerous vacuoles (V) and mitochondria with electron dense matrix (M) in the condensed cytoplasm of a nerve cell (N) in culture examined 2 h after 1 mM QUIN. $\times 9000$

Ryc. 3. Liczne wakuole (V) oraz mitochondria o gęstej elektronowo macierzy (M) w cytoplazmie komórki nerwowej (N), 2 godz. po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

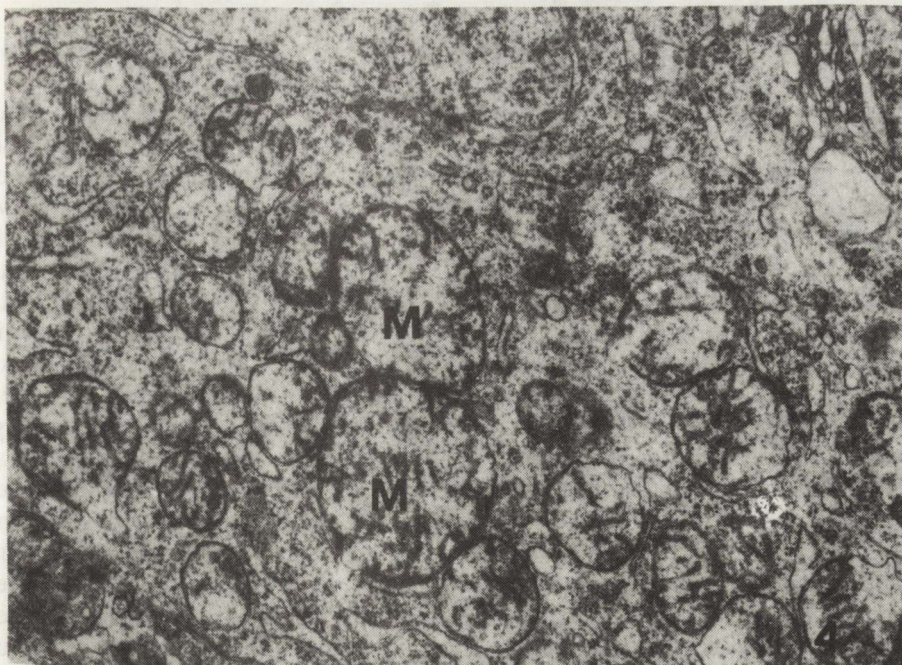


Fig. 4. Increased number of large mitochondria (M) with light matrix and short cristae in basket neuron in culture 2 h after 1 mM QUIN. $\times 9000$

Ryc. 4. Zwiększona ilość dużych mitochondriów (M) o jasnej macierzy i krótkich grzebieniach w neuronie wstawkowym w hodowli 2 godz. po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

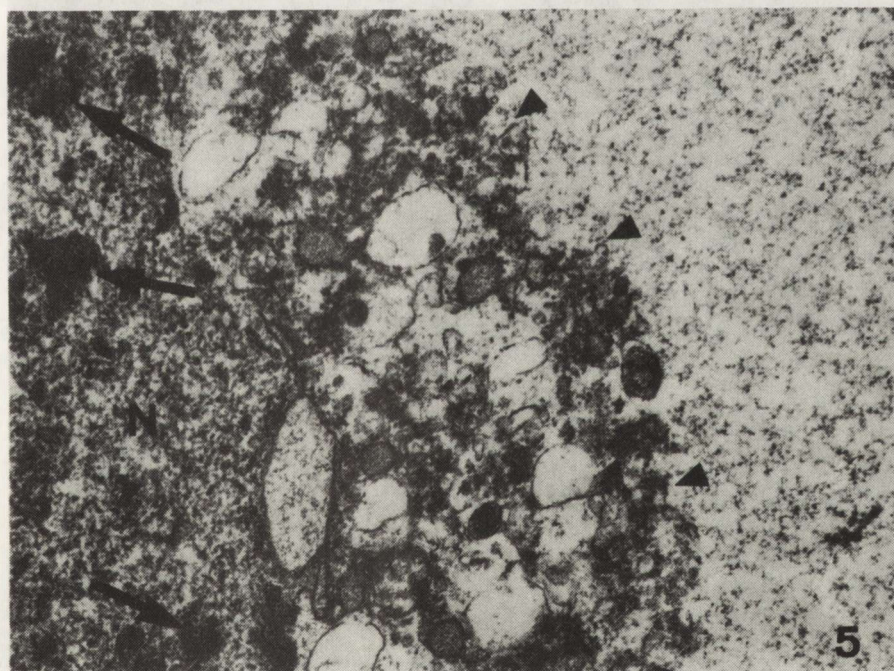


Fig. 5. Swollen nerve cell. Nucleus (N) with clumping of chromatin (arrows). Destroyed organelles accumulated in the perinuclear area (arrow heads). Culture examined 24 h after 100 μ M QUIN. $\times 9000$

Ryc. 5. Obrzmiały neuron z uszkodzonym jądrem (N) zawierającym zbite grudki chromatyny (strzałki) oraz uszkodzonymi organellami cytoplazmatycznymi zgrupowanymi wokół jądra (groty strzałek). Hodowla 24 godz. po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

organelles. The axon terminals contacting these cells were undamaged, however beneath the postsynaptic membrane accumulation of electron-dense, floccular material was observed. The process of nerve cells damage was not widespread, and even in the close proximity of severely affected neurons, nerve cells with intact ultrastructure could be found. In the same culture, nerve cells manifesting vacuolation of the cytoplasm were also seen more frequently than in the cultures exposed to higher QUIN concentration. Some of these cells, apart from the vacuoles, showed moderately dilated granular endoplasmic reticulum profiles, slightly swollen mitochondria and some lipid droplets of high electron density, but with intact nucleus (Fig. 6). In other cells however, a condensation of the cell cytoplasm giving a dark appearance was seen (Fig. 7). In some areas, some sporadic cells showed advanced vacuolar degeneration (Fig. 8). Dendritic alterations were still present. In many swollen dendrites accumulation of electron-dense floccular material and vacuoles with granular content were seen (Fig. 9). Axon terminals showed no alterations. Apart from the above mentioned neuronal alterations, in the cultures examined 24 h after both QUIN concentrations studied, particular nerve cells showed milder cytoplasmic abnormalities including swelling of the cell soma, but without distinct nuclear alterations, focal diminution of polyribosomes in the cyto-

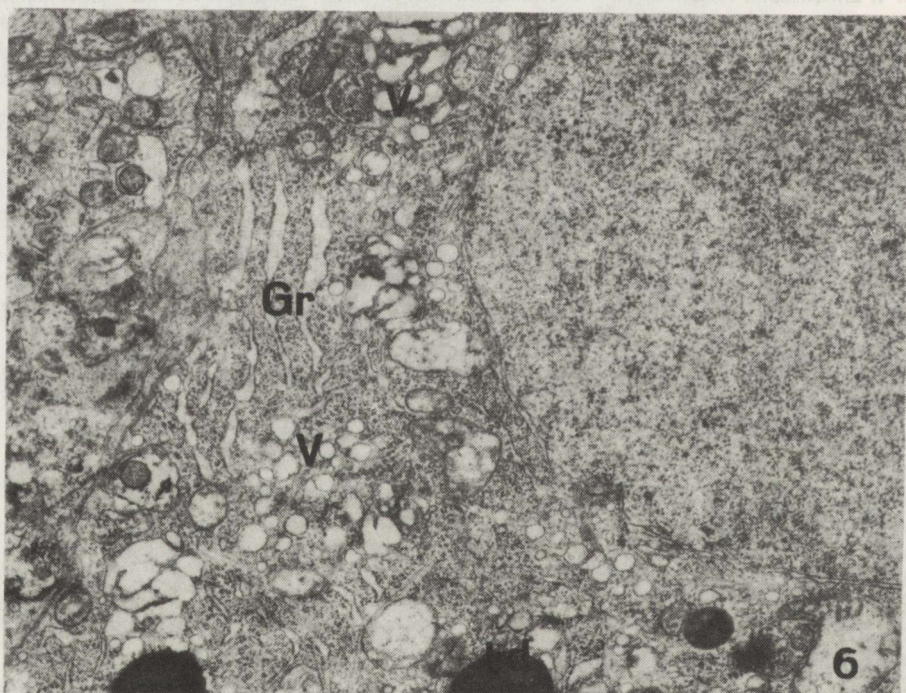


Fig. 6. Numerous vacuoles (V), slightly dilated profiles of granular endoplasmic reticulum (Gr) and lipid droplets (Ld). Pyramidal neuron examined 24 h after 100 μ M QUIN. \times 9000

Ryc. 6. Liczne wakuole (V), nieznacznie poszerzone kanały ziarnistej siatki śródplazmatycznej (Gr) i krople tłuszczu (Ld) w cytoplazmie neuronu piramidowego, 24 godz. po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

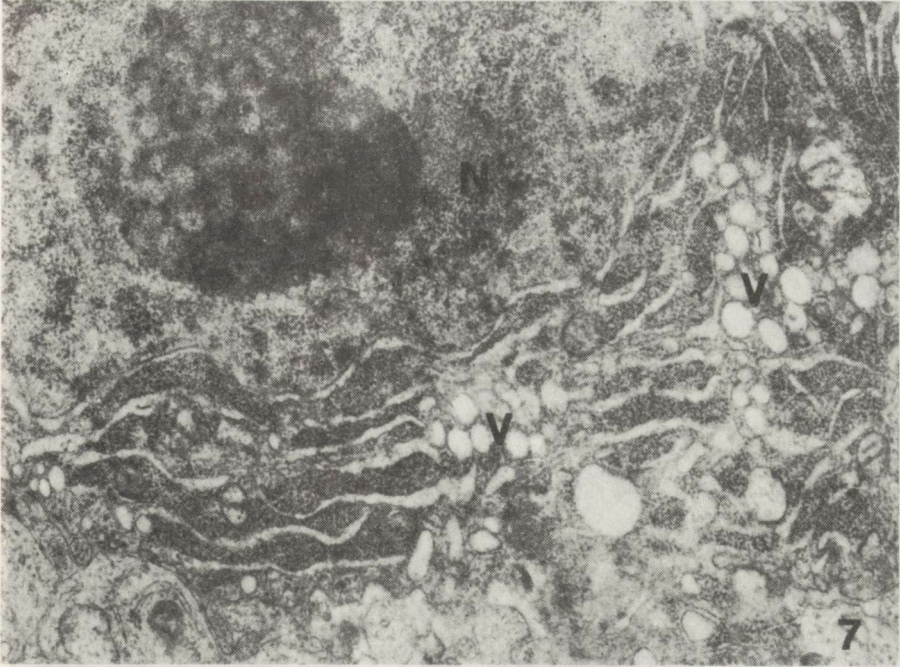


Fig. 7. More pronounced alteration of a nerve cell. Numerous vacuoles (V), condensed cytoplasm. Culture 24 h after 100 μ M QUIN. \times 9000

Ryc. 7. Bardziej nasilone zmiany zwyrodnieniowe komórki nerwowej z licznymi wakuolami (V) i kondensacją cytoplazmy w hodowli 24 godz. po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

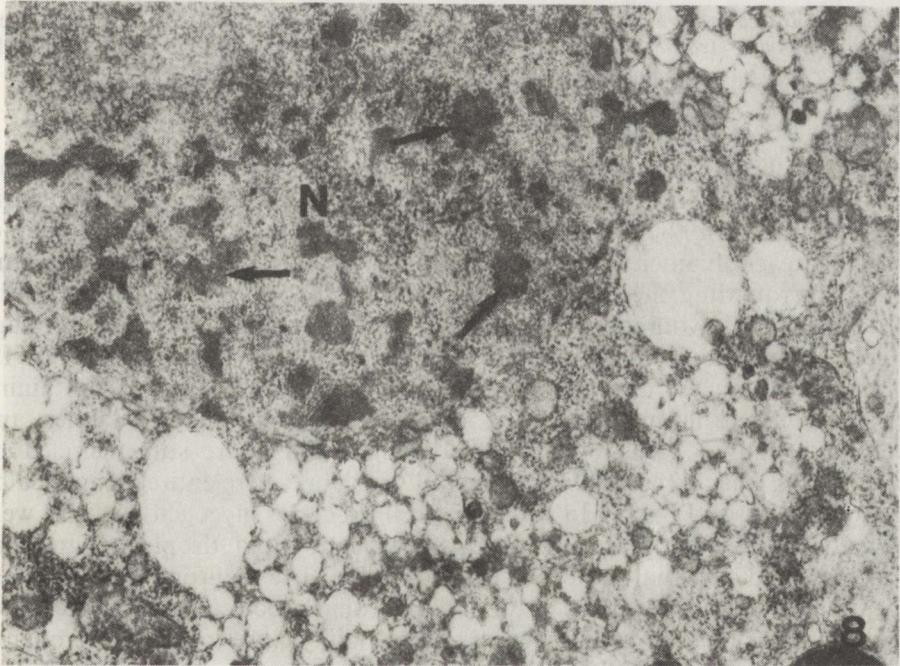


Fig. 8. Vacuolar degeneration of nerve cell. Nucleus (N) with small clumps of nuclear chromatin (arrows). Culture 24 h after 100 μ M QUIN. \times 9000

Ryc. 8. Zwyrodnienie wodniczkowe komórki nerwowej. Uszkodzone jądro (N), z drobnymi skupieniami chromatyny jądrowej (strzałki). Hodowla 24 godz. po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

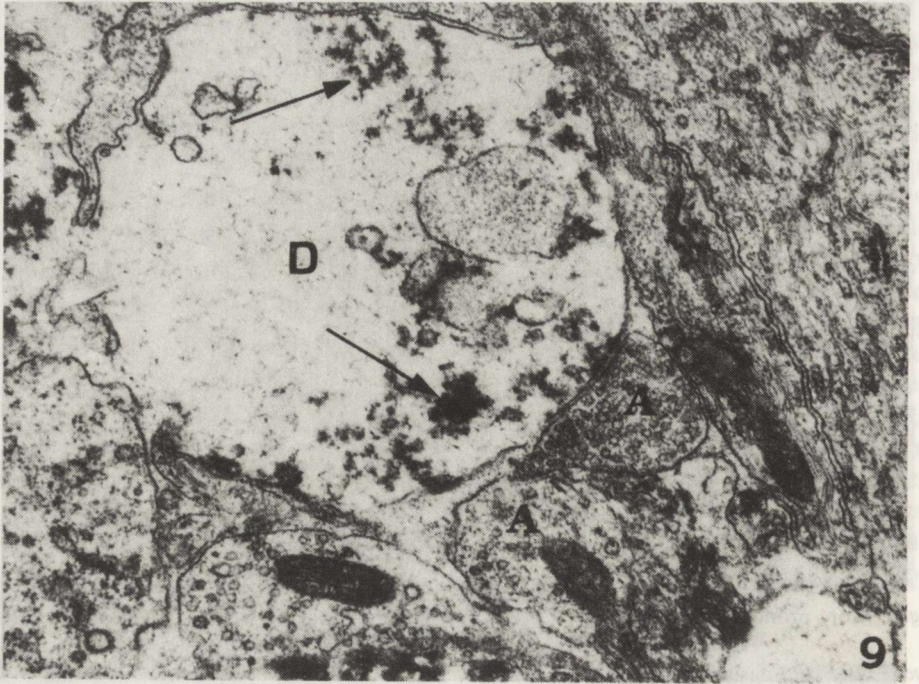


Fig. 9. Damaged postsynaptic dendrites (D) with patches of floccular material (arrows) and intact axon terminals (A) in culture 24 h after 100 μ M QUIN. \times 12000

Ryc. 9. Uszkodzone postsynaptyczne zakończenie dendrytyczne (D) zawierające skupienia kłaczkowatego materiału (strzałki) oraz nieuszkodzone zakończenie aksonalne (A) w hodowli 24 godz. po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 12000 \times

plasm, mitochondrial swelling or their increased number. Protoplasmic astrocytes showed no abnormalities, except for mild swelling of the cytoplasm in individual cells. In the fibrous astrocytes however, an increased number of intermediate gliofilaments was found, which in some cells formed abundant bundles surrounding the nucleus or filling large spaces of the cytoplasm (Fig. 10). On the following days of observation the process of tissue damage proceeded and in cultures examined three days after exposure to QUIN remnants of damaged and disintegrated nerve cells were observed containing membraneous structures, vacuoles, lipid droplets, granular vacuoles and myelin-like figures. The fragments of damaged cells were still encircled by a continuous plasma membrane. Some cellular debris were entirely engulfed by glial cell processes (Fig. 11). In some glial cell processes glycogen particles were observed. In the cytoplasm of fibrous astrocytes lipid droplets, numerous lysosomes and residual bodies were observed. The neuropil had a loose appearance due to the reduced number of neuronal processes as compared with controls. Macrophages were frequently seen, mainly close to the cell remnants. A similar pattern of tissue damage was seen in the cultures examined 7 days after QUIN addition. The number of surviving neurons was considerably higher in the cultures exposed to lower QUIN concentrations. In the close

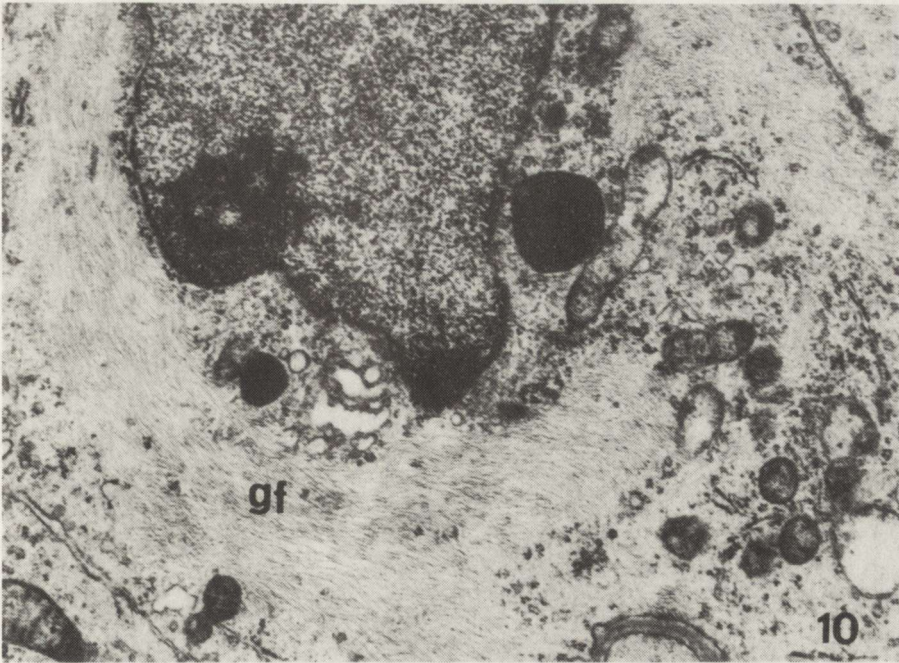


Fig. 10. Fibrous astrocyte filled with numerous bundles of gliofilaments (gf) in culture 24 h after 100 μ M QUIN. \times 9000

Ryc. 10. Astrocyt włóknisty zawierający liczne pęczki pośrednich gliofilamentów (gf) w hodowli 24 godz. po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

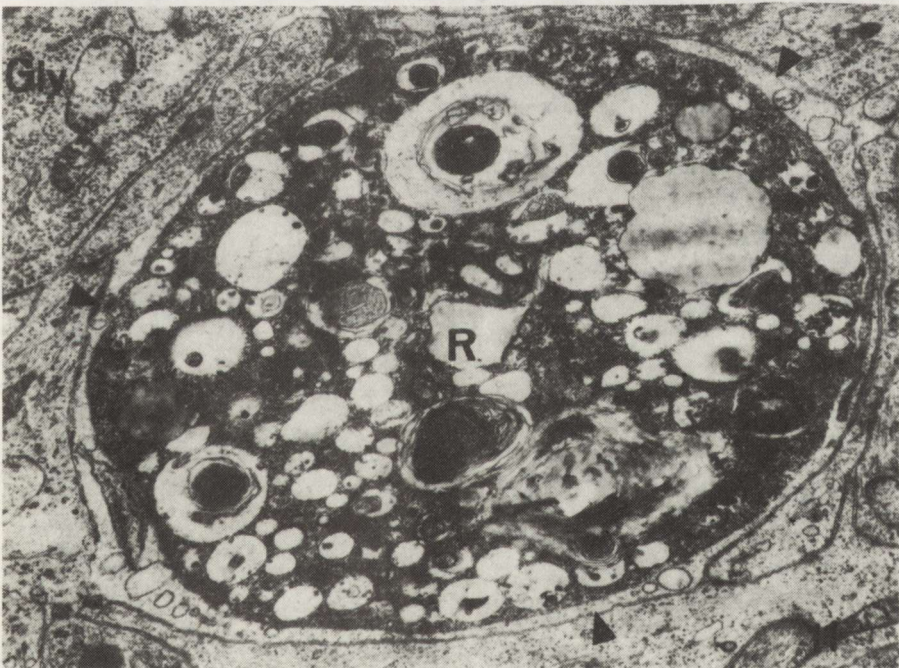


Fig. 11. Remnants of nerve cell (R) engulfed by glial cell process (arrow heads). Glycogen particles in the adjacent glial process (Gly). Culture examined 3 days after 1 mM QUIN. \times 9000

Ryc. 11. Resztki rozpadłej komórki nerwowej (R) wtopione w wypustkę glejową (groty strzałek). Ziarna glikogenu w wypustce glejowej (Gly). Hodowla 3 dni po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

proximity of damaged neurons macrophages and astrocytes could be seen (Fig. 12). However, close to severely damaged neurons well preserved pyramidal nerve cells could still be observed (Fig. 13). Numerous fibrous astrocytes displayed reactive changes consisting in abundant cytoplasm with well developed Golgi apparatus, numerous ribosomes and lysosomes filled with granular material, membrane-bound lipid droplets of different electron density and residual bodies. It is noteworthy that, besides cell remnants or nerve cells showing vacuolar degeneration, individual severely swollen neurons with damaged organelles and nucleus could be occasionally found. Some of these cells were surrounded or invaded by fibrous astrocyte processes (Fig. 14). In the

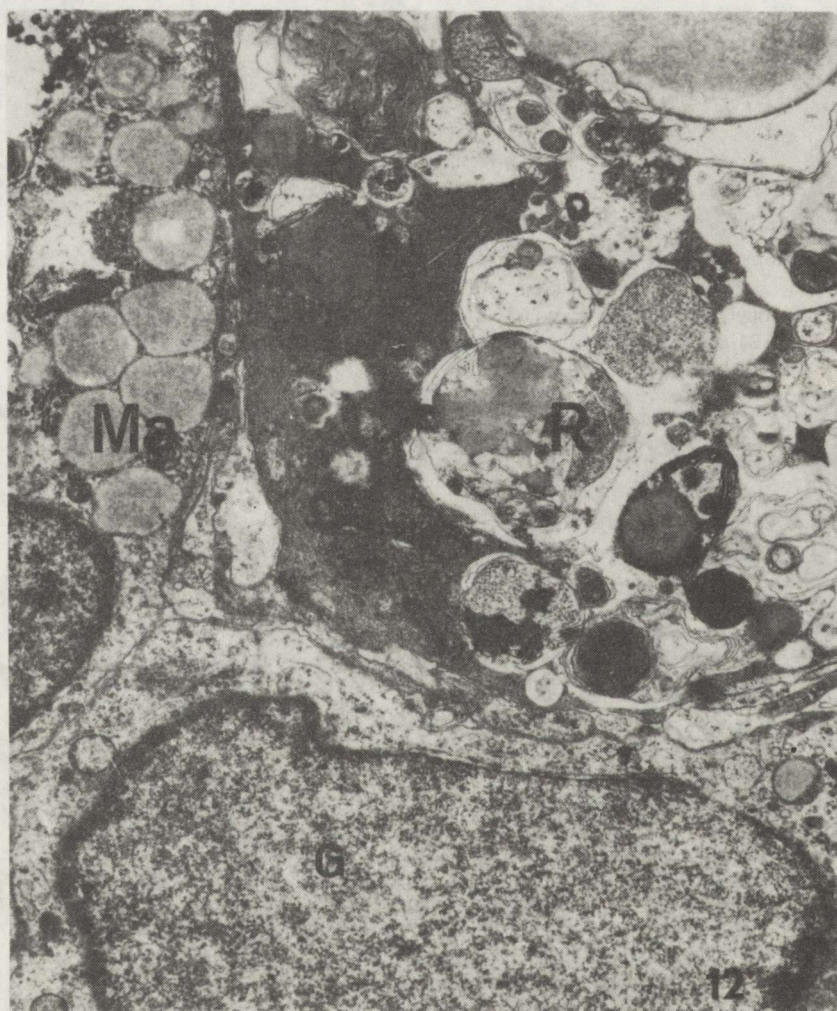


Fig. 12. Remnants of nerve cell (R), macrophage (Ma) and astrocyte (G) in culture examined 7 days after 1 mM QUIN. $\times 9000$

Ryc. 12. Resztki zwyrodniałej komórki nerwowej (R), makrofag (Ma) oraz astrocyt włóknisty (G) w hodowli 7 dni po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times

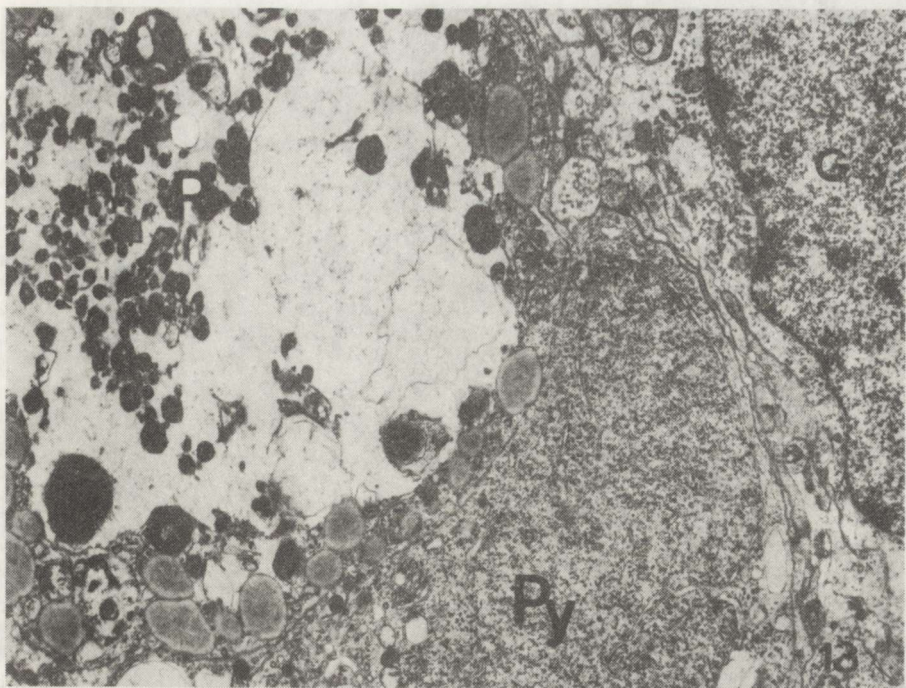


Fig. 13. Remnants of nerve cell (R) adjacent to intact pyramidal nerve cell (Py). Protoplasmic astrocyte in their proximity (G). Culture 7 days after 1 mM QUIN. $\times 6000$

Ryc. 13. Resztki komórki nerwowej (R) przylegającej do prawidłowo zachowanego neuronu piramidowego (Py). W pobliżu widoczny astrocyt protoplazmatyczny (G). Hodowla 7 dni po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 6000 \times

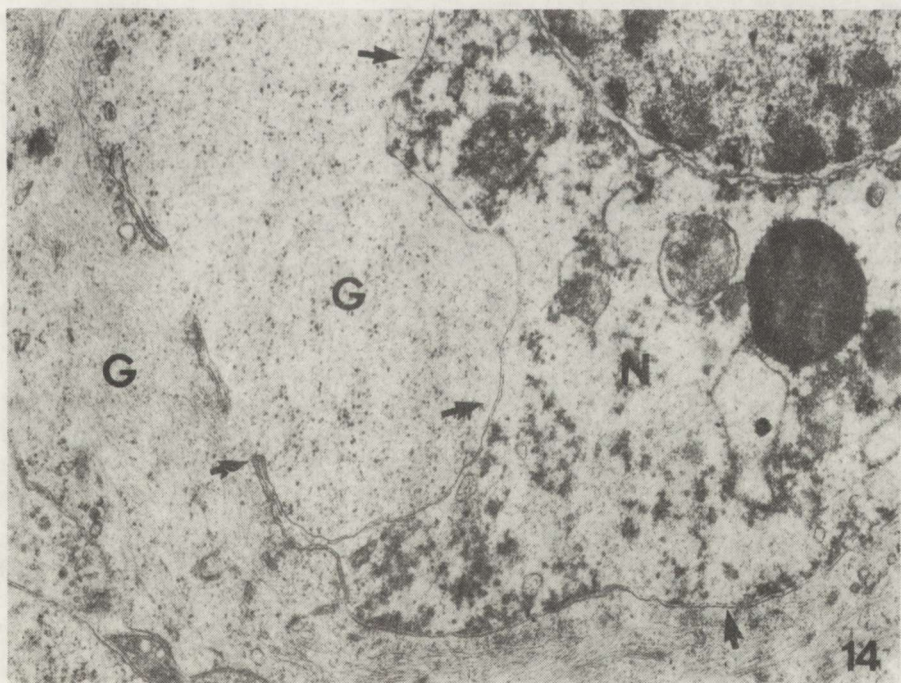


Fig. 14. Severely damaged nerve cell (N) invaded (arrows) by astrocytic processes (G) in culture examined 7 days after 100 μ M QUIN. $\times 9000$

Ryc. 14. Ciężko uszkodzona komórka nerwowa (N) otoczona (strzałki) przez wypustki gleyowe (G) w hodowli 7 dni po podaniu 100 μ M kwasu chinolinowego. Pow. 9000 \times



Fig. 15. Basket cell with rod-like intranuclear inclusion (arrows) and well preserved dendritic profile (D). In the compact neuropil paucity of axons and dendrites (A,D—respectively) and increased number of glial processes (G). Culture examined 7 days after 1 mM QUIN. $\times 6000$
Ryc. 15. Neuron wstawkowy z wtrętem wewnątrzjądrowym (strzałki) oraz prawidłowo zachowanym dendrytem (D). W neuropilu nieliczne aksony i dendryty (A,D—odpowiednio) oraz zwiększona ilość wypustek glijowych (G). Hodowla 7 dni po podaniu 1 mM kwasu chinolinowego. Pow. 6000 \times

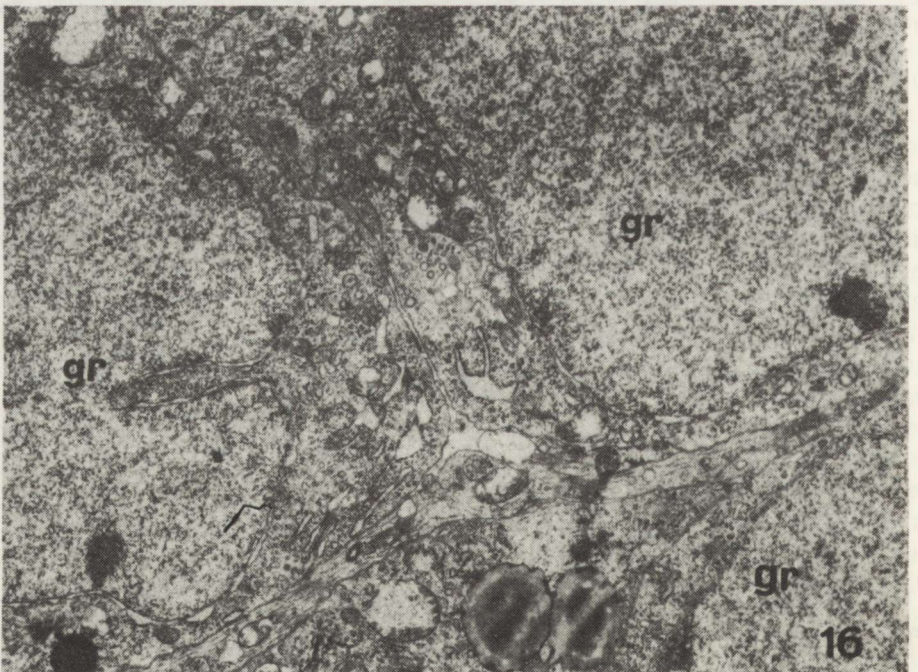


Fig. 16. A cluster of intact granule (gr) cells in culture examined 7 days after 100 μM QUIN. $\times 6000$
Ryc. 16. Skupienie nieuszkodzonych komórek ziarnistych (gr) w hodowli 7 dni po podaniu 100 μM kwasu chinolinowego. Pow. 6000 \times

neuropil swollen dendrites were not present, but some postsynaptic processes were condensed and containing small vacuoles and swollen mitochondria. Axon terminals contacting them disclosed no abnormalities. The neuropil had a more compact appearance, due mainly to the increased number of glial cell processes. Nerve cells processes and synaptic junctions paucity as compared to controls was evident.

In all experimental groups, at various timepoints after QUIN administration, numerous nerve cells corresponding to basket cells (Fig. 15), as well as granule cells (Fig. 16) showed an unchanged ultrastructure.

DISCUSSION

Previously performed experiments disclosed two main types of morphological changes occurring in nerve cells in response to various excitotoxin action: acute excitotoxic neuronal swelling and late cells injury leading to dark cell vacuolar degeneration (Olney et al. 1986; Rothman, Olney 1987). Acute neuronal swelling is attributed to receptor activation and subsequent membrane depolarization, abnormal influx to the cell of sodium, chloride and water (Rothman 1985; Olney et al. 1986). However, this pathomechanism appears not to be responsible for irreversible cell damage, because even when sodium is removed from the environment and no acute swelling develops, over the next few hours neurons gradually degenerate (Choi 1987). Neuronal cells degeneration is accounted for to excessive calcium influx to the cell through voltage-dependent channels, but mostly, after opening of NMDA activated channels with high intrinsic calcium permeability (Choi et al. 1988). However, if swelling of the cell persists for many minutes it may produce irreversible damage even in the absence of extracellular calcium (Rothman, Olney 1987). Quinolinic acid was shown to be a weak excitant of cortical neurons in cell culture, only at higher concentrations (above 2 mM) producing consistent depolarizations (Peters, Choi 1987). Cortical and cortex-caudate organotypic cultures exposed to 100 μ M and 1 mM QUIN manifested postsynaptic changes only after 12 h of incubation, perikaryal abnormalities being limited to dilatations of the Golgi apparatus exclusively (Whetsell, Schwarcz 1983). The results of our present study, as well as of our previous experiments indicate that, in contrast to neocortical or striatal cultures, hippocampal cultures are specially sensitive to the action of QUIN. We observed pyramidal nerve cell alterations and dendritic damage as early as 2 h after 1 mM QUIN administration. These changes appearing at early stages of observation included not only acute neuronal swelling, but concomitant severe destruction of the organelles and nucleus. The intensity of morphological changes and mostly nuclear disintegration observed determine their irreversible character. This type of neuronal alterations distinctly predominated in our cultures at the early (up to 24 h) stages of observation, independently of QUIN concentrations examined. These changes greatly outnumbered other ultrastructural abnormalities, including, rather rarely disclosed, especially after higher QUIN doses, vacuolar cell degeneration. The hippocampus and especially its CA₁ region represents a brain area with the highest levels of NMDA receptors in the entire brain (Cotman et al. 1987). Since QUIN neurotoxicity is attributed to NMDA

receptor activation, it seems that the high vulnerability of the hippocampus to QUIN established in our cultures may be related to this phenomenon.

Another noteworthy observation is the occurrence in the cultures examined 7 days after QUIN addition of severely swollen neurons with damaged organelles and nucleus, rather typical for early QUIN cell injury. These severely affected neurons appeared in the cultures without direct QUIN participation, as the neurotoxin was eliminated earlier from the environment following medium changes. Thus, it seems that once initiated, the process of tissue destruction may proceed, even in the absence of neurotoxin in the environment. This is consistent with the recently proposed hypothesis, that intracellular pools of NMDA agonists may be released into the environment and with time feed back to the neuronal NMDA receptor producing progressive neuronal injury (Choi et al. 1988).

It is, moreover, of interest that beside intact granule cells rather resistant to QUIN, numerous well preserved basket cells were seen even 7 days after QUIN addition. Does this result from specific tissue culture conditions and lack of their afferent connection, or alternatively reflect their resistance to QUIN, remains to be elucidated by future experiments.

The response of the glia in our cultures consisted of a distinctly increased number of gliofilaments in the cell somata and processes, demonstrated in previous studies after various tested excitotoxins (Renkawek, Matyja 1982; Björklund et al. 1986). Moreover, in our cultures numerous fibrous astrocytes manifesting reactive changes were observed. The relation of the glial changes to neuronal damage is still unclear, however there are suggestions of their important interactions. Astrocytes actively participate in the brain metabolism of QUIN, as they contain both its synthesizing and degrading enzymes (Köhler et al. 1988). Moreover, recent experiments showed that, following excitotoxin brain lesion and concomitant proliferation of astrocytes, the prominent observed increase in enzymes synthesizing QUIN, might even result in an increase of the amount of QUIN, and subsequently in progressive nerve cell loss (Spaciale et al. 1987).

CHARAKTER I DYNAMIKA USZKODZEŃ ULTRASTRUKTURALNYCH WYWOŁANYCH PRZEZ KWAS CHINOLINOWY W ORGANOTYPOWEJ HODOWLI HIPOKAMPA SZCZURA

Streszczenie

Celem pracy była ocena dynamiki narastania oraz charakteru uszkodzeń strukturalnych wywoływanych w organotypowej hodowli hipokampa szczura przez kwas chinolinowy, endogenny aminokwas o właściwościach neurotoksycznych. Kwas chinolinowy podawano jednorazowo w stężeniu 100 μ M oraz 1 mM do środowiska odżywczego 21-dniowych hodowli hipokampa, które następnie po odpowiednim utrwaleniu oceniano po 2 i 24 godz. oraz 3 i 7 dniach w mikroskopie elektronowym. Przeprowadzone badania wykazały pojawianie się uszkodzeń zakończeń postsynaptycznych oraz uszkodzeń strukturalnych neuronów piramidowych już po 2 godz. od podania związku, jak też wczesny, obserwowany po 24 godz. odczyn glejowy w postaci nagromadzenia włókienek glejowych w cytoplazmie i wypustkach astrocytów włóknistych. Stwierdzono ponadto selektywny charakter uszkodzeń neuronalnych, zaoszczędzenie wielu komórek wstawkowych i ziarnistych. Obserwowano ponadto pojawianie się uszkodzeń strukturalnych

poszczególnych neuronów piramidowych w hodowlach ocenianych 7 dni po podaniu kwasu chinolinowego, wówczas gdy neurotoksyna została usunięta ze środowiska odżywczego poprzez uprzednią zmianę medium. To ostatnie sformułowanie sugeruje, że proces patologiczny może przebiegać dalej, pomimo eliminacji związku toksycznego ze środowiska, prowadząc do narastania uszkodzeń strukturalnych zapoczątkowanych podaniem neurotoksyny.

REFERENCES

1. Björklund H., Olson L., Dhal D., Schwarcz R.: Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res*, 1986, 371, 267–277.
2. Choi D. W.: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1987, 7, 369–379.
3. Choi D. W., Koh J., Peters S.: Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation of NMDA antagonists. *J Neurosci*, 1988, 8, 185–196.
4. Cotman C. W., Monaghan D. T., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J.: Anatomical organization of excitatory amino acids receptors and their pathways. *Trends Neurosci*, 1987, 10, 273–279.
5. Ellison D. W., Beal M. F., Mazurek M. F., Malloy J. R., Bird E. D., Martin J. B.: Amino acid neurotransmitter abnormalities in Huntington's disease and the quinolinic acid animal model of Huntington's disease. *Brain*, 1987, 110, 1657–1673.
6. Foster A. C., Collins J. F., Schwarcz R.: On the excitotoxic properties of quinolinic acid, 2,3-piperidine dicarboxylic acids and structurally related compounds. *Neuropharmacology*, 1983, 22, 1331–1342.
7. Jones R. S. G.: Epileptiform events induced by GABA-antagonists in entorhinal cortical cells *in vitro* are partially mediated by N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res*, 1988, 457, 113–121.
8. Khaspekov L., Kida E., Victorov I., Mossakowski M. J.: Neurotoxic effect induced by quinolinic acid in dissociated cell culture of mouse hippocampus. *J Neurosci Res*, 1989, 22, 150–157.
9. Kida E., Matyja E., Khaspekov L.: The ultrastructure of rat hippocampal formation in organotypic tissue culture after exposure to quinolinic acid. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 507–520.
10. Köhler C., Eriksson L. G., Flood P. R., Hardie J. A., Okuno E., Schwarcz R.: Quinolinic acid metabolism in the rat brain. Immunohistochemical identification of 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase in the hippocampal region. *J Neurosci*, 1988, 8, 975–987.
11. Moroni F., Lombardi G., Moneti G., Aldinio C.: The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett*, 1984, 47, 51–56.
12. Olney J. W., Ho O. L., Rhee V.: Cytotoxic effects of acidic and sulphur amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res*, 1971, 14, 61–76.
13. Olney J. W., Price M. T., Samson L., Labruyere J.: The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett*, 1986, 65, 65–71.
14. Perkins M. N., Stone T. W.: Quinolinic acid: regional variations in neuronal sensitivity. *Brain Res*, 1983, 259, 172–176.
15. Perkins M. N., Stone T. W.: Actions of kynurenic acid and quinolinic acid in the rat hippocampus *in vivo*. *Exp Neurol*, 1985, 88, 570–579.
16. Peters S., Choi D. W.: Quinolinic acid is a weak excitant of cortical neurons in cell culture. *Brain Res*, 1987, 420, 1–10.
17. Renkawek K., Matyja E.: Glial fibrillary changes induced by kainic acid in organotypic culture of the rat cerebellum and striatum. IXth Intern. Congress Neuropathology, Abstr., 1982, p. 44.
18. Rothman S. M.: The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci*, 1985, 5, 1483–1490.
19. Rothman S. M., Olney J. W.: Excitotoxicity and the NMDA receptor. *Trends Neurosci*, 1987, 10, 299–302.
20. Schwarcz R., Köhler C.: Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci Lett*, 1983, 38, 85–90.

21. Schwarcz R., Whetsell W. O., Mangano R. M.: Quinolinic acid—an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983, 219, 316—318.
22. Spaciale C., Okuno E., Schwarcz R.: Increased quinolinic acid metabolism following neuronal degeneration in the rat hippocampus. *Brain Res*, 1987, 436, 18—24.
23. Stone T. W., Connick J. H., Winn P., Hastings M. H., English M.: Endogenous excitotoxic agents. In: *Selective neuronal death*. Eds.: G. Bock, M. O'Connor, Ciba Foundation Symposium 126. J. Wiley, Chichester, 1987, 204—214.
24. Whetsell W. O., Jr., 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 Transmission*, 1983, Supp. 19, 53—63.
25. Wolfensberger M., Amsler U., Cuenod M., Foster A. C., Whetsell W. O., Schwarcz R.: Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett*, 1983, 41, 247—252.

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

MAREK PIETRZAK

WPLYW CCNU (LOMUSTINE) NA NEUROSEKRECJĘ JĄDER PODWZGÓRZA I NERWOWEJ CZĘŚCI PRZYSADKI SZCZURA WE WCZESNYM OKRESIE ROZWOJU POZAMACICZNEGO

Klinika Neurologii Rozwojowej,
Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań

Działanie CCNU – 1-(2-chloroetylo)-3-cykloheksylnitrozomocznika polega głównie na alkilacji nukleotydów komórkowego DNA i RNA (Cheng i wsp. 1972; Goth, Rajewsky 1972; Jensen, Reed 1978). Efektem nadmiernej alkilacji kwasów nukleinowych jest zahamowanie oraz powstawanie błędów w replikacji i transkrypcji DNA. Związek ten działa również na cząsteczki białka poprzez karbamyłację aminokwasów (Heal i wsp. 1979; Sudhaker i wsp. 1979). Ze względu na dobrą rozpuszczalność w lipidach i łatwe przenikanie do płynu mózgowo-rdzeniowego i mózgu lek ten znajduje zastosowanie w neuro-onkologii (Oliveiro i wsp. 1970; Walker, Hilton 1976). Wykazuje przy tym tendencję do gromadzenia się w guzach mózgu w stężeniu większym niż w otaczającej tkance nerwowej (Castronovo i wsp. 1980). Powszechnie uważa się, że terapeutyczne dawki CCNU nie wywołują toksycznych objawów ubocznych ze strony układu nerwowego (Strian, Maurach 1981; Young, Posner 1979). W badaniach doświadczalnych wykazano jednak zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w komórkach nerwowych, gleju i śródbłonek naczyń mózgowych szczurów poddanych działaniu CCNU (Maziarz, Szczech 1984; Szczech 1984, 1986; Godlewski 1986; Szczech, Godlewski 1986). Charakter zmian zależał od stopnia dojrzałości układu nerwowego i wieku zwierząt w czasie podawania cytostatyku.

Celem przedstawionej pracy było prześledzenie wpływu terapeutycznych dawek CCNU, stosowanych we wczesnym okresie rozwoju pozamacicznego, na podwzgórzowe ośrodki neurosekrecyjne szczura.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 32 szczurach szczepu Wistar, którym podawano dożyłdkowo w 3, 5 i 7 dniu po urodzeniu CCNU-Lomustine (Bellustine, Bellon F) w dawce 12,5 mg/kg masy ciała, rozpuszczony w oleju spożywczym. Szczury kontrolne otrzymywały w tych samych dniach i tą samą drogą olej

spozywczy bez cytostatyku. Zwierzęta doświadczalne i kontrolne uśmiercano przez dekapitację w 8, 15 i 30 dniu po urodzeniu. Krew z naczyń szyjnych zbierano w celu oznaczenia osmolalności surowicy. Do badań morfologicznych pobierano mózgowia i przysadki mózgowe. Materiał przeznaczony do badań immunohistochemicznych utrwalano w utrwalaczu Bouina, a pozostałą część w utrwalaczu Zenkera z 10% dodatkiem formaliny przez 1 godzinę, a następnie w samym płynie Zenkera przez dalszych 16 godzin. Po odwodnieniu w szeregu etanoli o wzrastających stężeniach materiał zatapiano w parafinie. Poprzeczne, seryjne skrawki grubości 7 μm cięto poczynając od skrzyżowania wzrokowego w kierunku doogonowym. Obecność neurofizyny wykazywano przy użyciu metody nieznakowanych przeciwciał w połączeniu z techniką kompleksów peroksydazy-antyperoksydazy (PAP) (Sternberger 1979). Surowica (Rb 42-2 Apr 78) zawierająca poliklonalne przeciwciała reagujące z neurofizyną I i II była darem prof. M. V. Sofroniewa z Uniwersytetu w Oxfordzie w Wielkiej Brytanii. Kontrolę swoistości reakcji immunohistochemicznej badano zastępując pierwsze przeciwciałem zwykłą nieimmunizowaną surowicą króliczą lub surowicą antyneurofizynową, absorbowaną przez dodanie nadmiaru neurofizyny (7,5 mg/ml). Wyniki testów kontrolnych były zawsze negatywne. Wykonano również barwienie hematoksyliną chromową według Gomoriego oraz fioletem krezyłu.

Pomiary morfometryczne neurocytów w jądrach nadwzrokowych i przykomorowych podwzgórza przeprowadzono w preparatach barwionych met. Nissla, za pomocą mikrometru okularowego mierząc dwa prostopadłe wymiary jądra komórkowego (d_1 i d_2). Obliczano pole powierzchni przekroju jądra komórkowego (S_j) według wzoru:

$$S_j = \pi \frac{d_1 \times d_2}{4}$$

Średnie arytmetyczne wyników porównywano z wynikami grupy kontrolnej szczurów w tym samym wieku.

Pomiarów osmolalności surowicy dokonywano bezpośrednio po pobraniu i odwirowaniu krwi za pomocą osmometru (Fiske Osmometer, USA) metodą obniżenia punktu zamarzania.

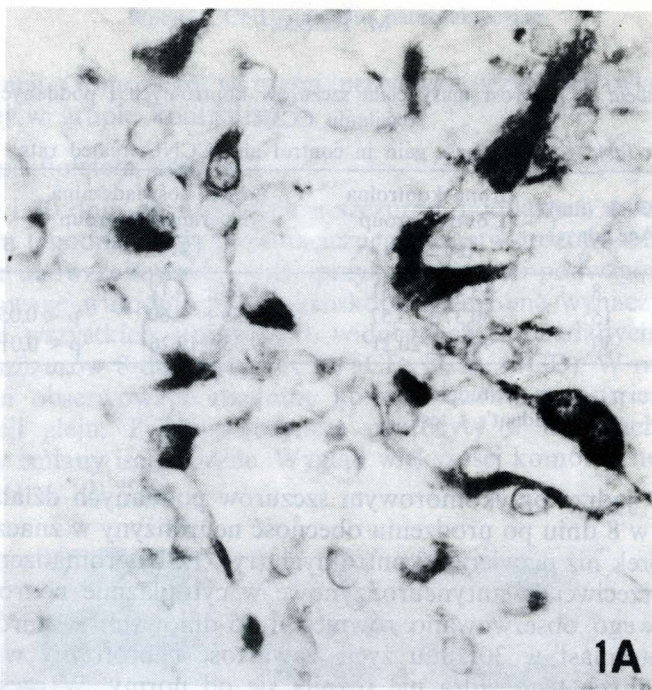
WYNIKI

Obserwując zachowanie zwierząt doświadczalnych stwierdzono mniejszą ruchliwość większości szczurów w czasie i w ciągu kilku dni po zakończeniu podawania CCNU. Przyrost masy ciała szczurów otrzymujących CCNU w 15 i 30 dniu po urodzeniu był mniejszy niż w grupie kontrolnej (tab. 1).

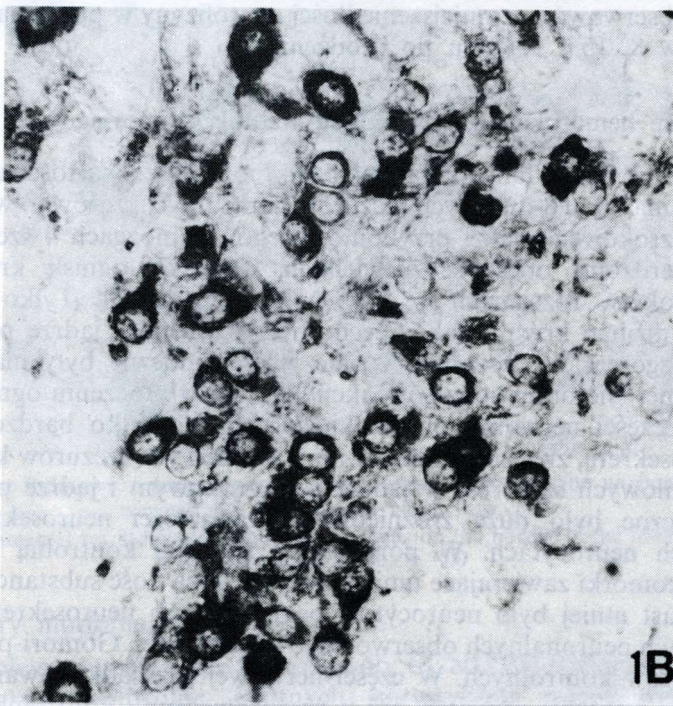
Podczas sekcji zwierząt nie stwierdzono zmian makroskopowych w narządach wewnętrznych, natomiast po przecięciu mózgu w płaszczyźnie czołowej u 4 ośmiodniowych szczurów, którym podawano CCNU, widoczne były drobne punkcikowate wybroczyny, rozrzucone w obu półkulach mózgu.

Badania immunohistochemiczne

W neurocytach jądra nadwzrokowego zawartość neurofizyny w 8, 15 i 30 dniu po urodzeniu była zbliżona do obserwowanej w grupie kontrolnej.



1A



1B

Ryc. 1. Jądro przykomorowe podwzgórza 8-dniowych szczurów z grupy kontrolnej (1A) i doświadczalnej (1B). Zwiększona zawartość neurofizyny w neurocytach szczura poddanego działaniu CCNU. Reakcja immunoenzymatyczna (PAP) z surowicą antyneurofizynową. Pow. 500 ×

Fig. 1. Nucleus paraventricularis hypothalami of 8-day-old control (1A) and experimental (1B) rats. Increased content of neurophysin in the rat treated with CCNU. Immunoenzyme (PAP) reaction with the antineurophysin serum. × 500

Tabela 1. Przyrost masy ciała szczurów kontrolnych i poddanych działaniu CCNU

Table 1. Body mass gain in control and CCNU-treated rats

Wiek (dni) Age (days)	Grupa kontrolna Control group [g] ± SD	Grupa doświadczalna Experimental group [g] ± SD	
8	13,42 ± 3,81	12,82 ± 4,12	
15	30,37 ± 3,57	24,59 ± 6,60	p < 0,05
30	96,95 ± 20,21	69,33 ± 19,26	p < 0,01

p – test *t* Studenta

p – Student's *t* test

Natomiast w jądrze przykomorowym szczurów poddanych działaniu CCNU stwierdzono w 8 dniu po urodzeniu obecność neurofizyny w znacznie większej liczbie komórek niż u zwierząt kontrolnych (ryc. 1). Nagromadzenie materiału wiążącego przeciwciała antyneurofizynowe w cytoplazmie neurocytów jądra przykomorowego obserwowano również u 15-dniowych szczurów doświadczalnych, natomiast w 30 dniu życia zawartość neurofizyny w komórkach neurosekrecyjnych tego jądra nie różniła się od normy. W części nerwowej przysadki obserwowano zmniejszenie ilości neurofizyny w porównaniu z grupą kontrolną w 8, 15 i 30 dniu po urodzeniu.

Barwienie hematoksyliną chromową według Gomoriego

24 godziny po podaniu ostatniej dawki CCNU zawartość neurosekrety była taka sama jak u 8-dniowych szczurów kontrolnych, zarówno w neuronach jądra nadwzrokowego, jak i przykomorowego. W mózгах 4 szczurów z tej grupy stwierdzono obecność niewielkich, świeżych ognisk krwotocznych i krwinkotoków, rozsianych w obu półkulach mózgu. Tylko w jednym przypadku drobne krwinkotoki obecne były również w jądrze przykomorowym podwzgórza. W obszarach wynacynień widoczne były makrofagi, na ogół nieliczne. Nie obserwowano reakcji glejowej w otoczeniu ognisk krwotocznych. W części nerwowej przysadki stwierdzono tylko bardzo niewielkie ilości neurosekrety, znacznie mniejsze niż u 8-dniowych szczurów kontrolnych.

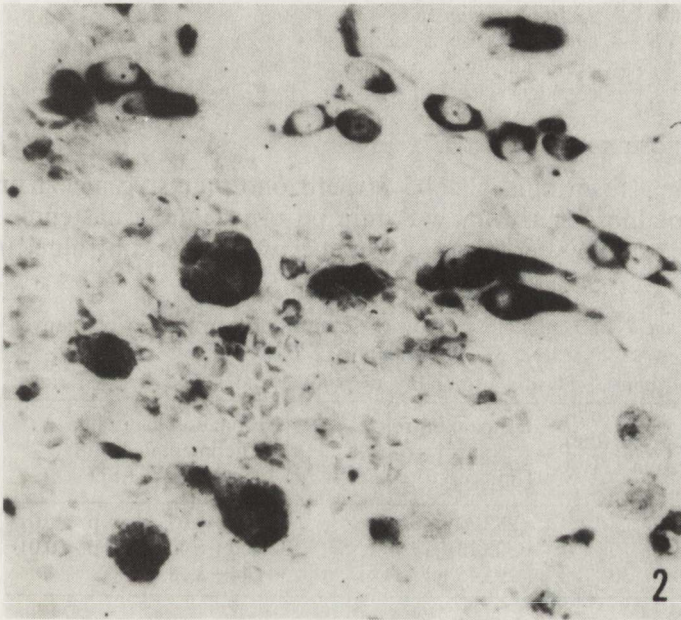
U 15-dniowych szczurów w jądrze nadwzrokowym i jądrze przykomorowym widoczne było duże zróżnicowanie zawartości neurosekrety w poszczególnych neurocytach. W porównaniu z grupą kontrolną liczniej występowały komórki zawierające umiarkowaną i dużą ilość substancji Gomoriego, natomiast mniej było neurocytów pozbawionych neurosekrety. Również w wypustkach neuronalnych obserwowano więcej ziaren Gomori-pozytywnych niż u szczurów kontrolnych. W części nerwowej przysadki zawartość neurosekrety była znacznie mniejsza niż u szczurów grupy kontrolnej.

W 30 dniu po urodzeniu neurocyty jąder nadwzrokowych i przykomorowych nie różniły się od kontroli pod względem zawartości neurosekrety w cytoplazmie perykarionów. Obserwowano natomiast większą ilość materiału neurosekrecyjnego w wypustkach drogi nadwzrokowo-przysadkowej. Zawar-

tość substancji Gomoriego w części nerwowej przysadki była większa od stwierdzonej w grupie kontrolnej.

Barwienie fioletem krezyłu

W 8, 15 i 30 dniu po urodzeniu u szczurów poddanych działaniu CCNU w pierwszym tygodniu życia pozamacicznego nie stwierdzono zmian w neurocytach jąder nadwzrokowych i jąder przykomorowych podwzgórza. Zwracały natomiast uwagę widoczne już makroskopowo drobne wynaczynienia krwi, rozsiane we wszystkich strukturach, widocznych na badanych przekrojach mózgow 4 szczurów 8-dniowych (4CD, 5CD, 8CD, 11CD). W otoczeniu tych wynaczynień obserwowano nieliczne komórki żerne, nie stwierdzono natomiast reakcji gleju. Tylko pojedyncze neurocyty w miejscach krwawienia wykazywały zmiany ischemiczne. Wygląd większości komórek nerwowych był prawidłowy (ryc. 2).



Ryc. 2. Szczur 8-dniowy z grupy doświadczalnej. Ognisko krwotoczne na pograniczu torebki wewnętrznej i prążkowie. Nissl. Pow. 800 ×

Fig. 2. Experimental rat 8-day-old. Hemorrhagic focus on the border of the internal capsule and striatum. Nissl. × 800

Pomiary morfometryczne

W grupie szczurów, które otrzymywały CCNU nie stwierdzono, w porównaniu z grupą kontrolną, istotnych statystycznie różnic wielkości jąder komórek neurosekrecyjnych jądra nadwzrokowego na żadnym z badanych etapów rozwoju. W jądrze przykomorowym średnie pole przekroju jąder komórek neurosekrecyjnych było w 8 dniu większe niż u szczurów kontrolnych (tab. 2).

Tabela 2. Średnie pole powierzchni przekroju jąder komórkowych neurocytów jąder nadwzrokowych i przykomorowych podwzgórza u szczurów kontrolnych i poddanych działaniu CCNU

Table 2. Mean cross-section area of the nuclei of neurosecretory neurons in control and CCNU-treated rats

Wiek (dni) Age (days)	Jądro Nucleus	Grupa kontrolna Control group [μm^2] \pm SEM	Grupa doświadczalna Experimental group [μm^2] \pm SEM	
8	SON	23,66 \pm 0,40	24,29 \pm 0,40	p > 99%
	PVN	32,22 \pm 0,43	33,98 \pm 0,41	
15	SON	29,40 \pm 0,46	28,71 \pm 0,44	
	PVN	34,98 \pm 0,45	35,45 \pm 0,55	
30	SON	41,00 \pm 0,57	41,20 \pm 0,66	
	PVN	42,96 \pm 0,67	43,58 \pm 0,61	

SON – *nucleus supraopticus*
 PVN – *nucleus paraventricularis*
 p – poziom ufności
 p – confidence level

Osmolalność surowicy krwi

W wyniku stosowania CCNU stwierdzono statystycznie znaczne obniżenie osmolalności surowicy w 8 dniu po urodzeniu, a następnie w 15 dniu życia – wzrost powyżej wartości średniej w grupie kontrolnej (tab. 3).

Tabela 3. Osmolalność surowicy szczurów kontrolnych i poddanych działaniu CCNU

Table 3. Plasma osmolality of control and CCNU-treated rats

Wiek (dni) Age (days)	Grupa kontrolna Control group [mOsm/kg] \pm SD	Grupa doświadczalna Experimental group [mOsm/kg] \pm SD	
8	282,20 \pm 6,34	265,00 \pm 6,07	p < 0,01
15	303,13 \pm 7,90	320,00 \pm 6,42	p < 0,01
30	295,45 \pm 12,34	304,44 \pm 8,18	

p – test *t* Studenta
 p – Student's *t* test

OMÓWIENIE

Zaburzenia w dojrzewaniu neurocytów jąder nadwzrokowych i przykomorowych, wywołane podawaniem CCNU w 3, 5 i 7 dniu po urodzeniu, polegały na nadmiernym gromadzeniu neurofizyny i Gomeri-pozytywnego materiału neurosekrecyjnego w perykarionach komórek tworzących jądro przykomorowe oraz w aksonach w początkowym odcinku drogi podwzgórzowo-przysadkowej. Zmiany te były najbardziej widoczne u 8-dniowych szczurów i stopniowo cofały się u zwierząt 15- i 30-dniowych. Obserwowane w 8 dniu życia u szczurów doświadczalnych powiększenie jąder komórek neurosekrecyjnych

jądra przykomorowego stanowi zdaniem wielu autorów (Stahl i wsp. 1955; Edström, Eichner 1958; 1960; Miśkowiak 1980) wykładnik wzmożonej syntezy białek w cytoplazmie i pozwala sądzić, że podwyższona zawartość neurofizyny jest spowodowana zwiększeniem syntezy neurohormonów, a nie, jak w przypadku podawania młodym szczurom winkrystyny, zahamowaniem transportu aksonalnego i uwalniania neurosekrety do krwiobiegu w części nerwowej przysadki (Pietrzak 1988). Za taką interpretacją przemawia również zmniejszenie osmolalności surowicy u 8-dniowych zwierząt doświadczalnych.

Ogniska krwotoczne, obserwowane w mózgu 4 szczurów po upływie doby od podania ostatniej dawki CCNU, wymagają odrębnego omówienia, ponieważ w praktyce klinicznej nie stwierdzono dotychczas krwotoków mózgowych w efekcie leczenia pochodnymi nitrozomocznika. Natomiast podobne zmiany obserwowano u szczurów doświadczalnych po stosowaniu BCNU i CCNU (Maziarsz, Szczech 1984; Godlewski, Szczech 1985). Wykazano również uszkodzenie śródbłonnków i zwiększoną przepuszczalność naczyń krwionośnych w mózgu pod wpływem tych cytostatyków (Godlewski 1986; Szczech, Godlewski 1986).

Morfologiczne wykładniki zwiększonej czynności neurosekrecyjnej oraz podwyższenie poziomu wazopresyny w surowicy i w płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano w przebiegu krwotoków podpajęczynówkowych i dokomorowych u ludzi i zwierząt doświadczalnych (Rap 1966; Jenkins i wsp. 1980; Mather i wsp. 1981), a także w wyniku niedokrwienia mózgu (Gajkowska 1987; Gajkowska, Zareba-Kowalska 1988).

W związku z doniesieniami o hamującym wpływie CCNU na biosyntezę białek (Kleihues, Magee 1973; Laurent i wsp. 1980) nie można przyjąć, że obserwowane w naszym doświadczeniu wykładniki wzmożenia czynności neurosekrecyjnej były wynikiem bezpośredniego działania CCNU na neurony jąder przykomorowych i nadwzrokowych podwzgórza. Zwiększoną syntezę i uwalnianie neurohormonów można zatem traktować jako efekt nieswoisty, wtórny do zmian naczyniowych.

Autor składa podziękowanie prof. dr Marii Dąbskiej za życzliwą pomoc i uwagi przy przygotowaniu pracy.

THE INFLUENCE OF CCNU (LOMUSTINE) ON THE NEUROSECRETION OF THE HYPOTHALAMIC NUCLEI AND THE NEUROHYPOPHYSIS IN EARLY STAGES OF EXTRAUTERINE DEVELOPMENT OF THE RAT

Summary

The hypothalamo-neurohypophyseal neurosecretory system was investigated in 8-, 15- and 30-day-old rats subjected to three intragastric doses of CCNU — 12.5 mg/kg b.wt. each on the 3rd, 5th and 7th day after birth. Neurosecretory neurons in the hypothalamus were visualized in the paraffin sections by the immunoenzyme (PAP) technique using antibodies against neurophysin and by Gomori chrome-hematoxylin staining. Accumulation of neurophysin was observed in these cells after treatment with CCNU. Karyometric measurements showed an increase of the mean nuclear cross-section area in PVN neurons in 8-day-old rats exposed to CCNU. In four experimental rats disseminated intracerebral hemorrhagic foci were present. Plasma osmolality was far below the

normal values on the 8th day, on the 15th day of life it shifted to hyperosmolality and returned to normal at the age of 30 days. Discussion of the results leads to the conclusion that the increase of the neurosecretory function observed in this experiment was secondary to vasogenic changes.

PIŚMIENNICTWO

1. Castronovo F. P., Potsaid M. S., Kapiwoda S. Y.: Biodistribution of ^{14}C -lomustine in an animal tumor model. *J Pharm Sci*, 1980, 69, 87–89.
2. Cheng C. J., Fujimura S., Grunberger D., Weinstein I. B.: Interaction of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (NSC 79037) with nucleic acids and proteins *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res*, 1972, 33, 22–27.
3. Edström J. E., Eichner D.: Quantitative Ribonukleinsäure-Untersuchungen an den Ganglienzellen des *Nucleus supraopticus* der Albino-Ratte unter experimentellen Bedingungen (Kochsalzbelastung). *Z Zellforsch*, 1958, 48, 187–200.
4. Edström J. E., Eichner D.: Qualitative und quantitative Ribonukleinsäureuntersuchungen an den Ganglienzellen der NN. *supraopticus* und *paraventricularis* der Ratte unter normalen und experimentellen Bedingungen (Kochsalzbelastung). *Anat Anz*, 1960, 108, 312–319.
5. Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego i przemijającego niedokrwienia mózgu na jądro nadwzrokowe i przykomorowe podwzgórza szczura. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 131–146.
6. Gajkowska B., Zareba-Kowalska A.: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego szczura. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 317–333.
7. Godlewski A.: Morphological alterations in blood vessels endothelia of rat brain after administration of CCNU (Lomustine). *Neoplasm*, 1986, 33, 437–445.
8. Godlewski A., Szczech J.: The morphology and histochemistry of adult rats neurocytes after BCNU administration. *Folia Histochem Cytobiol*, 1985, 23, 221–230.
9. Goth R., Rajewsky M.: Ethylation of nucleic acids by ethylnitrosourea-1- C^{14} in the fetal and adult rat. *Cancer Res*, 1972, 32, 1501–1505.
10. Heal J. M., Fox P. A., Schein P. S.: Effect of carbamylation on the repair of nitrosourea-induced DNA alkylation in L 1210 cells. *Cancer Res*, 1979, 39, 82–89.
11. Jenkins J. S., Mather H. M., Ang V.: Vasopressin in human cerebrospinal fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980, 50, 364–367.
12. Jensen D. E., Reed D. J.: Reaction of DNA with alkylating agents. Quantitation of alkylation by ethylnitrosourea of oxygen and nitrogen sites on poly(dA-dT) including phosphodiester formation. *Biochemistry*, 1978, 17, 5098–5107.
13. Kleihues P., Magee P. N.: Inhibition of protein synthesis by N-methyl-N-nitrosourea *in vivo*. *Biochem J*, 1973, 136, 303–309.
14. Laurent G., Dewerie-Vanhouche J., Machin D., Hildebrand J.: Inhibition of RNA synthesis in murine ependymoblastoma by the combination of amphotericin B and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea. *Cancer Res*, 1980, 40, 939–942.
15. Mather H. M., Ang V., Jenkins J. S.: Vasopressin in plasma and CSF of patients with subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1981, 44, 216–219.
16. Maziarz L. J., Szczech J.: Zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w mózgu młodych i dojrzałych szczurów po podaniu CCNU (Lomustine). *Neuropatol Pol*, 1984, 22, 399–414.
17. Miśkowiak B.: Wpływ doświadczalnego odwodnienia na układ neurosekrecyjny podwzgórzowo-przysadkowy szczura. *Endokrynol Pol*, 1980, 31, 67–78.
18. Oliveiro V. T., Vietzke V. M., Williams M. K.: The absorption, distribution, excretion and biotransformation of the carcinostatic 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea in animals. *Cancer Res*, 1970, 30, 1330–1337.
19. Oliveiro V. T., Walker M. D., Hayes S. L., DeVita V. T.: The physiologic distribution of radioactive 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU) in man. *Proc AACR*, 1970, 11, 61.
20. Pietrzak M.: The influence of vincristine on the neurosecretion of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the developing rat. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 521–535.
21. Rap Z. M.: Zmiany morfologiczne w podwzgórzu, lejku i przysadce mózgowej w krwotokach podajęczynówkowych i dokomorowych u królików. *Neuropatol Pol*, 1966, 1, 23–52.
22. Stahl A., Cotte G., Seite R.: Modifications cytologiques et cytochimiques des cellules

- neurosecrétaires de l'hypothalamus après perturbation expérimentale du métabolisme hydrique. *C. R. Assoc Anat*, 1955, 85, 455–464.
23. Sternberger L. A.: *Immunocytochemistry* (2nd ed). J. Wiley, New York, 1979.
 24. Strian F., Maurach R.: Neurotoxische Nebenwirkungen der zytostatische Therapie. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 1981, 49, 152–163.
 25. Sudhaker S., Tew K. D., Schein P. S., Wooley P. V., Smulson M. E.: Nitrosourea interaction with chromatin and effect on poly/adenosine diphosphate ribose/polymerase activity. *Cancer Res*, 1979, 39, 1411–1417.
 26. Szczech J.: Karyometric, cytophotometric and histoenzymatic studies on neuroglia of young rats subjected to CCNU (Lomustine) action. *Acta Histochem (Jena)*, 1984, 75, 121–132.
 27. Szczech J.: Karyometric, cytophotometric and histoenzymatic studies on neuroglia of rats treated with 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (CCNU/Lomustine). *Exp Pathol*, 1986, 30, 221–231.
 28. Szczech J., Godlewski A.: Appraisal of blood vessels in the rat brain following administration of nitrosourea derivatives. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 573–584.
 29. Walker M. D., Hilton J.: Nitrosourea pharmacodynamics in relation to central nervous system. *Cancer Treat Rep*, 1976, 60, 725–728.
 30. Young D. F., Posner J. B.: Nervous system toxicity of the chemotherapeutic agents. W: *Handbook of clinical neurology*. Red.: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. Elsevier, Amsterdam, 1979, vol. 36, 91–129.

Adres autora: Klinika Neurologii Rozwojowej Akademii Medycznej, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

AGNIESZKA JĘDRZEJEWSKA¹, ELŻBIETA STAFF-ZIELIŃSKA²,
TERESA WIERZBA-BOBROWICZ¹, ZOFIA POSZWIŃSKA¹,
PIOTR OLEJNICZAK³

OBRAZ HISTOLOGICZNY OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO SZCZURA W INTENSYWNYM PRZEWLEKŁYM ZATRUCIU ETANOLEM*

¹ Zakład Neuropatologii, Instytut Psychiatrii i Neurologii, Warszawa

² Zakład Diagnostyki Patomorfologicznej,

Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, Warszawa

i ³ Klinika Neurologiczna, Akademia Medyczna, Wrocław

Wiadomo, że przewlekła intoksykacja alkoholem etylowym prowadzi do rozwoju zmian strukturalnych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym (Majdecki i wsp. 1973; Riley, Walker 1978; Tarnowska-Dziduszko 1978, 1986; Harper i wsp. 1985, 1987; Rosengren i wsp. 1985; Roulet i wsp. 1985; Cadete-Leite i wsp. 1986; Lescaudron i wsp. 1986; Mills i wsp. 1986; Jędrzejewska, Staff-Zielińska 1987). W badaniach nad patomechanizmem tych zmian konieczny jest odpowiedni model eksperymentalny, pozwalający na uzyskanie „czystego” interpretacyjnie obrazu. Porównywanie danych uzyskanych na zwierzętach laboratoryjnych z danymi z patologii ludzkiej jest zawsze obarczone pewnym ryzykiem. W przypadku alkoholizowania szczurów powstaje pytanie, w jakim stopniu doświadczalna intoksykacja jest zbliżona do nadużywania alkoholu przez ludzi. Praca niniejsza ma na celu przetestowanie neuropatologiczne modelu przewlekłej intoksykacji alkoholowej szczura Wistar i uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy zastosowane warunki doświadczalne doprowadzą do rozwoju zmian histologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) szczura, porównywalnych z obrazem neuropatologicznym przewlekłej intoksykacji alkoholowej u człowieka. Wprowadzenie bowiem bardziej precyzyjnych technik badawczych winno być, naszym zdaniem, poprzedzone upewnieniem się, czy te ostatnie istotnie poszerzą nam obraz, znany z podręczników klasycznej neuropatologii.

MATERIAŁ I METODY

Trzydziestu szczurom rasy Wistar, obu płci, o masie ciała około 300 g w momencie rozpoczynania doświadczenia, podawano sondą do żołądka 5 cm³ 40% wodnego roztworu alkoholu etylowego przez 5 dni w tygodniu

* Praca wykonana w ramach problemu CPBR 11.8., cel 34.

przez okres 3 miesięcy. W każdym dniu intoksykacji podawano najpierw 2 cm³ (po czym szczur zasypiał) i dopajano zwierzęta w odstępach co pół godziny po 1,5 cm³. W trakcie doświadczenia szczury otrzymywały standardową dietę i wodę do picia *ad libitum*. Dziesięciu szczurom podawano w taki sam sposób wodę pitną, 5 szczurów pozostających w takich samych warunkach jak pozostałe zwierzęta, nie poddano żadnym zabiegom doświadczalnym. Dwa dni po podaniu ostatniej dawki alkoholu zwierzęta usypiano eterem i dekapitowano. Mózgi pobrane do badania utrwalano w formalinie i przeprowadzano w sposób rutynowy do parafiny. Mózgowie skrawki reprezentujące wszystkie struktury, oceniane u ludzi rutynowym badaniem neuropatologicznym. Preparaty barwiono hematoksyliną i eozyną, według metody van Gieson, Spielmeyera, PTAH, oraz impregnowano według Bielschowsky'ego.

Pięć szczurów sperfundowano roztworem formaliny w buforze fosforanowym. Mózgowia po wyjęciu dotrwalały w płynie perfuzyjnym i przeprowadzano przez 20% roztwór sacharozy, a następnie po zamrożeniu krojono skrawki grubości 30 μm, które przechowywano w zamrażarce w krioprotektorancie do wykonania badania immunocytochemicznego na kwaśne włóknikowe białko glejowe (GFAP) według Sternbergera (1979) w modyfikacji Armstronga. Użyto przeciwciała pierwotnego GFAP w rozcieńczeniu 1:500, przeciwciała wtórnego zablokowanego biotyną (przeciwnokróliczego)-kompleks ABC firmy Vector Laboratories, surowicy blokującej koziej, buforów: fosforanowego i Tris, Trixton-X-100 oraz dwuaminobenzydyny jako chromogenu. Jako kontroli użyto normalnej surowicy królika, nie uzyskując reakcji immunocytochemicznej. Badanie na GFAP miało na celu wykazanie odczynu astroglejowego, który zwykle towarzyszy przewlekłym uszkodzeniom OUN. Badanie na GFAP wykonano również u szczura nie poddanego żadnym zabiegom doświadczalnym.

WYNIKI

W badanym materiale stwierdzono cechy uogólnionego obrzęku i przekrwienia mózgu z obecnością komórek jednojądrowych i makrofagów w przestrzeni podpajęczynówkowej, ogniskowe zgębczenia w istocie białej, zwłaszcza w konarach mózdzku (ryc. 1), spoidle wielkim i spoidle przednim, którym towarzyszyło spłowienie mieliny (ryc. 2). W istocie białej, zwłaszcza mózdzku obserwowano dość skąpe, ale wyraźne nacieki limfocytarno-mikroglejowe, bez wyraźnego związku z naczyniami (ryc. 3). Strukturą, w której stwierdzono wyraźne zmiany neuronalne był hipokamp brzuszny. W jego obrębie obserwowano odcinkowe ubytki komórek nerwowych, zwłaszcza w sektorze CA₁ (ryc. 4) i sklerotyzację, również w pozostałych sektorach (ryc. 4 i 5), z komórkowym odczynem glejowym. Ponadto obserwowano w III i V warstwie kory, głównie czołowej i ciemieniowej, ubytki neuronów ze wzmożoną satelitozą. Podobne zmiany stwierdzono w opuszce, głównie w jądrach tworzących siatkowatego (ryc. 6). W oponach przekrwienie naczyń, obecność płynu wysiękowego oraz nacieki komórek jednojądrowych (ryc. 7, 8 i 9) uzupełniały obraz neuropatologiczny.



Ryc. 1. Obrzękowe zgębczenie górnego robaka mózdzku. H-E. Pow. 300 ×

Fig. 1. Edematous spongiosis of upper segment of vermis. H-E. × 300

Ryc. 2. Obrzękowe spłowienie mieliny. Miejscami widoczne dobrze zachowane osłonki mielinowe. Spielmeyer. × 60

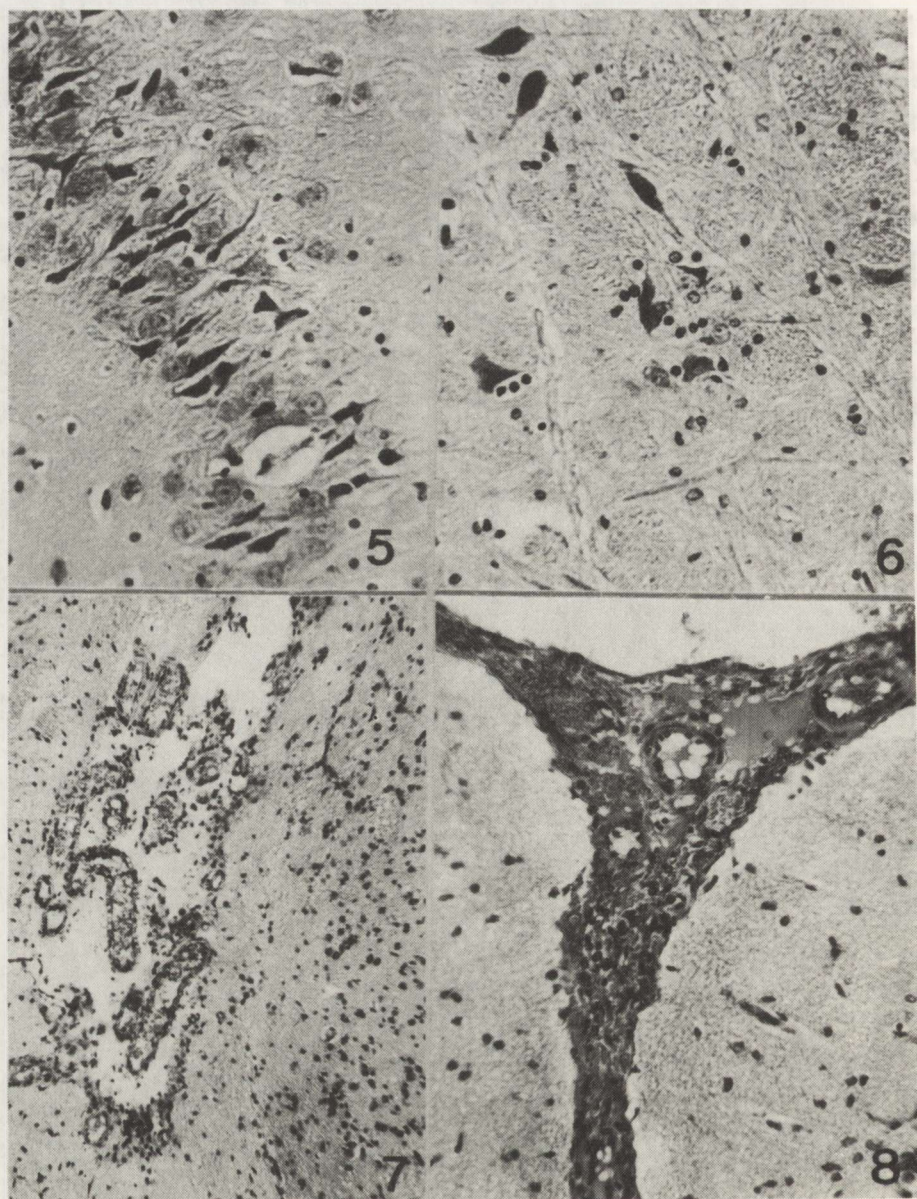
Fig. 2. Edematous discoloration of myelin. In some places well preserved myelin sheaths are visible. Spielmeyer. × 60

Ryc. 3. Dwie drobne grudki odczynowe limfocytarno-mikroglejowe w istocie białej mózdzku. H-E. Pow. 200 ×

Fig. 3. Two minute reactive nodules of lymphocytes and microglia in cerebellar white matter. H-E. × 200

Ryc. 4. Ubytki neuronalne w sektorze CA₁ hipokampa brzusznego. H-E. Pow. 60 ×

Fig. 4. Loss of neurons in CA₁ sector of the ventral hippocampus. H-E. × 60



Ryc. 5. Sklerotyzacja neuronów brzuszego hipokampa. Widoczne również jasne odczynowe jądra astrogleju. H-E. Pow. 400 ×

Fig. 5. Sclerotization of neurons of the ventral hippocampus. Light reactive astroglial nuclei are also visible. H-E. × 400

Ryc. 6. Sklerotyzacja neuronów jądra olbrzymiokomórkowego mostu z żywą odczynową satellitozą. H-E. Pow. 400 ×

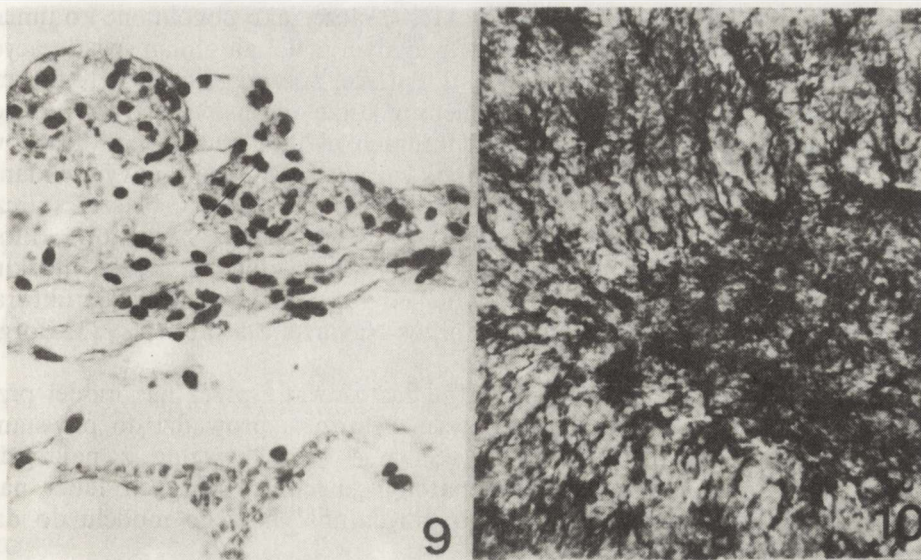
Fig. 6. Sclerotization of gigantocellular nucleus neurons of pons with reactive satellitosis. H-E. × 400

Ryc. 7. Przekrwienie naczyń oponowych. H-E. Pow. 60 ×.

Fig. 7. Hyperemia of meningeal blood vessels. H-E. × 60

Ryc. 8. Płyn wysiękowy oraz liczne jądra komórkowe w przestrzeni podjączynówkowej. H-E. Pow. 200 ×

Fig. 8. Exudative fluid and numerous cell nuclei in subarachnoid space. H-E. × 200



Ryc. 9. Nacieki jednojądrzaste w przestrzeni podpajęczynówkowej. H-E. Pow. 400 ×

Fig. 9. Mononuclear infiltration in subarachnoid space. H-E. × 400

Ryc. 10. Glejoza astrocytarna w brzusznej hipokampie. GFAP. Pow. 60 ×

Fig. 10. Astrocytic gliosis in ventral hippocampus. GFAP. × 60

Badaniem immunocytochemicznym na GFAP wykazano wyraźną glejozę w brzusznej części hipokampa (ryc. 10), bez zróżnicowania strefowego.

Obraz OUN szczurów kontrolnych nie wykazywał odchyień od stanu prawidłowego.

OMÓWIENIE.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że zastosowany przez nas model doświadczalnego przewlekłego zatrucia etanolem szczura Wistar doprowadził do rozwoju uszkodzeń strukturalnych w OUN. Stwierdzono je już w mikroskopie świetlnym, dzięki czemu są porównywalne z obrazem neuropatologicznym, obserwowanym w przypadkach przewlekłego alkoholizmu u ludzi. Zmiany mają podobny charakter jak w przewlekłym alkoholizmie u ludzi, z pominięciem szczególnych postaci encefalopatii alkoholowej (Tarnowska-Dziduszko 1978, 1979, 1986). Uzyskaliśmy bowiem przewlekłe i ostre zmiany obrzękowe, z obecnością nacieków komórek jednojądrzastych w oponach, drobnych nacieków o charakterze grudek limfocytarno-mikroglejowych oraz spłowienie mielin w mózgu. Obserwowaliśmy również sklerotyzację komórek nerwowych, zwłaszcza tych, których zapotrzebowanie energetyczne jest wysokie (neurony sektora CA₁ hipokampa oraz komórki piramidowe kory sześciowarstwowej), z towarzyszącą wzmożoną satelitozą komórek glejowych. W zastosowanym modelu intoksykacji alkoholowej ujawniła się zdecydowana akcentacja zmian w hipokampie brzusznej z istotnym uszkodzeniem populacji komórek nerwowych tej struktury i silną glejozą odczynową. Poza

hipokampem zmiany w OUN można określić raczej jako uogólnione i o umiarkowanym nasileniu. Nie stwierdzono w badanym materiale zmian świadczących o inwolucji mózgu, czy to wybiórczej, dotyczącej poszczególnych struktur, czy też układowej, ze szczególnym nasileniem w korze amonalnej, ugrupowaniach jądra migdałowego oraz innych strukturach układu limbicznego (Tarnowska-Dziduszko 1978, 1979). Należy jednak zaznaczyć, że w rutynowym badaniu histologicznym mózgu szczura niezmiernie trudno zauważyć blaszki starcze, zwyrodnienie włóknikowe neuronów, czy zwyrodnienie barwikowe, które stanowią charakterystyczne wykładniki procesu inwolucji w mózgu ludzkim. U gryzoni tego typu zmiany są uchwytnie jedynie w badaniach ultrastrukturalnych lub immunocytochemicznych (Cervós-Navarro, Sarkander 1983; Borges i wsp. 1986).

Podsumowując można stwierdzić, że zastosowany przez nas model przewlekłej intoksykacji alkoholem etylowym u szczura prowadzi do powstania uszkodzeń strukturalnych w OUN. Są one porównywalne z najczęściej spotykanym zespołem zmian neuropatologicznych w mózgach ludzi nadużywających alkoholu. Potwierdza to przydatność naszego modelu do dalszych, ukierunkowanych badań.

HISTOLOGICAL PATTERN OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN RATS AFTER INTENSIVE CHRONIC ETHANOL INTOXICATION

Summary

The influence of intensive chronic intoxication with ethanol on adult Wistar rats was investigated. The animals received through a stomach pump 5 ml of 40% ethyl alcohol solution daily for three months. Structural lesions of the CNS observed in the light microscope consisted of acute and chronic edematous changes with infiltration of mononuclear cells and presence of lymphocytic-microglial nodules and myelin discoloration. Sclerotization of nerve cells with reactive gliosis was also noted in the CA₁ sector of ventral hippocampus. The pattern of changes is comparable with the most frequently observed pathological abnormalities observed in the CNS of humans after alcohol abuse.

PIŚMIENICTWO

1. Borges M. M., Paula-Barbosa M. M., Volk B.: Chronic alcohol consumption induced lipofuscin deposition in the rat hippocampus. *Neurobiol Aging*, 1986, 7, 347–355.
2. Cadete-Leite A., Tavares M. A., Paula-Barbosa M. M., Gray E. G.: Perforated synapses in frontal cortex of chronic alcohol-fed rats. *J Submicrosc Cytol*, 1986, 18, 495–499.
3. Cervós-Navarro J., Sarkander H.-I.: Brain aging: neuropathology and neuropharmacology. *Aging*, vol 21, Raven Press, New York, 1983.
4. Harper C., Krill J., Daly J.: Are we drinking our neurons away? *Br Med J Clin Res*, 1987, 294, 534–536.
5. Harper C., Krill J., Holloway R. L.: Brain shrinkage in chronic alcoholics: a pathological study. *Br Med J Clin Res*, 1985, 290, 501–504.
6. Jędrzejewska A., Staff-Zielińska E.: Neuropathology of intramural autonomic innervation of stomach in chronic ethanol intoxication. *Pathol Res Pract*, 1987, 182, 503.
7. Lescaudron L., Seguela P., Geffard M., Verba A.: Effects of long-term ethanol consumption on GABAergic neurons in the mouse hippocampus: a quantitative immunological study. *Drug Alcohol Depend*, 1986, 18, 377–384.

8. Majdecki T., Marciniak M., Beskid M.: Zmiany ultrastrukturalne w mózgach psów po podawaniu etanolu. *Neuropatol Pol*, 1973, 11, 411–416.
9. Mills K. R., Ward K., Martin P., Peters T. J.: Peripheral neuropathy and myopathy in chronic alcoholism. *Alcohol*, 1986, 21, 357–362.
10. Riley J. N., Walker D. W.: Morphological alterations in hippocampus after long-term alcohol consumption in mice. *Science*, 1978, 201, 646–648.
11. Rosengren L. E., Wroński A., Briving C., Haglid K. G.: Long lasting changes in gerbil brain after chronic ethanol exposure: a quantitative study of the glial cell marker S-100 and DNA. *Alcoholism*, 1985, 9, 109–118.
12. Roulet T., Van de Bosch de Aguilar N., De Witte P.: Effects of ethanol on the rat brain: ultrastructural alterations in the temporal cortex and in the hippocampus. *Alcohol*, 1985, 2, 227–230.
13. Sternberger L. A.: Immunocytochemistry. 2nd ed., J. Wiley and Sons, New York, 1979.
14. Tarnowska-Dziduszko E.: Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowatego w przewlekłym alkoholizmie. *Neuropatol Pol*, 1978, 16, 587–597.
15. Tranowska-Dziduszko E.: Badania nad morfologicznym podłożem ostrego majaczenia alkoholowego. *Neuropatol Pol*, 1979, 17, 295–309.
16. Tarnowska-Dziduszko E.: Obraz morfologiczny mózdzku w przebiegu przewlekłego alkoholizmu. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 57–68.

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

KRZYSZTOF BOMBICKI

THE INFLUENCE OF TRANSPLANTABLE EPITHELIOMA GUÉRIN ON MYOELECTRICAL ACTIVITY

Department of Pathophysiology of Locomotor Organs,
Institute of Orthopedic Surgery and Rehabilitation, School of Medicine, Poznań

Progressive myasthenia in patients with neoplastic disease has been known for a long time. Denny-Brown (1948), Henson et al. (1954), Heathfield and Williams (1954) tried to identify the pathological changes in the muscles and nerves in these patients. In the last 30 years many reports on this problem were published which confirm the term "neoplastic myopathy" introduced by Henson et al. (1954). According to him, it is the result of metabolic disorders and not of secondary atrophy after neural injury.

Hildebrand and Coërs (1967) observed changes in the peripheral nerves accompanied by disseminated degeneration and necrosis of the muscular fibers. Rebeiz (1973) described atrophy of the muscles, similar to that occurring after injury to the anterior horn neurons of the spinal cord or the peripheral nerves. The investigations carried out by Lambert et al. (1956) and Lambert and Rooke (1965) revealed disturbances in nerve-muscle transmission in patients with cancer of the lungs named the myasthenic syndrome.

The earlier data are partial and do not explain the point. It is not known at which stage of neoplastic disease these changes appear and when they intensify. Experimental research on animals with neoplastic disease was found to be useful in this respect, therefore rats with transplanted epithelioma Guérin were chosen as the model.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on Wistar rats, which body weight ranged from 180–240 g, aged 6–12 months. The animals were divided into 2 groups: the control group of 25 animals and the experimental group of 40 animals with transplanted epithelioma Guérin. The animals with epithelioma Guérin were examined at 3 weeks – 2 months after transplantation. At this time the tumor size increased from that of a pea to a walnut.

The following parameters were determined in all the rats:

- 1) electromyographic action potentials of *m. gastrocnemius sin.* and *dext.* during spontaneous activity,
- 2) motor nerve conduction velocity,
- 3) test of neuromuscular transmission with tetanisation of the exposed *n. ischiadicus* (Drachman 1979),
- 4) resting membrane potential in the fibers of the gastrocnemius muscle,
- 5) tumor growth, the way of moving of the animals and the finger-spreading reflex (Gutmann),
- 6) fresh and dry calf muscle weight.

Electromyograms were performed twice, i.e. before tumor transplantation and during its development using concentric bipolar electrodes. At examination of motor nerve conduction the exposed ischiadicus n. was put on a nerve stimulation electrode type 13K33 in the site of its origin in the pelvis, concentric bipolar electrode inserted in the gastrocnemius m. was receiving electrode. The stimulus of 2 Hz lasting for 0.1 ms was used. The longest and the shortest latency was determined in order to find the conduction velocity in the fastest and in the slowest fibers (Poloni, Sala 1962).

The test of neuromuscular transmission was performed in the following stimulation program:

- 1) 7 times stimulation with 2 Hz for 0.2-ms,
- 2) stimulation with 40 Hz for 2 sec. to develop tetanus tension,
- 3) at 40 sec. and at 12 min after tetanus – stimulation repeated as it was in the first part of the test.

In Drachman's test stimulation and receiving electrodes were analogical to the examination of conduction velocity. The anatomical sites of stimulation and response were the same. In calculation of the amplitude decrement 5–1 response was considered. Determination of motor nerve conduction and test of neuromuscular transmission were performed in ether anesthesia just before the animals were sacrificed. The muscles for weight estimation were taken out immediately after death.

Resting membrane potential in the *m. gastrocnemius* was determined *in vivo* by the method described by Mrozek (1973) and Janiszewski (1969). In the examination glass microelectrodes filled with 3 M KCl were used. In the set of device for the potentials registration – DC amplifier, calibrator and oscilloscope were used.

The control animals were examined analogically to the experimental group.

RESULTS

In all animals, changes in motor activity were not significant. The finger spreading reflex appeared.

Electromyographic recordings revealed that the mean duration of action potentials during development of the tumor was significantly prolonged and the mean amplitude increased (Tab. 1). During full effort, both in the control and in the experimental group before tumor transplantation, the physiological

Table 1. Characteristic of electromyograms of *musculus gastrocnemius* in rats with epithelioma Guérin

Tabela 1. Charakterystyka elektromiogramów *musculus gastrocnemius* u szczurów z nabłoniakiem Guérina

Measurements Pomiary	I Examination I Badanie	II Examination II Badanie	Difference Różnica	P
Duration of action potentials (ms) Czas trwania potencjałów czynnościowych (ms)	6.1	6.6	0.5	≤ 0.05
Amplitude of action potentials (μV) Amplituda potencjałów czynnościowych (μV)	142.9	224.0	81.1	≤ 0.05
Frequency of action potentials Częstotliwość potencjałów czynnościowych	482	405	77.0	≤ 0.01

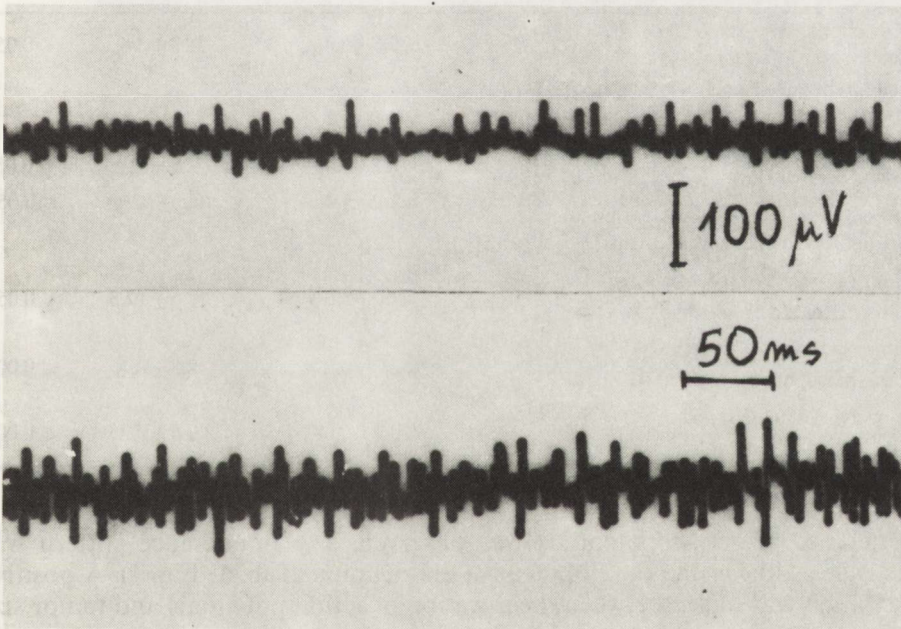


Fig. 1. Electromyograms of *m. gastrocnemius*. Below — interference pattern in the control group, above — the reduced frequency of action potentials 5 weeks after transplantation of epithelioma Guérin

Ryc. 1. Elektromiogramy *m. gastrocnemius*. Dół — interferencyjny zapis w grupie kontrolnej, góra — zmniejszenie częstotliwości potencjałów czynnościowych 5 tygodni po przeszczepieniu nabłoniaka Guérina

Table 2. Statistically significant correlations
Tabela 2. Korelacja statystycznie istotna

The correlated parameters Parametry korelowane	Measurements Pomiary	r	t
Tumor size Wielkość guza	Conduction velocity in the slowest nerve fibers Szybkość przewodzenia we włóknach najwolniej przewodzących	0.50	5.0
Number of days after transplantation of epithelioma Guérin Liczba dni po przeszczepieniu nabłoniaka Guérina	Conduction velocity in the slowest nerve fibers Szybkość przewodzenia we włóknach najwolniej przewodzących	0.42	3.98
Tumor size Wielkość guza	Mean duration of action potentials Średni czas trwania potencjałów czynnościowych	0.47	4.09

Table 3. Comparison of the experimental and control groups of animals
Tabela 3. Porównanie doświadczalnej i kontrolnej grupy zwierząt

Compared results Wyniki porównywane	Epithelioma Guérin Nabłoniak Guérina	Control group Grupa kontrolna	p
Nerve conduction velocity of the fastest fibers (m/sec) Szybkość przewodzenia we włóknach najszybciej przewodzących (m/sek)	20.6 ± 3.8	22.3 ± 3.4	≤ 0.05
Nerve conduction velocity of the slowest fibers (m/sec) Szybkość przewodzenia we włóknach najwolniej przewodzących (m/sek)	8.1 ± 1.4	9.5 ± 2.1	≤ 0.05
Membrane resting potentials (mV) Błonowy potencjał spoczynkowy (mV)	57.0 ± 8.6	72.0 ± 17.5	≤ 0.05
Wet weight of calf muscles (g) Świeża masa mięśni goleni łydki (g)	2.0 ± 0.2	2.5 ± 0.4	≤ 0.001
Dry weight of calf muscles (g) Sucha masa mięśni goleni łydki (g)	0.4 ± 0.08	0.6 ± 0.25	≤ 0.001

interference of action potentials was observed. The interference pattern was mostly lost during the development of epithelioma (Tab. 1, Fig. 1). A positive correlation was found between the duration of action potentials and tumor size (Tab. 2).

The results of motor nerve conduction are presented in Table 3. The above mentioned data indicate a slowing down of conduction in the fastest and slowest conducting fibers. Prolongation of conduction progressed simultaneously with development of the tumor (Tab. 2).

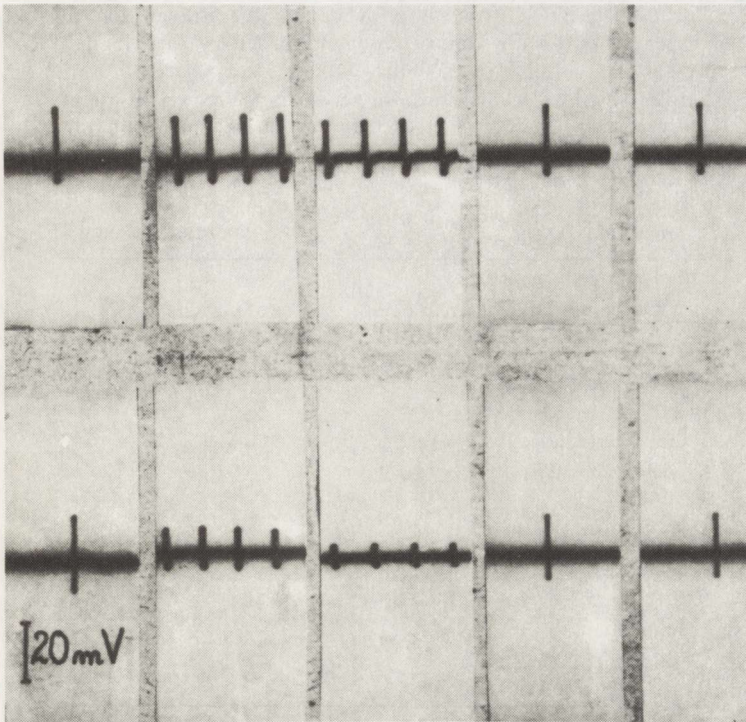


Fig. 2. Evoked potentials obtained during stimulation test. From left to right: beginning of stimulation, beginning of tetanus, tetanus terminated, 40 sec after tetanus, 12 min later. Two types of responses: above — amplitude remains unchanged, below — amplitude is reduced

Ryc. 2. Potencjały wywołane otrzymane podczas testu stymulacji. Z lewej do prawej: początek stymulacji, początek stymulacji tężcowej, koniec stymulacji tężcowej, 40 sek po ukończeniu tetanizacji, 12 min po ukończeniu stymulacji tężcowej. 2 typy odpowiedzi: u góry — amplituda pozostała niezmienniona, na dole — amplituda uległa obniżeniu

Two types of response appeared in both groups of animals after repetitive nerve stimulation of long duration (Fig. 2). In the first type of response the amplitude of evoked potentials decreased and in the second type the post-tetanic potentiation dominated with an increase of the amplitude.

The results of the neuromuscular transmission test varied widely in both animal groups, but the values obtained after tetanus in the experimental group differed from the control group (Tab. 4).

The value of the resting membrane potential in the animals with epithelioma Guérin decreased as compared with that in the control group (Tab. 3). The dry weight of all calf muscles was significantly reduced (Tab. 3).

The results obtained in the control group: duration and amplitude of action potentials, motor nerve conduction velocity and resting membrane potential are similar to those obtained by earlier authors (Koczocik-Przedpeńska et al. 1973; Rouhani et al. 1983).

Table 4. Results of control of neuromuscular transmission in experimental and in control groups evaluated by the Mann-Whitney test

Tabela 4. Wyniki próby transmisji nerwowo-mięśniowej w grupie doświadczalnej i kontrolnej oceniane testem Manna-Whitneya

Recording conditions Warunki zapisu	Value of the M-W test Wartość testu M-W	Significance of difference Istotność różnicy
Initial stimulation Stymulacja początkowa	2.06	$p \leq 0.05$
Beginning of tetanus Początek stymulacji tężcowej	1.82	$p > 0.05$
Tetanus terminated Koniec stymulacji tężcowej	1.63	$p > 0.05$
40 sec later 40 sek po ukończeniu stymulacji tężcowej	2.25	$p \leq 0.05$
12 min later 12 min po ukończeniu stymulacji tężcowej	2.73	$p \leq 0.01$

DISCUSSION

The results of examination of the animals with epithelioma Guérin indicate neurogenic atrophy of the muscles, which progresses in the course of tumor development. Prolongation of duration and rise of amplitude of action potentials, lack of interference pattern in EMG, slowing down of motor conduction velocity and decrease of resting membrane potential were indicators of these changes. The EMG results suggest the collateral reinnervation of *m. gastrocnemius* as it was described by Guth (1963), Hatsuyama (1966), Koczocik-Przedpelska et al. (1973).

According to Hawley et al. (1980), in the course of neoplastic disease the muscles are denervated. Hildebrand and Coërs (1967) and Awad (1968) also observed changes of the type of neuropathy and noted peripheral reinnervation. Elmqvist and Lambert (1968) did not observe prolonged duration of action potentials in patients with bronchogenic cancer. Simpson (1982) found no change of the amplitude of action potentials in the course of neoplastic disease.

The decrease of conduction velocity in the fastest and slowest motor nerve fibers in rats with epithelioma Guérin can be connected with the disintegration of myelin sheaths. In consequence the percentage of demyelinated fibers increases. The ultrastructural studies performed by Vital et al. (1975) showed damage of the myelin in chronic lymphoblastic leukemia cases. Graws et al. (1983) observed axonal neuropathy with secondary remyelination in patients with bronchogenic cancer. Similar observations were found by Schlaepfer

(1974). Kelly et al. (1983) reported slowing down of nerve conduction in osteomyelosclerosis. Fukuhara et al. (1972) carried out ultrastructural investigations in patients with bronchogenic cancer and revealed degeneration of the nerves. They also found degeneration and regeneration processes within the motor endplates. The studies performed by Politis et al. (1980) also confirm the above mentioned data.

The obtained results of neuromuscular transmission test, in spite of their great variability, indicate that in epithelioma Guérin the site of derangement lies not only in the nerves themselves, but also in the neuromuscular junctions. The decrease in resting membrane potential in *m. gastrocnemius* is the consequence of partial denervation. This is confirmed by the studies of Albuquerque and Thesleff (1968), Mrozek (1973), McArdle and D'Alonzo (1981), Bik (1985). The muscular lesion is subsequently followed by the loss of muscle weight.

CONCLUSION

Transplanted epithelioma Guérin results in rats neuromyopathy which is manifested by destruction of the whole motor unit.

WPLYW PRZESZCZEPIALNEGO NABŁONIAKA GUÉRINA NA AKTYWNOŚĆ MIOELEKTRYCZNĄ

Streszczenie

Prześlędzono wpływ przeszczepialnego nabłoniaka Guérina na dynamikę i czas pojawiania się zmian nerwowo-mięśniowych. Doświadczenia wykonano na szczurach Wistar, które podzielono na 2 grupy: kontrolną oraz doświadczalną z nabłoniakiem Guérina. U wszystkich zwierząt przeprowadzono: badanie elektromiograficzne szybkości przewodzenia we włóknach nerwowych ruchowych, test stymulacji z tetanizacją według Drachmana (1979), oznaczenia błonowego potencjału spoczynkowego we włóknach mięśnia brzuchatego łydki, obserwacje wzrostu guza nowotworowego, sposobu poruszania się zwierząt oraz odruchu rozstawiania palców. Oznaczono również suchą masę wypreparowanych mięśni goleni.

U zwierząt z nabłoniakiem Guérina nie zauważono istotnych zmian w aktywności ruchowej i lokomocyjnej. W elektromiogramach stwierdzono przedłużenie czasu trwania potencjałów czynnościowych, obniżenie amplitudy potencjałów, zubożenie zapisu wysiłkowego EMG. Stwierdzono zwolnienie przewodzenia we włóknach nerwowych ruchowych, zarówno najszybciej, jak i najwolniej przewodzących. Analiza statystyczna wyników testu stymulacji z tetanizacją wykazała znamiennej różnicę wyników pomiędzy grupą kontrolną i grupą z przeszczepialnym nowotworem. Błonowy potencjał spoczynkowy uległ obniżeniu. Sucha masa mięśnia brzuchatego łydki zmniejszyła się w porównaniu do grupy kontrolnej. Zmiany nasilały się równolegle z rozwojem nowotworu.

REFERENCES

1. Albuquerque E. X., Thesleff S.: A comparative study of membrane properties of innervated and chronically denervated fast and slow skeletal muscles of the rat. *Acta Physiol Scand*, 1968, 73, 471–480.
2. Awad E. A.: Motor-point biopsies in carcinomatous neuropathy. *Arch Phys Med Rehabil*, 1968, 49, 643–649.

3. Bik T.: Membrane potential of muscle fibers in rat exposed on different experimental conditions. School of Medicine, Poznań, 1985, doctor thesis.
4. Denny-Brown D.: Primary sensory neuropathy with muscular changes associated with carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1948, 11, 73–87.
5. Drachman D. B.: Myasthenia gravis: A disorder of acetylcholine receptors. In: Current topics in nerve and muscle research. Ed.: A. J. Aguayo, G. Karpati, Excerpta Medica, Amsterdam, 1979.
6. Elmqvist D., Lambert E. H.: Detailed analysis of neuromuscular transmission in patient with the myasthenic syndrome sometimes associated with bronchial carcinoma. *Mayo Clin Proc*, 1968, 43, 689–719.
7. Fukuhara N., Takamori M., Gutmann L., Chou S. M.: Eaton-Lambert syndrome. Ultrastructural study of the motor endplates. *Arch Neurol*, 1972, 27, 67–78.
8. Graws F., Ferrer J., Lamasca J.: Mixed carcinomatous neuropathy in patients with lung cancer and lymphoma. *Acta Neurol Scand*, 1983, 68, 40–48.
9. Guth L.: Neuromuscular function after regeneration of interrupted nerve fibers into partially denervated muscle. *Exp Neurol*, 1963, 62, 129–141.
10. Hatsuyama V.: Histological studies on the reinnervation of denervated muscle with special reference to the collateral branching. *Electromyography*, 1966, 6, 71–73.
11. Hawley R. J., Cohen M. H., Saini N., Armbrustmaher V. W.: The carcinomatous neuropathy of oat cell lung cancer. *Ann Neurol*, 1980, 7, 65–72.
12. Heathfield K. W., Williams J. R. B.: Peripheral neuropathy and myopathy associated with bronchogenic carcinoma. *Brain*, 1954, 77, 122–137.
13. Henson R. A., Russel D. S., Wilkinson M.: Carcinomatous neuropathy and myopathy: A clinical and pathological study. *Brain*, 1954, 77, 82–121.
14. Hildebrand J., Coërs C.: The neuromuscular function in patients with malignant tumors – electromyographic and histological study. *Brain*, 1967, 90, 67–82.
15. Janiszewski L.: Mikroelektrodowe badania obwodowego układu nerwowego i mięśniowego. *Studia Soc Scien Tor*, 1969, 3, 7–17.
16. Kelly J. J. Jr, Kelly R. A., Miles J. M., Dyck P. J.: Osteosclerotic myeloma and peripheral neuropathy. *Neurology*, 1983, 33, 202–210.
17. Koczocik-Przedpeńska J., Łukaszewski B., Kaczmarek J.: Attempts of evoking experimentally the collateral reinnervation of muscle. *Europa Medicophysica*, 1973, 9, 133–138.
18. Lambert E. H., Eaton L. M., Rooke E. D.: Defect of neuromuscular conduction associated with malignant neoplasms. *Am J Physiol*, 1956, 187, 612–613.
19. Lambert E. H., Rooke E. D.: Myasthenic state and lung cancer. In: The remote effects of cancer on the nervous system. New York – London, 1965, 67–82.
20. McArdle J. J., D'Alonzo A. J.: Effects of terbutaline, a β_2 adrenergic agonist, on the membrane potentials of innervated and denervated fast- and slow-twitch muscles. *Exp Neurol*, 1981, 71, 134–143.
21. Mrozek K.: The effect of muscle denervation and immobilization on membrane resting potential. *Acta Physiol Pol*, 1973, 24, 409–415.
22. Politis J., Varkey B., Funahashi A.: Eaton-Lambert syndrome: case report. *Milit Med*, 1980, Jan., 19–20.
23. Poloni A. E., Sala E.: Electroencephalogr *Clin Neurophysiol*, 1962, Suppl 22, 17, cyt. I. Hausmanowa-Petrusewicz 1980.
24. Rebeiz C.: The structure and function of muscle. Ed. G. H. Bourne. New York, London, 1973, vol 4, 393–395.
25. Rouhani S., Iovino M., Poenaru S.: Electromyographic values in normal and magnesium-deficient rats. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1983, 56, 162–163.
26. Schlaepfer W. W.: Axonal degeneration in the sural nerves of cancer patients. *Cancer*, 1974, 34, 371–381.
27. Simpson J. A.: The myasthenic (Eaton-Lambert) syndrome associated with carcinoma. Enzyme induction as a possible mechanism of paraneoplastic syndrome. *Scott Med J*, 1982, 27, 220–228.
28. Vital C., Bonnaud E., Arne E.: Polyneuritis in chronic lymphoid leukemia. Ultrastructural study of the peripheral nerve. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1975, 32, 169–172.

Author's address: Department of Pathophysiology of Locomotor Organs, Institute of Orthopedic Surgery and Rehabilitation, School of Medicine, 135-147, 28 Czerwca Str., 61-545 Poznań, Poland.

PRZEMYSŁAW NOWACKI¹, DOROTA DOLIŃSKA²

ZMIANY ZWYRODNIENIOWE W UKŁADZIE NERWOWYM W CHŁONIAKACH ZŁOŚLIWYCH NIEZIARNICZYCH*

¹Klinika Neurologii, Instytut Neurologiczno-Psychiatryczny i ²Klinika Hematologii,
Instytut Chorób Wewnętrznych, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

U chorych na białaczki i chłoniaki stosunkowo dobrze poznane są powikłania krwotoczne i naciekowe w układzie nerwowym, zwłaszcza ośrodkowym (Mossakowski i wsp. 1962; Law, Blom 1977; Jellinger, Slowik 1978). Mniej uwagi poświęca się zmianom zwyrodnieniowym w układzie nerwowym u tych chorych. Opisywane są tak zwane zespoły paranowotworowe o określonym obrazie klinicznym i układowych zmianach neuropatologicznych; należą do nich między innymi: podostre zwyrodnienie mózdzku (Greenlee, Brashear 1983; Nowacki i wsp. 1989), paranowotworowe zapalenie mózgu (Kuchna 1987) i podostra mielopatia martwicza, a ze strony nerwów obwodowych — podostra neuropatia czuciowa (Stefansson, Arnason 1987). Zespoły te występują jednak stosunkowo rzadko. Pozostaje zatem problem zmian zwyrodnieniowych w układzie nerwowym u pozostałych chorych zmarłych z powodu chłoniaków. W tej części badań przeanalizowano charakter i częstość występowania zmian zwyrodnieniowych w układzie nerwowym u chorych na chłoniaki złośliwe nieziarnicze (ChZN).

MATERIAŁ I METODY

Badania neuropatologiczne wykonano u 30 chorych obu płci, w wieku od 17 do 75 lat (\bar{x} = 43,5), leczonych i zmarłych w Klinice Hematologii PAM w latach 1980–1988 z powodu ChZN. Typ chłoniaka ustalono na podstawie badania histopatologicznego węzła chłonnego według klasyfikacji kilońskiej oraz badań cytologicznych i immunologicznych komórek chłoniakowych izolowanych z krwi chorych. Kliniczny okres choroby u chorych z chłoniakiem limfocytowym określano według Rai i wsp. (1984), innych typów chłoniaków zgodnie z klasyfikacją z Ann Arbor. Wszyscy chorzy w chwili zgonu znajdowali się w IV okresie choroby (lokalizacja pozawęzłowa bez nacieków w układzie nerwowym). W 15 przypadkach rozpoznano chłoniak limfoblastyczny (w tym 1 typu T), w 5 centrocytowy, w 4 immunoblastyczny, w 3 centroblastyczny

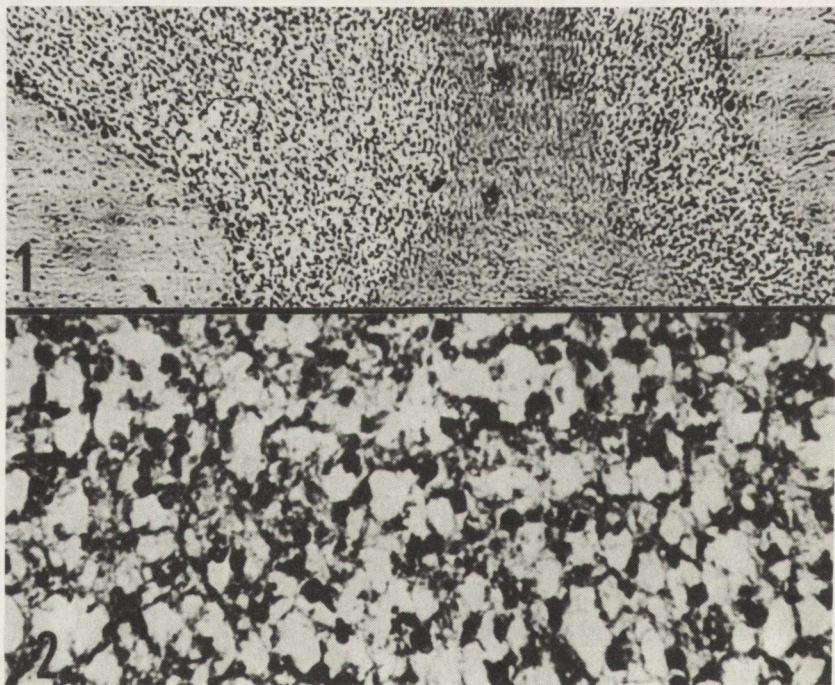
* Praca wykonana w ramach Programu Rządowego PR-6 nr 11.5.

i w 3 immunocytowy. Preparaty z miejsc typowych (płat czołowy, potyliczny, skroniowy, jądra podstawy, most, opuszka, mózdzek z jądrem zębatym, rdzeń kręgowy, korzenie rdzeniowe i fragment nerwu barwiono fioletem krezyłu (FK), hematoksyliną i eozyną (HE) oraz według metod: Heidenhaina, Holzera, van Giesen, a ze skrawków mrożonych według metody Bielschowsky'ego.

WYNIKI

1. Zmiany neuronalne

Dotyczyły one zarówno struktury, jak i ilości komórek nerwowych. Największe zmiany obserwowano w korze mózgu, jądrach zębatych mózdzku, niekiedy w formacjach szarych mostu, najrzadziej w jądrach podstawy. Zmiany w neuronach polegały przede wszystkim na obrzmieniu komórki, nierównomiernym rozłożeniu i rozpadzie tigroidu. Stwierdzono je w 15 przypadkach (50%), przy czym w 7 z nich (23%) były one wyraźne i współistniały z wakuolizacją komórek. Dotyczyły przede wszystkim III i V warstwy kory mózgu i jąder własnych mostu. Rzadziej obserwowano schorzenie przewlekłe neuronów z ich obkurczeniem. Zmiany te występowały częściej w jądrach zębatych niż w korze mózgu, zwykle w głębszych jej warstwach.



Ryc. 1. Rozlane przerzedzenie warstwy ziarnistej kory mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 63 ×
 Fig. 1. Diffuse rarefaction of cerebellar granular layer. Cresyl violet. ×63

Ryc. 2. Kora mózdzku. Wyraźne przerzedzenie warstwy ziarnistej ze zgąbczeniem podłoża. H-E.
 Pow. 240 ×

Fig. 2. Cerebellar cortex. Distinct rarefaction of granular layer with spongy changes of tissue structure. H-E. ×240

W 17 przypadkach (56%) w korze mózgu, zwłaszcza płatów czołowych, spotykano tak zwane „puste pola” – miejsca pozbawione neuronów, bez zmian strukturalnych podłoża. W 7 przypadkach (23%) zjawisko to było wyraźne. Także w 7 przypadkach (23%) stwierdzono niewielkie przerzedzenie kory płatów czołowych i potylicznych, w 4 innych (13%) przerzedzenie było wyraźne, a w 2 (6%) rozlane, graniczące z zanikiem warstw. Przerzedzenie obserwowano również w jądrach zębatych – w 12 przypadkach (40%) niewielkie, w 6 (20%) wyraźne. Często z przerzedzeniem współistniał odcinkowy zanik neuronów tych jąder: 10 przypadków (33%), w tym w 5 (17%) wyraźny. W 8 przypadkach (26%) obserwowano zmiany w warstwie ziarnistej kory mózdzku: w 6 z nich (20%) pod postacią niewielkiego przerzedzenia, w 2 przypadkach (6%) przerzedzenia wyraźnego, rozlanego, ze zgąbczeniem podłoża (ryc. 1, 2). We wszystkich przypadkach występowało umiarkowane lub niewielkie odcinkowe przerzedzenie warstwy komórek Purkiniego. Pozostałe neurony tej warstwy często były nieco obkurczone, ciemne. Podścielisko warstwy zwojowej nie wykazywało zmian.

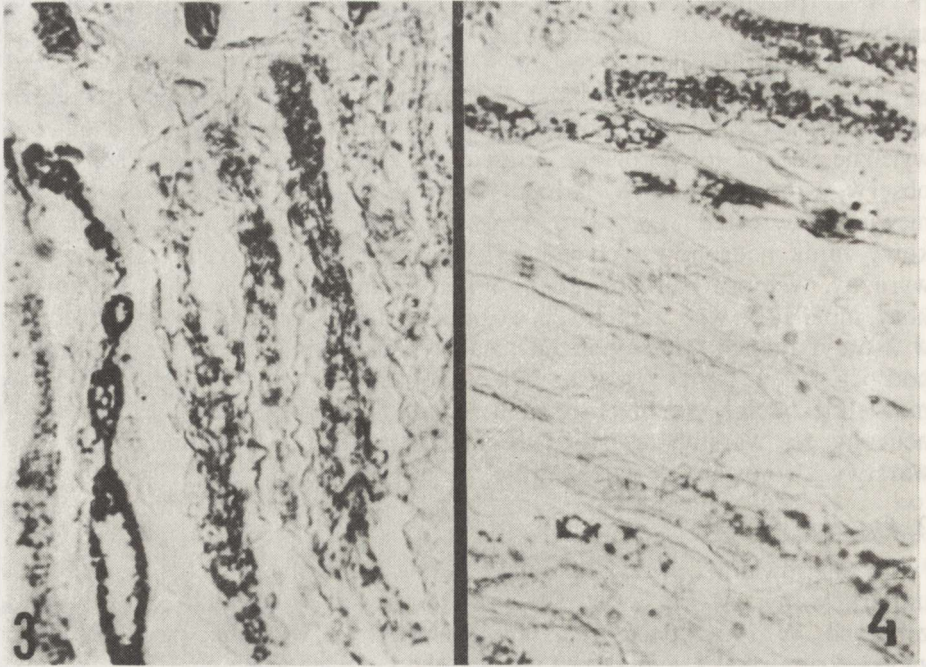
2. Odczyn glejowy

Występował w 16 przypadkach (53%): w 10 z nich (33%) był niewielki bądź umiarkowany, zwykle w istocie białej podkorowej, jądrach oliwy i jądrach zębatych. W 7 przypadkach (23%) glejoza była wyraźna, na ogół rozlana, zwykle komórkowa, jednak bez postaci reaktywnych astrogleju. W 10 przypadkach (33%) stwierdzono podobne nasilenie odczynu astrocytarnego i mikroglejowego. W pozostałych 6 przypadkach (20%) przeważał odczyn mikroglejowy. Dotyczyło to głównie sąsiedztwa jąder oliwy i jąder zębatych. Odczyn gleju Bergmanna* stwierdzono w 10 przypadkach (33%), przy czym w 1 był on wyraźny i miał charakter rozlany. Nie stwierdzono zależności między nasileniem odczynu gleju Bergmanna i stopniem uszkodzenia warstwy ziarnistej lub zwojowej.

3. Uszkodzenie mieliny i zmiany aksonalne

Mielina ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wykazywała niewielkie zmiany i to tylko w pojedynczych przypadkach. W 4 z nich (13%) stwierdzono nieznaczne obrzmienie osłonek mielinowych, w 1 drobne pola spłowienia w półkulach mózgu. Włókna podkorowe nie były uszkodzone. W OUN nie stwierdzono istotnych zmian w aksonach, także w obszarach włókien o obrzękniętej lub spłowiałej mielinie. Znacznie większe zmiany dotyczyły mieliny obwodowego układu nerwowego. W 16 przypadkach (57%) zarówno w korzeniach, jak i nerwach obserwowano rozlane obrzmienie osłonek mielinowych, przy czym w 10 (33%) było ono wyraźne, a w 6 (20%) miało charakter odcinkowy. Demielinizację stwierdzono w 12 przypadkach (40%), z czego w 6 (20%) całkowitą, w 4 (13%) prawie całkowitą – obrzmiate, rozpadające się osłonki otaczały tylko pojedyncze fragmenty włókien (ryc. 3, 4). W pozostałych 2 przypadkach (6%) demielinizacja miała charakter odcinkowy.

Zmiany aksonalne dotyczyły zwykle włókien grubych. W korzeniach rdzeniowych obserwowano ich zblednięcie i miejscowe, niewielkie obrzmienie (12 przypadków – 40%) (ryc. 5). Tylko w 8 przypadkach (26%) spotykano wyraźniejsze rozdęcia i fragmentację włókien. W nerwach obwodowych zmiany



Ryc. 3. Korzeń rdzeniowy. Wyraźnie uszkodzone osłonki mielinowe na pograniczu całkowitej demielinizacji. Heidenhain. Pow. 240 ×

Fig. 3. Spinal root. Demyelination with fragments of markedly impaired myelin sheaths. Heidenhain. × 240

Ryc. 4. Nerw obwodowy. Prawie całkowita demielinizacja włókien, widoczne fragmenty obrzmiałych i zwakuolizowanych osłonek. Heidenhain. Pow. 240 ×

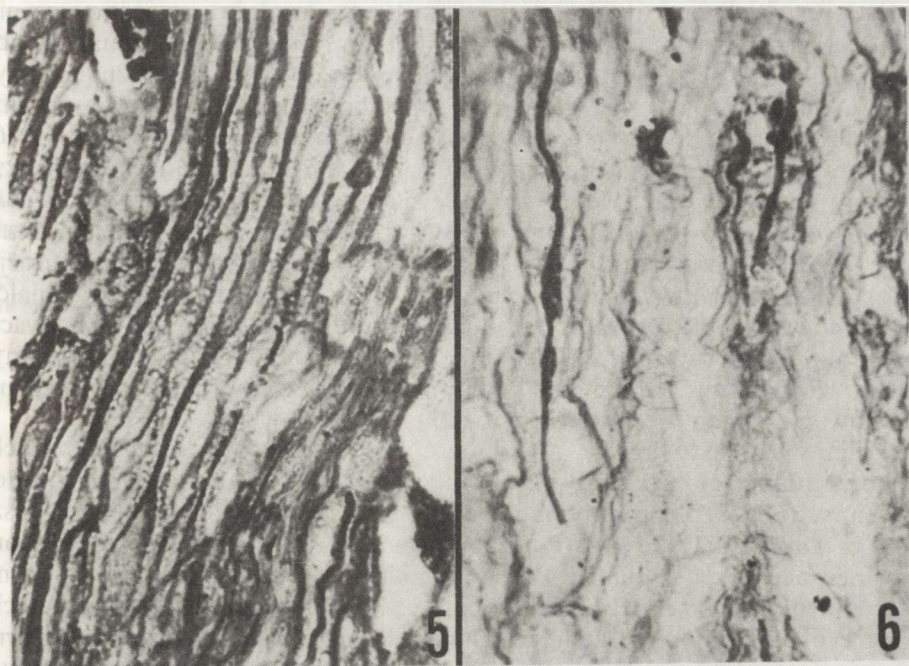
Fig. 4. Peripheral nerve. Area of complete demyelination. Fragments of swollen and vacuolated myelin sheaths are also visible. Heidenhain. × 240

aksonalne stwierdzono w 20 przypadkach (66%). Zmiany były tu zwykle bardzo wyraźne. W 15 przypadkach (50%) polegały na licznych rozdęciach włókien, ich fragmentacji prowadzącej do całkowitego zaniku i rozległych ubytków (ryc. 6).

Z reguły w korzeniach rdzeniowych przeważały zmiany o charakterze demielinizacji, natomiast w utkaniu nerwów obwodowych nasilenia nieprawidłowości mieliny i aksonów były podobne, bądź przeważały uszkodzenia aksonalne.

4. Inne zmiany

Polegały na niewielkim lub umiarkowanym śródmiąższowym obrzęku istoty białej, ograniczonym bądź rozlanym, zwłaszcza w mózdzku i obwodowych częściach rdzenia kręgowego (sznury boczne i tylne). Cechy obrzęku występowały również w lokalizacji okołonaczyniowej, głównie okołozylnej. U 1 chorego, który zmarł w wieku 56 lat, stwierdzono wyraźne zeszkliwienie i pogrubienie naczyń, zwłaszcza tętniczych średniej wielkości. Również w 1 przypadku (63 lata) obserwowano umiarkowane zwłóknienie naczyń istoty białej i pogrubienie naczyń korowych.



Ryc. 5. Korzeń rdzeniowy. Odcinkowy obrzęk i zblednięcie aksonów. Holmes. Pow. 240 ×
 Fig. 5. Spinal root. Segmental swelling of nerve fibers. No conspicuous axonal changes. Holmes. × 240

Ryc. 6. Nerve obwodowy. Zanik aksonów, widoczne fragmenty pojedynczych, wyraźnie uszkodzonych włókien. Holmes. Pow. 240 ×
 Fig. 6. Peripheral nerve. Loss of axons. Fragments of single damaged fibers are only visible. Holmes. × 240

W większości przypadków zmiany dotyczyły także wyściółki. Polegały one na jej ścięczeniu aż do zaniku włócznie oraz przerzedzeniu i obrzmieniu komórek. Zanik wyściółki i pola obnażenia obserwowano częściej w komorach bocznych i komórce III, obrzmienie komórek i ich przerzedzenie w wodociągu mózgu oraz komórce IV.

OMÓWIENIE

Badania nasze wykazały, że w ChZN zmiany zwyrodnieniowe częściej i wyraźniej występowały w obwodowym układzie nerwowym. Zwraca uwagę fakt, że w korzeniach rdzeniowych, zwłaszcza ogona końskiego, wyraźnie przeważały zmiany, które oceniliśmy jako pierwotnie demielinizacyjne. W nerwach obwodowych uszkodzenie mieliny i aksonów było podobne, zwykle wyraźne, a w wielu miejscach zmiany aksonalne, na przykład o charakterze rozległych ubytków przeważały nad uszkodzeniami osłonek mielinowych. Skłoniło to nas do wysunięcia przypuszczenia, że w nerwach obwodowych dominowało zwyrodnienie aksonalne. Nie stwierdziliśmy obecności tak zwanych „onion bulbs”, uznawanych za wynik powtarzającej się de- i remielinizacji

(Dyck 1975; Schoene 1977; Rafałowska 1984). Trudno jest jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, jakie jest pochodzenie opisywanych zmian w obwodowym układzie nerwowym u chorych na ChZN. Spośród różnych przyczyn, takich jak toksyczne, genetyczne, metaboliczne, niedoborowe czy immunologiczne (Garson i wsp. 1982; Minna, Bunn 1982; Ang i wsp. 1986) bardzo ważną rolę wydają się odgrywać pierwsze z wymienionych, zwłaszcza związane z chemioterapią. Jedną z przyczyn różnic w obrazie neuropatologicznym może być sposób podawania cytostatyków i ich rodzaj. Wskazują na to nasze wstępne obserwacje, z których wynika, że pierwotna demielinizacja w korzeniach rdzeniowych jest, być może, skutkiem bezpośredniego, dokanałowego podawania metotrexatu, natomiast zwyrodnienie aksonalne w nerwach obwodowych między innymi chemioterapii dożylną, zwłaszcza winkrystyny. Należy również uwzględnić ewentualny wpływ nacieków chłoniakowych na powstawanie zmian w obwodowym układzie nerwowym.

Zmiany zwyrodnieniowe w OUN dotyczyły głównie formacji szarych. W korze półkul mózgu miały one przede wszystkim charakter zmian niedokrwiennych, na ogół proporcjonalnych do wieku chorych. Można przypuszczać, iż wiązały się one z ostrymi zaburzeniami krążenia mózgowego, które rozwinęły się przed zgonem. Bardziej „układowy” charakter miały zmiany zwyrodnieniowe w mózdzku. Należy podkreślić, że uszkodzenie jąder zębatach, głównie o typie ubytków neuronalnych, było zjawiskiem znacznie częstszym niż zmiany w korze mózdzku. W jej obrębie przeważało uszkodzenie warstwy ziarnistej, które w 2 przypadkach przybrało postać rozlanego przerzedzenia, przypominającego cerebellopatię typu II, opisywaną między innymi w chłoniakach (Trotter i wsp. 1967; Tsapatsoris 1979). Pochodzenie zmian zwyrodnieniowych w OUN nie zostało dotychczas wyjaśnione. Wydaje się, że większość z nich, zwłaszcza w formacjach szarych półkul i pnia mózgu powstaje w wyniku niedotlenienia i niedokrwienia tkanki nerwowej w okresach zaostrzenia choroby podstawowej. Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany zwyrodnieniowe tkanki nerwowej nie mają charakteru swoistego dla ChZN. Można je także spotkać u chorych na inne nowotwory, umiejscowione poza układem nerwowym (Nowacki 1987; Honczarenko 1989). Należy podkreślić znacznie częstsze występowanie zmian neuropatologicznych — w naszym materiale do 60%, zwłaszcza w obwodowym układzie nerwowym, w porównaniu z obrazem klinicznym, w którym objawy uszkodzenia układu nerwowego opisywane są w kilkunastu procentach.

WNIOSKI

1. W ponad połowie przypadków chłoniaków złośliwych niezziarnicznych zmiany zwyrodnieniowe przeważają w obwodowym układzie nerwowym, gdzie występują w postaci pierwotnej demielinizacji w korzeniach rdzeniowych i zwyrodnienia aksonalnego w nerwach obwodowych.

2. Większość zmian zwyrodnieniowych w ośrodkowym układzie nerwowym, zwłaszcza w półkulach i pniu mózgu, powstaje najprawdopodobniej w wyniku ich niedotlenienia i niedokrwienia w okresach zaostrzeń choroby, zwłaszcza pod koniec życia chorego.

DEGENERATIVE CHANGES WITHIN THE NERVOUS SYSTEM
IN NON-HODGKIN'S LYMPHOMAS

Summary

The purpose of the paper was an attempt to become better acquainted with the character and incidence rate of degenerative changes within the nervous system in non-Hodgkin's lymphomas. Neuropathological studies were carried out in 30 patients, aged 17–75 years, deceased due to: lymphoblastic lymphoma (15 cases), centrocytic (5 cases), immunoblastic (4 cases), centroblastic (3 cases) and immunocytic lymphoma (3 cases). The investigations revealed that degenerative changes prevail in the peripheral nervous system: within the spinal roots in the form of primary demyelination and within peripheral nerves of axonal degeneration.

PIŚMIENICTWO

1. Ang L. C., Zochodne D. W., Ebers G. C., Kaufmann J. C., Winters H. V.: Severe cerebellar degeneration in patients with T cell lymphoma. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1986, 69, 171–175.
2. Dyck P. I.: Pathologic alterations of the peripheral nervous system of man. W: *Peripheral neuropathy*. Red.: P. I. Dyck, P. K. Thomas, E. H. Lambert. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, 1975.
3. Garson J. A., Beverly P. C., Coakham H. B., Horper E. J.: Monoclonal antibodies against human T-lymphocytes label Purkinje neurons of many species. *Nature*, 1982, 298, 375–377.
4. Greenlee J., Brashear H.: Antibodies to cerebellar Purkinje cells in patients with paraneoplastic cerebellar degeneration and ovarian carcinomas. *Ann Neurol*, 1983, 14, 609–613.
5. Honczarenko K.: Ocena wtórnych nieprzerzutowych zmian w układzie nerwowym w przebiegu chorób nowotworowych spoza układu nerwowego. *Dział Wydawnictw PAM, Szczecin*, 1989.
6. Jellinger K., Slowik F.: Beteiligung des Nervensystems bei Leukosen und malignen Lymphomen. *Zbl Allg Pathol*, 1978, 122, 439–461.
7. Kuchna I.: Zespół paranowotworowego zapalenia mózgu. *Neuropatol Pol*, 1987, 25, 211–217.
8. Law I. P., Blom J.: Adult central nervous system leukemia – incidence and clinicopathologic features. *South Med J*, 1977, 69, 1054–1061.
9. Minna J., Bunn P.: Paraneoplastic syndromes. W: *Cancer. Principles and practice of oncology*. Red.: V. de Vita, S. Hellman, S. Rosenberg. Lippincott Comp., Philadelphia, Toronto, 1982.
10. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Iwanowski L.: Zespoły neuropatologiczne w białaczkach. *Rozprawy Wydziału Nauk Med. PAN, Warszawa*, 1962, 7, 157–184.
11. Nowacki P.: Patogeneza zmian neuropatologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w ostrych białaczkach nielimfoblastycznych i przelomie blastycznym przewlekłej białaczki szpikowej u dorosłych. *Dział Wydawnictw PAM, Szczecin*, 1987.
12. Nowacki P., Fryze C., Kulczycki J., Honczarenko K.: Zmiany zwyrodnieniowe w mózdku w białaczkach nielimfoblastycznych u dorosłych. *Neuropatol Pol*, 1989, 27, 269–278.
13. Rafałowska J.: Dojrzewanie mieliny, demielinizacja i remielinizacja w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. *Neuropatol Pol*, 1984, 22, 1–22.
14. Schoene W. C., Carpenter C., Behan P. O., Geschwind N.: "Onion bulb" formation in the central and peripheral nervous system in association with multiple sclerosis and hypertrophic polyneuropathy. *Brain*, 1977, 100, 755–763.
15. Stefansson K., Arnason B.: Neurologic manifestations of systemic neoplasia. W: *Harrison's principles of internal medicine*. Red.: E. Braunwald. Mc Graw-Hill Book Comp., New York, 1987.
16. Trotter J. L., Hendin B. A., Osterland K.: Cerebellar degeneration with Hodgkin's disease. An immunological study. *Arch Neurol*, 1967, 33, 660–661.
17. Tsapatsoris N.: Cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Arch Intern Med*, 1979, 139, 828–830.

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

ANTONI GODLEWSKI, JÓZEF SZCZECH

ENCEPHALOMENINGITIS CHRONICA EOSINOPHILICA
W PRZEBIEGU WĄGRZYCY MÓZGU

Katedra Neurologii, Akademia Medyczna, Poznań

Wągrzycę u ludzi wywołują wyłącznie larwalne formy tasiemca uzbrojonego *Taenia solium*. Schorzenie stanowi typowy błąd w biologicznej determinacji transmisji pasożyta. Wągrzy *Taenia solium* mogą umiejscawiać się w różnych narządach i tkankach: w mięśniach mózgu, sercu, kościach, gałce ocznej, skórze (Pawłowski 1982).

Wągrzyca mózgu klinicznie może manifestować się szeregiem różnorodnych objawów i zespołów: napadami drgawkowymi, objawami ogniskowymi, wodogłowiem, zanikiem mózgu, zapaleniem mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych, zaburzeniami zachowania, a nawet objawami psychotycznymi. Często towarzyszą im objawy wzmożonego ciśnienia śródczaszkowego (Trelles, Trelles 1978; McCormick i wsp. 1982; Torrealba i wsp. 1984).

Wągrzyca jest najbardziej rozpowszechnioną chorobą pasożytniczą układu nerwowego, występuje na wszystkich kontynentach i we wszystkich strefach klimatycznych. Stanowi szczególnie dotkliwy problem diagnostyczny, terapeutyczny, a nawet społeczny w krajach trzeciego świata (Ameryka Płd. i Środk., Azja Płd.-Wsch., Afryka) (Trelles, Trelles 1978), gdzie spowodowana jest głównie drastycznymi zaniedbaniami podstawowych zasad higieny, uwarunkowanymi nie tylko ubóstwem i zacofaniem, ale również czynnikami kulturowymi. W Meksyku np. wągrzyca mózgu stanowi 9% wszystkich przyjęć do oddziałów neurologicznych, 30% wszystkich kraniotomii, 3,6% wszystkich badań autopsyjnych (Biagi 1972). W Polsce wągrzyca układu nerwowego należy obecnie do rzadkości, chociaż jeszcze 30-40 lat temu była schorzeniem zdecydowanie częstszym (Stępień, Choróbski 1949; Stępień 1962).

Poniżej przedstawiamy przypadek przewlekłego zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych w przebiegu wągrzyicy mózgu, z eozynofilią w płynie mózgowo-rdzeniowym.

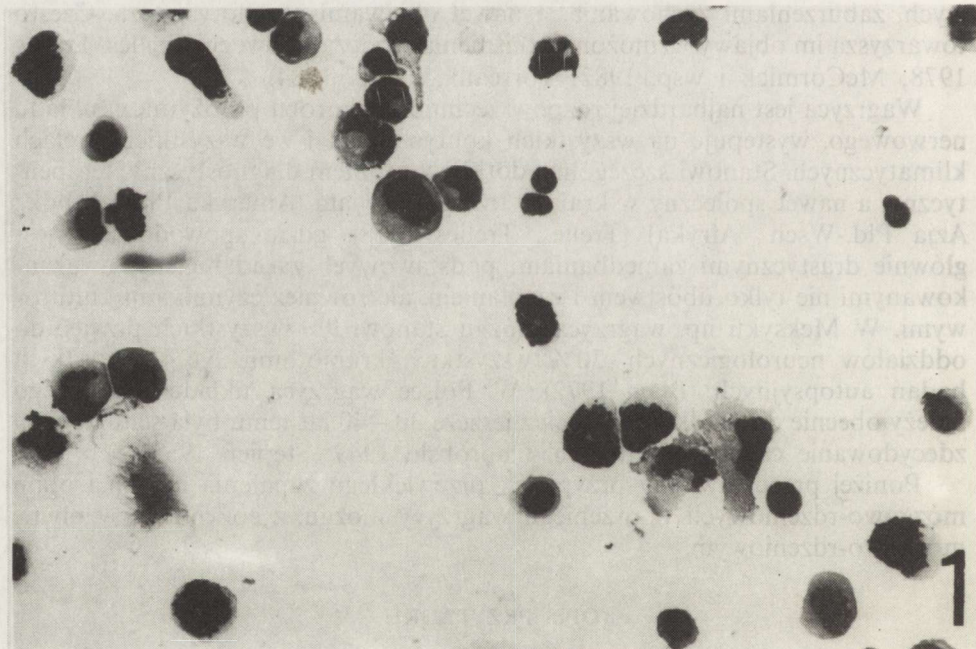
OPIS PRZYPADKU

Chora lat 60, przyjęta do kliniki z powodu występujących od około 3 miesięcy bólów i zawrotów głowy, zaburzeń równowagi, osłabienia, apatii, dezorientacji, zaburzeń pamięci. Powyższe objawy stopniowo nasilały się.

Nigdy poważnie nie chorowała, przez wiele lat pracowała w zakładach mięsnych, mieszkała w jednorodzinny domu na peryferiach miasta hodując w przydomowym gospodarstwie kilka świń, kury.

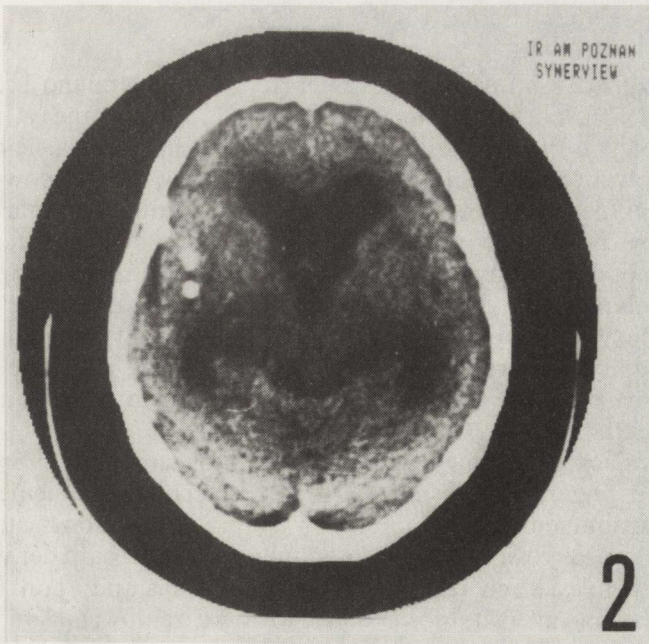
Badaniem neurologicznym z odchyień stwierdzono wygórowanie odruchów fizjologicznych w lewych kończynach bez patologicznych objawów piramidowych, mało precyzyjne próby mózdkowe, zwłaszcza w lewych kończynach, niewielkie osłabienie kończyn dolnych. Dno oka obustronnie bez zmian. W stanie psychicznym zwracała uwagę wesołkowatość, okresowa euforia.

W płynie mózgowo-rdzeniowym liczba krwinek białych podwyższona do $98/\text{mm}^3$ i nieco podwyższony poziom białka (0,52 g/l), lewostronna, paralityczna krzywa złotowa. W osadzie płynu mózgowo-rdzeniowego 43% limfocytów, 31% monocytów, 16% eozynofili, 10% komórek plazmatycznych (ryc. 1). We krwi obwodowej zwiększony do 9% odsetek krwinek kwasochłonnych. Badanie TK głowy wykazało wodogłowiowe poszerzenie układu komorowego, zwłaszcza komór bocznych, w prawym wzgórzu wzrokowym niewielkie, nerkowate ognisko hipodensyjne oraz obecność kilku zwapnień w prawym płacie skroniowym i ciemieniowym (ryc. 2). Badania serologiczne krwi obwodowej i płynu mózgowo-rdzeniowego w kierunku kiły, listeriozy, brucellozy, toksokarozy, włośnicy i wągrzycy ujemne. Dodatni (miano 1:128) odczyn hemaglutynacji z antygenem bąblowcowym przy jednoczesnych ujemnych odczynach w kierunku bąblowicy w testach immunofluorescencyjnych i immunoprecypitacyjnych. Dodatnie odczyny serologiczne we krwi w kierunku



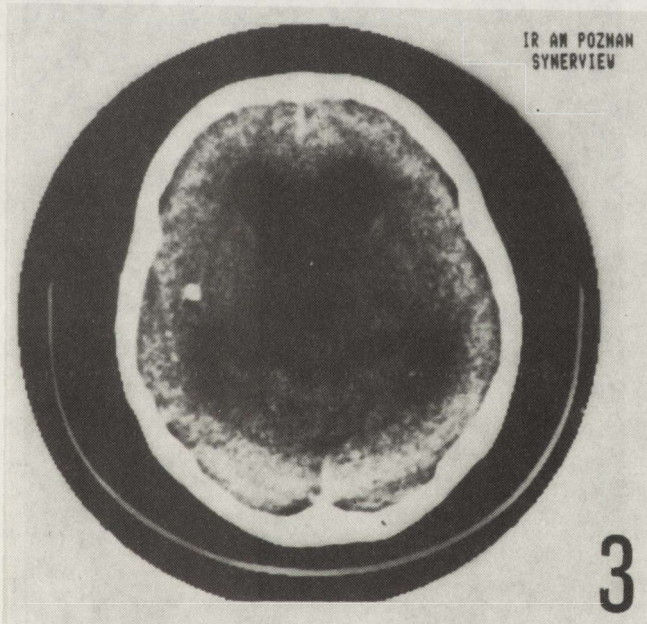
Ryc. 1. Osad płynu mózgowo-rdzeniowego. Widoczne komórki limfocytarne, monocyty, komórki eozynofilne. Pappenheim. Pow. 800 \times

Fig. 1. The morphology of CSF sedimentation. Lymphocytes, monocytes and eosinophilic leucocytes are visible. Pappenheim \times 800



Ryc. 2. Tomografia komputerowa głowy. Trzeci miesiąc choroby. Widoczne poszerzenie układu komorowego, w prawym płacie skroniowym i ciemieniowym grudkowate zwapnienia

Fig. 2. CT brain picture in 3rd month of the illness. Widening of the ventricular system and nodular calcifications in right temporal and parietal lobes are visible



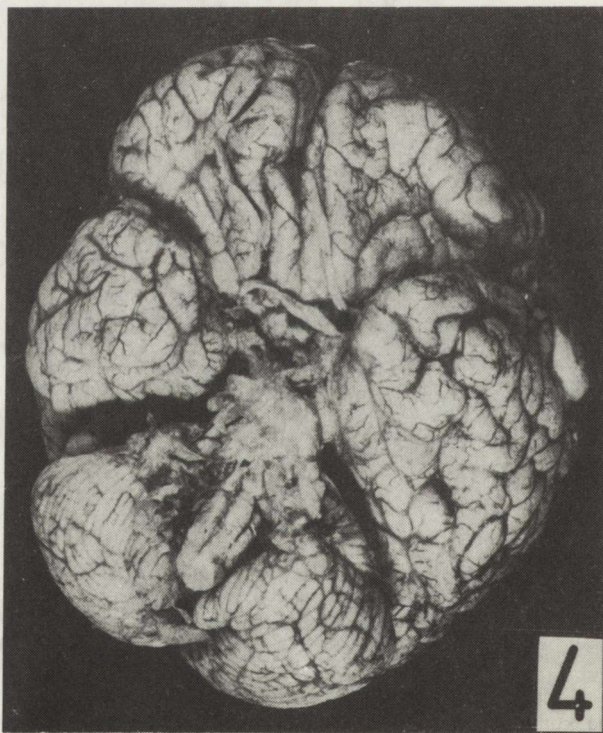
Ryc. 3. Tomografia komputerowa głowy. Dwunasty miesiąc choroby. Większe niż poprzednio poszerzenie układu komorowego

Fig. 3. CT brain picture in 12th month of the illness. Larger widening of the ventricular system as compared with Fig. 2

toksoplazmozy: odczyn immunofluorescencji pośredniej (miano 1:256), odczyn aglutynacji (1:20), odczyn Sabina-Feldmana (1:50), ujemne w płynie mózgowo-rdzeniowym. Przez okres około 15 miesięcy chora czuła się dość dobrze, poza umiarkowanymi bólami głowy, niewielkimi zawrotami głowy i ogólnym spowolnieniem, bez dolegliwości. Kilkakrotne kontrolne badania płynu mózgowo-rdzeniowego wykazywały nadal podwyższenie cytozy z eozynofilią do 17%, miernie podwyższonym poziomem białka i lewostronną krzywą złotową. Kontrolne badania TK głowy wykazywały stopniowo narastające wodogłowie o cechach okluzyjnego (ryc. 3). W badaniach serologicznych nadal obecne były dodatnie odczyny w kierunku toksoplazmozy we krwi i ujemne w kierunku pozostałych pasożytów. Chora leczona Daraprimem i Rovamycyną, bez większego efektu.

Po 15 miesiącach od chwili pierwszej hospitalizacji stan chorej zaczął się systematycznie pogarszać. Nasiliła się dezorientacja, spowolnienie, stopniowo pojawiły się zaburzenia świadomości, wystąpiły czterokończynowe objawy piramidowe i mózdkowe. Chora była stopniowo coraz bardziej wyniszczona. Po dwudziestu miesiącach od początku choroby nastąpił zgon wśród narastających objawów niewydolności oddechowo-kръżeniowej.

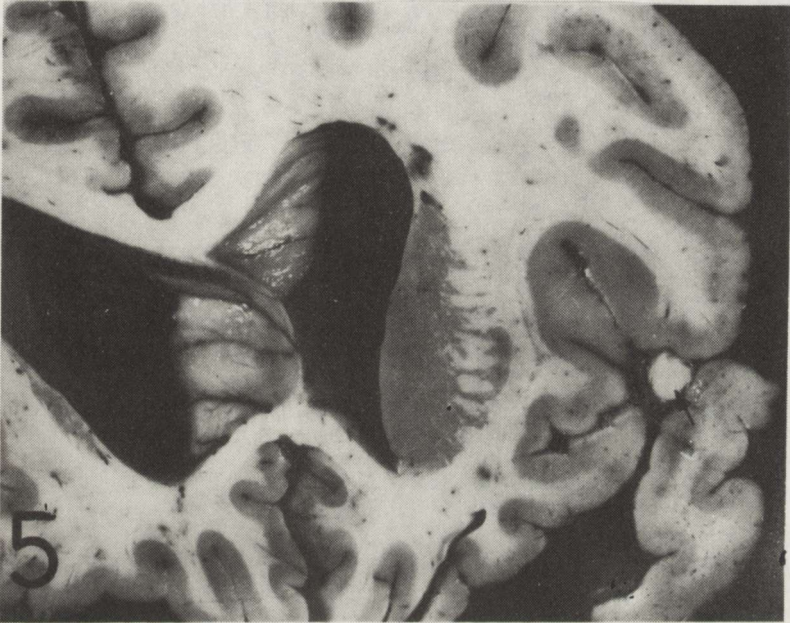
Sekcji ogólnej, na prośbę rodziny, nie wykonano. Na sekcji mózgowia stwierdzono zmleczenie i pogrubienie opon miękkich, zwłaszcza na sklepiści w pobliżu szczeliny wielkiej. Na podstawie mózgu, w okolicy zbiornika



Ryc. 4. Liczne, zlewające się torbiele w zbiornikach podstawy mózgu

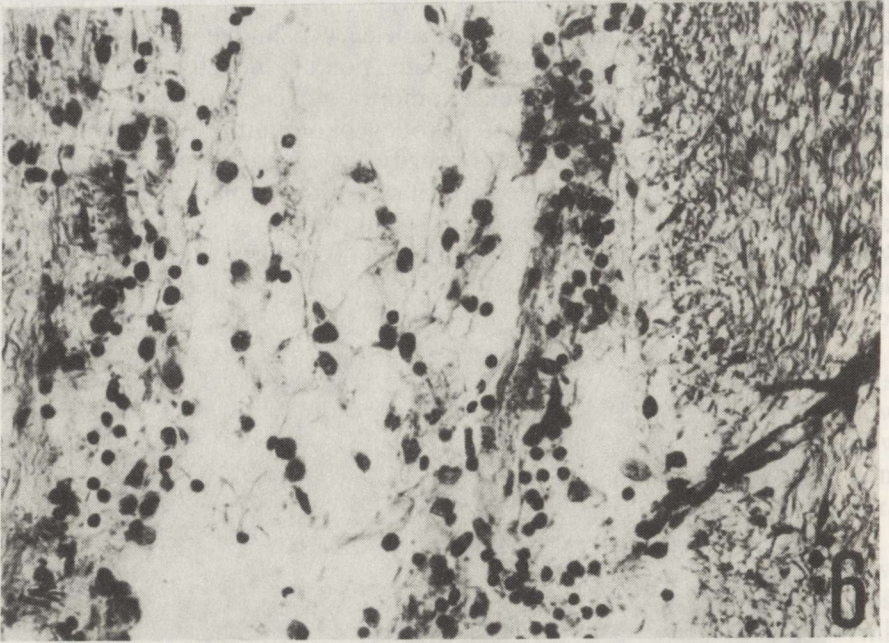
Fig. 4. Numerous confluent cysts in brain base cisternae

międzykonarowego i wokół brzusznej powierzchni mostu widoczne były liczne, szaro-żółtawe zlewające się ze sobą torbiele, wypełnione galaretowatą masą (ryc. 4). Na przekrojach poprzecznych przez półkule mózgu kora wąska, istota biała poszerzona, znaczne poszerzenie komór bocznych, bardziej lewej. W istocie białej, zwojach podstawy, wzgórz, okolicy okołokomorowej liczne drobne, punkcikowate wybroczyny. W głębi bruzdy Sylwiusza po stronie prawej (ryc. 5), w torebce zewnętrznej prawej, u podstawy gałki bladej lewej niewielkie, okrągłe, twardsze od otaczającej tkanki, białawe twory o średnicy 3–4 mm. W obrębie pnia mózgu i rdzenia kręgowego makroskopowo zmian patologicznych nie stwierdzono.



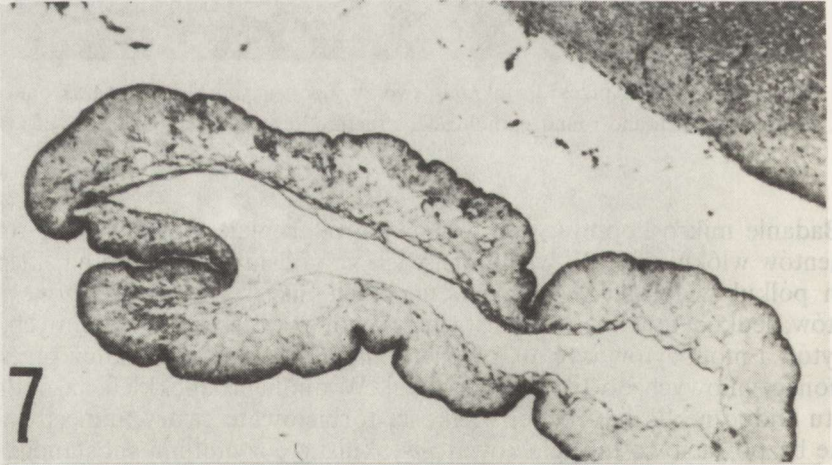
Ryc. 5. Lity, białawy, na przekroju okrągły twór w oponach miękkich płata skroniowego
 Fig. 5. Compact whitish and round pathological structure located in leptomeninges of temporal lobe

Badanie mikroskopowe: opony miękkie pogrubiłe głównie przez rozplem elementów włóknistych. W wielu miejscach na podstawie mózgu i na sklepistościach półkul widoczne w oponach miękkich nacieki zapalne złożone z limfocytów, leukocytów wielojądrazstych, w tym również kwasochłonnych, plazmacytów i monocytów (ryc. 6). Niekiedy nacieki te wnikają wzdłuż przestrzeni okołonaczyniowych do tkanki nerwowej. W oponach miękkich na podstawie mostu widoczne liczne, różnej wielkości torbielowate twory, mniejsze wypełnione bezpostaciową lub igiełkowato-włóknistą, eozynofilną substancją, większe – puste w środku (ryc. 7), o dość szerokiej ścianie, pokryte od zewnątrz rzędem niewielkich, okrągławych lub wydłużonych komórek (ryc. 8). W jednym z rowków międzypajowowych w okolicy szczeliny Sylwiusza lity, okrągły twór o średnicy 3–4 mm wypełniony włóknistą, eozynochłoną, luźno ułożoną na



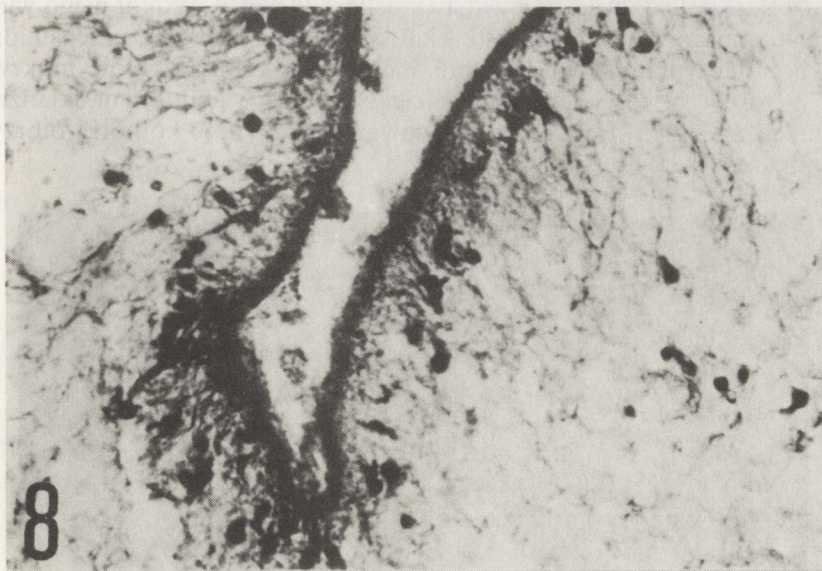
Ryc. 6. Opony miękkie brzusznej części mostu. Luźny naciek zapalny w oponach miękkich złożony z komórek limfocytarnych i monocytów z domieszką komórek plazmatycznych i kwasochłonnych H—E. Pow. 480 ×

Fig. 6. Leptomeninges of pons base. Loose inflammatory infiltration of lymphocytes, monocytes, plasma cells and eosinophilic leucocytes. H—E. ×480



Ryc. 7. Część podstawna mostu. Luźno leżący w oponach miękkich torbielowaty twór — martwy pasożyt w okresie lizy wewnętrznej. H—E. Pow. 120 ×

Fig. 7. The pons base. Cystic structure loosely lying in leptomeninges — a parasite in the period of internal lysis. H—E. ×120



Ryc. 8. Większe powiększenie struktury z ryc. 7. Widoczna ściana zbudowana z luźnej, ubogokomórkowej tkanki wyścielona od środka jamy niewielkimi, okrągłymi lub wydłużonymi komórkami. H—E. Pow. 420 ×

Fig. 8. Larger magnification of structure from Fig. 7. The cyst wall composed of loose tissue poor in cells, the lumen of the cyst lined with small, round or oval cells. H—E. 420 ×



Fig. 9. Lita struktura w oponach miękkich szczeliny Sylwiusza zbudowana z bezkomórkowej włóknistej substancji, otoczona oskórką i naciekiem zapalnym w oponach miękkich. H—E. Pow. 180 ×

Fig. 9. Compact structure in leptomeninges of Sylvian fissurae, composed of acellular fibrillar substance, surrounded by cuticula and inflammatory infiltration in leptomeninges. H—E. 180 ×

obwodzie substancją, otoczony warstwą oskórka (ryc. 9). Wokół niego widoczna torebka zbudowana z włóknistej tkanki łącznej z licznymi, przepelnionymi krwinkami naczyniami krwionośnymi, niekiedy z okołonacyniowymi krwotokami. W torebce i w jej otoczeniu nacieki zapalne o podobnym składzie jak w oponach miękkich. Ponadto obserwowano pojedyncze komórki olbrzymie, wielojądrzaste (ryc. 10).



Ryc. 10. W oponach miękkich płata skroniowego olbrzymia, wielojądrzasta komórka w nacieku zapalnym w otoczeniu pasożyta. H—E. Pow. 540 ×

Fig. 10. Multinuclear giant cell in inflammatory infiltration of temporal lobe leptomeninges in neighbourhood of parasite. H—E. × 540

Śródmózgowo widoczne przepelnienie krwinkami naczyń krwionośnych, niekiedy drobne nacieki zapalne wokół niektórych naczyń krwionośnych, zmiany neuronalne o typie schorzenia ischemicznego i przewlekłego w licznych komórkach nerwowych kory mózgu, struktur podkorowych i pnia mózgu oraz rozsiane ubytki komórek nerwowych w korze mózgu i w korze mózdzku. Nigdzie nie stwierdzono zmian mikroskopowych typowych dla toksoplazmozy ośrodkowego układu nerwowego.

Rozpoznanie histopatologiczne: *cysticercosis cerebri*. Obserwowane torbielowate lub lite twory odpowiadają martwemu pasożytowi w okresie lizy wewnętrznej. Dodatkowym potwierdzeniem jest wynik badania immunohistofluorescencyjnego wykonanego na materiale autopsyjnym w Zakładzie Parazytologii Lekarskiej Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie (nr 4748), gdzie wykazano swoistą fluorescencję z surowicą przeciwwągrową w odczynie immunofluorescencji pośredniej.

OMÓWIENIE

Eozynofilia w płynie mózgowo-rdzeniowym może towarzyszyć licznym zakażeniom OUN, zwykle spowodowanym obecnością pasożytów (tab. 1). Większość z tych stanów chorobowych występuje, ze względu na naturalne

Tabela 1. Przyczyny eozynofilii w płynie mózgowo-rdzeniowym wg Arseni i Chimion (1978), zmodyfikowana

-
1. Zakażenia wywołane przez płazińce:
 - przywry wątrobowe (*Distomum hepaticum*)
 - schistosomatoza (*Schistosoma sp.*)
 - paragonimoza (*Paragonimus westermani*)
 2. Zakażenia wywołane przez obleńce:
 - angiostrongyloidoza (*Angiostrongylus cantonensis*)
 - gnathostomoza (*Gnathostoma sp. inaequalis*)
 - włośnica (*Trichinella spiralis*)
 - owsica (*Ascaris lumbricoides*)
 - toksokaroza (*Toxocara cani et catis*)
 - cysticerkoza (*Taenia solium*)
 - bęblowica (*Echinococcus sp.*)
 - filariozy (głównie *Dirofilaria immitis*)
 3. Toksoplazmoza
 4. Odczyny alergiczne na:
 - farby i rozpuszczalniki nitrowe
 - białko rybie
 - surowicę końską
 - szczepionkę przeciwko wściekliźnie
 - tworzywa sztuczne (np. wszczepioną zastawkę)
 5. Inne schorzenia OUN
 - guzy mózgu (*medulloblastoma, glioblastoma multiforme*)
 - kiła układu nerwowego
 - pneumokokowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych
 6. Ziarniniak eozynofilny oczodołu i białaczki eozynofilne
-

miejsce bytowania pasożyta, wyłącznie w strefie sub- i tropikalnej, należą tu zwłaszcza te infekcje pasożytnicze, w których wzrost zawartości komórek kwasochłonnych w płynie mózgowo-rdzeniowym jest jednym z najbardziej typowych i stałych objawów chorobowych (*Angiostrongylus cantonensis, Gnathostoma sp. inaequalis*) (Arseni, Chimion 1978). W średnich szerokościach geograficznych (Europa, Ameryka Płn.) eozynofilię w płynie mózgowo-rdzeniowym spotyka się niekiedy w przebiegu włośnicy, toksoplazmozy, bęblowicy, wągrzyca, toksokarozy, owsicy. W klimacie umiarkowanym sporadycznie spotyka się również przypadki, zwykle o łagodnym przebiegu, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu z obecnością komórek kwasochłonnych w płynie mózgowo-rdzeniowym, przy czym na ogół nie udaje się ustalić czynnika etiologicznego. Z opisów kazuistycznych znane są przypadki eozynofilii w płynie mózgowo-rdzeniowym, towarzyszącej miejscowym lub ogólnoustrojowym reakcjom alergicznym (Kuwert i wsp. 1968; Jeanes 1965), guzom mózgu (Contamin i wsp. 1972). Wzrost odsetka komórek kwasochłonnych w płynie mózgowo-rdzeniowym w przebiegu wągrzyca mózgu uważany był, zwłaszcza przez starszych autorów, za jeden z charakterystycznych objawów (Trelles, Trelles 1978).

Jak wspomniano we wstępie, wągrzyca mózgu może klinicznie manifestować się różnorodnymi objawami i zespołami. Nierzadkie są nietypowe postacie schorzenia, przebiegające m.in. pod postacią postępujących zespołów otępień-

nych (Sandyk i wsp. 1987). Przełomowym momentem w diagnostyce wągrzycy mózgu stało się zastosowanie tomografii komputerowej głowy (TK) (Byrd i wsp. 1982; Minguetti, Ferreira 1983). Masowe badania TK głowy spowodowały znaczny wzrost częstości wykrywania wągrzycy mózgu (Richards i wsp. 1985). Nie jest to niestety badanie pozwalające we wszystkich przypadkach wągrzycy mózgu postawić prawidłowe rozpoznanie. Zwłaszcza wągrów zlokalizowanych w układzie komorowym i w zbiornikach podstawy mózgu często nie udaje się wykryć w badaniu TK głowy. Pomocne wówczas są techniki diagnostyczne oparte na badaniu TK głowy w połączeniu z pneumoencefalografią lub wentrykulografią (Madrazo i wsp. 1981; 1983).

Drugim elementem współczesnej diagnostyki wągrzycy mózgu są badania serologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego (Rydzewski i wsp. 1975; Mohammad i wsp. 1984; Corona i wsp. 1986). Niestety badania te mają ograniczoną wartość kliniczną ze względu na czułość nie przekraczającą 90% (Corona i wsp. 1986) i możliwość występowania reakcji krzyżowych z innymi odczynami (Rydzewski i wsp. 1975), co miało miejsce w opisywanym przez nas przypadku.

Dotychczas otwartą pozostaje sprawa leczenia wągrzycy mózgu. Do początku lat osiemdziesiątych jedyną możliwością terapii przyczynowej było leczenie operacyjne, o ile ilość i lokalizacja wągrów na to pozwalała. Często pozostawało leczenie paliatywne — leki obniżające ciśnienie śródczaszkowe, operacyjne wszczępienie zastawki. Od kilku lat obiecującym wydaje się zastosowanie Praziquantelu, leku przenikającego przez barierę krew-mózg, niszczącego węgry we wszystkich fazach rozwoju (Santiago i wsp. 1983; Sotelo i wsp. 1985). Do rozwiązania pozostał szereg problemów terapeutycznych wynikłych podczas stosowania tego preparatu. Działa on neurotoksycznie, może powodować powstanie reakcji neuroalergicznym przypominających zapalenie mózgu, stąd też próby kojarzenia go z glikokortykosteroidami (Pawłowski 1988).

ENCEPHALOMENINGITIS CHRONICA EOSINOPHILICA CAUSED BY CYSTICERCOSIS CEREBRI

Summary

The authors describe a case of *encephalomeningitis chronica eosinophila* in a 60-year-old woman. The etiology was not investigated clinically. The autoptic diagnosis was cerebral cysticercosis.

PIŚMIENNICTWO

1. Arseni C., Chimion D.: *Angiostrongylus cantonensis* (Eosinophilic meningitis). W: Handbook of Clinical Neurology, vol. 35. Red.: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1978, 321–342.
2. Biagi F.: Epidemiologia de la cysticercosis en Mexico. *Gac Med Mex*, 1972, 103, 227–230.
3. Byrd S. E., Locke G. E., Biggers S., Percy A. K.: The computed tomographic appearance of cerebral cysticercosis in adult and children. *Radiology*, 1982, 144, 819–823.
4. Contamin F., Bantman C., Lancaster F., Koubi G., Strul J.: Hypereosinophilie sanguine et eosinophilie du L. C. R. accompagnant l'évolution d'un glioblastome cérébral. *Ann Med Interne (Paris)*, 1972, 123, 895–899.

5. Corona T., Pascoe D., Gonzalez-Barranco D., Abad P., Landa L., Estanol B.: Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1986, 49, 1044–1049.
6. Jeanes A. L.: Cerebrospinal eosinophilia following Torkildsen's operation. *Guy's Hosp Rep*, 1965, 114, 28–31.
7. Kuwert E., Klosterkötter W., Linzenmeier G.: Neurologische Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung. *Med Klin*, 1968, 63, 1326.
8. Madrazo I., Garcia Renteria J. A., Paredes G., Olhagaray B.: Diagnosis of intraventricular and cisternal cysticercosis by computerised tomography with positive intraventricular contrast medium. *J Neurosurg*, 1981, 55, 947–951.
9. Madrazo I., Garcia Renteria J. A., Sandoval M., Lopez Vega F. J.: Intraventricular cysticercosis. *Neurosurgery*, 1983, 12, 148–152.
10. McCormick G. F., Zee C.-S., Heiden J.: Cysticercosis cerebri. Review of 127 cases. *Arch Neurol*, 1982, 39, 534–539.
11. Minguetti G., Ferreira M. V. C.: Computer tomography in neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1983, 46, 936–942.
12. Mohammad I., Heiner D., Miller B., Goldberg M., Kagan I.: Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. *J Clin Microbiol*, 1984, 20, 775–779.
13. Pawłowski Z.: Dane niepublikowane, 1988.
14. Pawłowski Z.: Taeniasis and cysticercosis. W: *CRC Handbook Series in Zoonoses: C. Parasitic Zoonoses*. Red: L. Jacobs, J. H. Steele. Boca Raton, RCR Press, 1982, 313–347.
15. Richards F. O., Schantz P. M., Ruiz-Tiben E., Sorvillo F. J.: Cysticercosis in Los Angeles Country. *J. A. M. A.*, 1985, 254, 3444–3448.
16. Rydzewski A. K., Chishelm E. S., Kagan I. G.: Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, direct immunofluorescent antibodies and agar gel precipitin tests. *J Parasitol*, 1975, 61, 154–155.
17. Sandyk R., Bamford C., Iacono R. P., Gillman M. A.: Cerebral cysticercosis presenting as progressive dementia. *Int J Neurosci*, 1987, 35, 251–254.
18. Santiago Grisolia J., Wielderholt W. C.: Praziquantel therapy for cysticercosis, *Arch Neurol*, 1983, 40, 257–258.
19. Sotelo J., Torres B., Rubio-Donnadieu F., Escobedo F., Rodriguez-Carbajal J.: Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. *Neurology*, 1985, 35, 752–755.
20. Stępień L.: Cerebral cysticercosis in Poland: clinical symptoms and operative results in 132 cases. *J Neurosurg*, 1962, 19, 505–513.
21. Stępień L., Choróbski J.: Cysticercosis cerebri and its operative treatment. *Arch Neurol Psychiatry*, 1949, 61, 499–527.
22. Torrealba G., Del Villar S., Tagle P., Arriagada P., Kase C. S.: Cysticercosis of the central nervous system: clinical and therapeutic consideration. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1984, 47, 784–790.
23. Trelles J. O., Trelles L.: Cysticercosis of the nervous system. W: *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 35. Red.: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1978, 291–320.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii Katedry Neurologii Akademii Medycznej, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

JANUSZ SZYMAŚ¹, KONSTANTIN-ALEXANDER HOSSMANN²,
FRIEDRICH WEBER³, UTE OSCHLIES²

GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN IN HUMAN GLIOBLASTOMA*

¹Department of Clinical Pathomorphology, School of Medicine, Poznań, Poland,

²Max-Planck-Institute for Neurological Research,

Department of Experimental Neurology, Cologne, FRG,

³Neurosurgical Clinic, Hospital Cologne-Merheim, FRG

Immunohistochemical detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) is frequently helpful for the histological diagnosis of glial tumors of the CNS (Deck et al. 1978; Duffy et al. 1979; DeArmond et al. 1980; Bonnin, Rubinstein 1984; Szymaś 1985 and others). Glioblastomas usually contain areas of glial differentiation and some authors tend to classify glioblastomas in the glioma group (Budka 1984). It is, therefore, of interest to know the significance of GFAP reactivity in glioblastoma. Several previous studies have dealt with this problem but the results are controversial. Although biochemical data indicate that glioblastoma may contain considerable amounts of GFAP (Jacque et al. 1978; Rasmussen et al. 1980), immunohistochemical evaluation have revealed various intensity of the GFAP reaction (Van der Meulen et al. 1978; Pasquier et al. 1983; Bonnin, Rubinstein 1984; Reifenberger et al. 1987) or even such glioblastomas which were GFAP-negative (Gottschalk, Szymaś 1987).

The present study was carried out to investigate the occurrence of GFAP in glioblastoma and to compare the immunohistochemical findings obtained in formaldehyde-fixed material at the light and electron microscopic level with the GFAP content quantified by biochemical analysis.

MATERIAL AND METHODS

Fifty two cases of glioblastoma were studied. Samples were collected from routine surgical materials of the Neurosurgical Department, School of Medicine in Poznań and the Neurosurgical Clinic, Hospital Cologne-Merheim. Only those cases were evaluated in which biopsy material was large enough to allow histological examination of different tumor regions, and which were

* Supported by the Governmental Grant PR9-06 for Fighting Cancer.

unequivocally diagnosed as glioblastoma multiforme according to criteria of WHO classification (Zülch 1979).

For light microscopy, 5 μm paraffin serial sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and acidic phosphotungstic hematoxylin (PTAH), according to the modified method of Clark and Powers (1976). In addition, Cajal impregnations were carried out, using the modification for paraffin-embedded material (Descalzo 1963).

Immunohistochemical evaluation of GFAP was carried out in paraffin sections of all 52 cases of glioblastoma, using the peroxidase-antiperoxidase method of Sternberger et al. (1970). Polyclonal antibodies against human GFAP were produced in rabbits as described before (Szymaś, Morkowski 1984). Monoclonal anti-GFAP antibody against GFAP from porcine spinal cord (clone G-A-5) (Debus et al. 1983), was purchased from Boehringer (Marburg). Monoclonal anti-GFAP antibody against GFAP from paraformaldehyde fixed grade II astrocytoma (Paetau et al. 1985) was purchased from LabSystem (Helsinki). Rabbit anti-mouse IgG, swine anti-rabbit IgG and soluble peroxidase-antiperoxidase complex (PAP) were obtained from Dako-patts (Copenhagen).

In five cases electron microscopical localization of GFAP activity was carried out by pre-embedding immunoperoxidase staining. Small tumor samples obtained during surgery were immediately fixed in a mixture of 4% paraformaldehyde, 0.2% glutaraldehyde and 0.2% picric acid in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and left for 4 h at room temperature. Thereafter, the samples were transferred to a fixative of the same composition except glutaraldehyde, for 10 h at 4°C. Sections 10–50 μm thick were cut with a Vibratome tissue sectioner (Lancer), rinsed in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and then stored for 24 h in phosphate buffered saline (PBS). The sections were processed for immunohistochemistry at 4°C under continuous slow shaking as follows: The slides were rinsed for 3 h in 0.15 M NaN_3 to block endogenous peroxidase, preincubated for 12 h with 2% normal swine serum and then exposed for 48 h to monoclonal antibodies against GFAP protein, diluted 1:250. After rinsing with PBS, the sections were incubated first in rabbit anti-mouse serum for 24 h and — after another rinse in PBS — secondly in swine anti-rabbit serum for 24 h. Following another rinse in PBS, they were incubated with PAP diluted in PBS (1:400) for 12 h. The PAP complex was visualized after incubation in 0.075% diaminobenzidine and 0.005% hydrogen peroxide in 50 mM Tris HCl buffer (pH 7.4). Afterward the sections were postfixated for 1 h in 2% OsO_4 in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) dehydrated in ethanol and embedded in Araldite. Ultrathin sections, with or without counterstaining with lead citrate and uranyl acetate, were examined in the electron microscope (EM 109 Zeiss). Photographs were taken on Agfa Ortho Film (Agfa-Gevaert).

The specificity of the immunohistochemical staining was ascertained using anti-GFAP antibodies previously absorbed by purified GFAP. Complete absorption of anti-GFAP serum was confirmed by radioimmunoassay.

GFAP was quantified in 6 cases of glioblastoma by rocket immunoelectrophoresis according to Axelsen and Bock (1983). The samples were examined by phase-contrast microscopy to ascertain the tumor origin, and then stored at

-20°C until use. Frozen material was transferred into a cold extraction medium containing: 1 mM ethylene diamine tetraacetic acid. Na salt (EDTA) (Serva), 20 000 units/l Aprotinin (Trascolan, Polfa), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (Sigma), 1% Triton (Fluka) in 50 mM Na-phosphate buffer, pH 8.0. Samples were cut in small pieces and homogenized with a teflon pestle for 2–3 min at 8 000 rpm. The homogenate was centrifuged at 20 000 g for 60 min, and supernatants were collected. In three cases the insoluble residue tissue was further processed. For this purpose, pellets were resuspended in extraction buffer (pH 8.0) containing: 50 mM Na phosphate, 1 mM EDTA, 20 000/1 Aprotinin, 1 mM PMSF, 5% sodium dodecyl sulphate (SDS) (Serva) and centrifuged at 20 000 for 60 min. Supernatants were collected, and rocket immunoelectrophoresis was performed in 1% agarose gel containing 2.3 µl anti-GFAP serum/cm² and 1% Triton X-100. SDS-containing samples were repeatedly dialysed against large volumes of electrode buffer with 1% Triton X-100. Standard dilutions of purified GFAP were made using the same electrode buffer.

RESULTS

All 52 glioblastomas were highly cellular and consisted of anaplastic, round, elongated or pleomorphic cells, usually with scanty cytoplasm. Only large globular and polymorphic cells, possessed abundant, eosinophilic and homogenous cytoplasm. In some of these cells the cytoplasm spread in broad processes. The nuclei were hyperchromatic with different irregular configurations, sometimes displaying gigantism and multilobulation. Cells with two or more nuclei were also observed. Mitotic figures were frequent. Necrotic foci were common and surrounded by cells with elongated nuclei forming pseudopalisades. There was also considerable proliferation of blood vessels. PTAH staining did not reveal any fibrous material inside the cytoplasm in any of the tumor cells. However, this stain made sometimes dark blue fibrils visible inside the processes. Cajal impregnations were positive, but only areas with large pleomorphic cells exhibited large amounts of silver deposits.

Immunohistochemistry of serial paraffin sections revealed GFAP positivity in all tumors, although not in a uniform way. In 17 cases consisting mainly of anaplastic small, round, elongated, or spindle cells with scanty cytoplasm and sparse processes, the reaction with anti-GFAP serum was weak (Fig. 1). Some of these GFAP-positive cells were in contact with blood vessels or infiltrated the pia mater. Thirty five other tumors were mainly composed of large polymorphic cells with abundant cytoplasm. Some cells were globular, others extended into large processes. The GFAP reaction product was visible in many of these cells and ranged from diffuse yellow staining to condensed dark brown colour (Fig. 2). Sometimes, the reaction product was only found in cell processes. GFAP positivity was most common in arrangements of tumor cells around blood vessels (Fig. 3), astroblastic formations, subpial infiltrations and glial cells. Polyclonal and monoclonal anti-GFAP antibodies reacted in a similar way, but the staining with monoclonal antibodies was less intense.

Electron microscope cytochemistry was performed in five tumors. In these cases tumor cells were of varying size and shape. The cytoplasm of the cells was

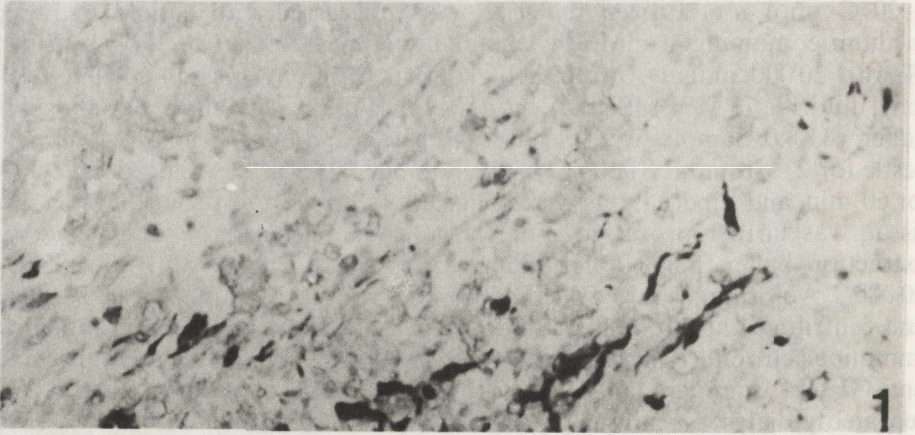


Fig. 1. Pattern of immunohistochemical reaction of tumor cells of "primary" glioblastoma. Weak GFAP positivity visible only in some small anaplastic and spindle cells. $\times 120$

Ryc. 1. Wzorzec reakcji immunohistochemicznej komórek nowotworowych „pierwotnego” glejaka wielopostaciowego. GFAP-dodatni odczyn widoczny w nielicznych małych anaplastycznych i wrzecionowatych komórkach. Pow. $120\times$

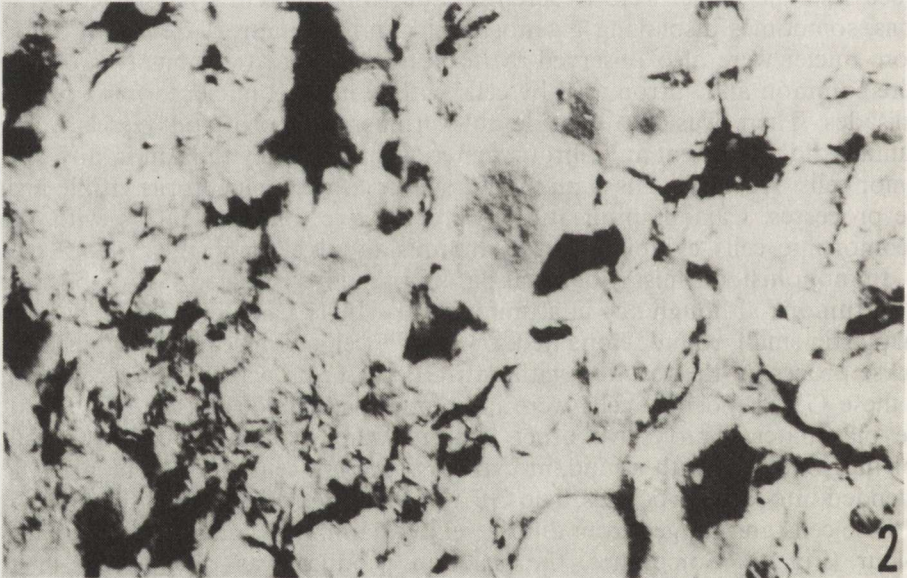


Fig. 2. Pattern of immunohistochemical reaction of tumor cells of "secondary" glioblastoma. Reaction ranged from diffuse to condensed staining in most tumor cells. In some cells only processes are visible. $\times 400$

Ryc. 2. Wzorzec reakcji immunohistochemicznej komórek nowotworowych „wtórnego” glejaka wielopostaciowego. Produkty reakcji (od rozlanego do silnie zagęszczonego odczynu) obecne w większości komórek nowotworowych. Pow. $400\times$

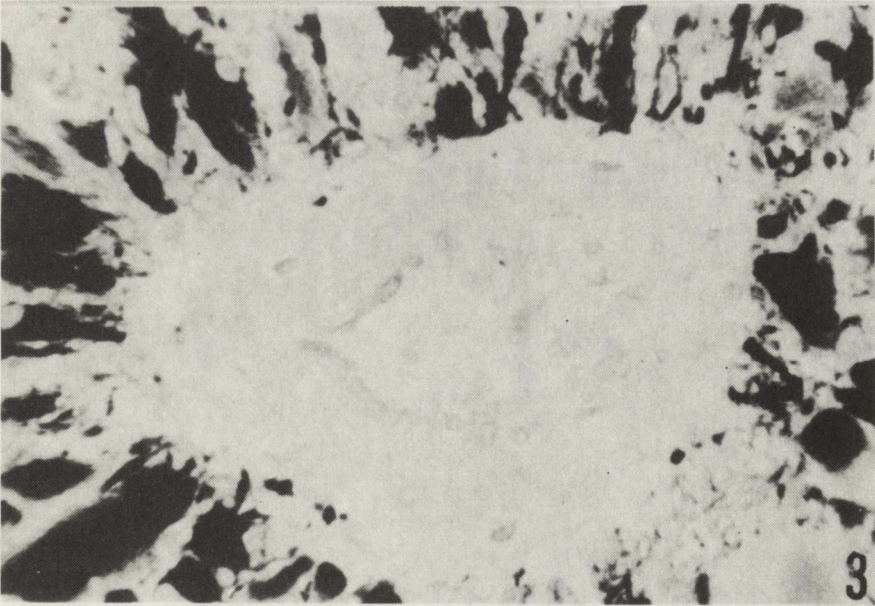


Fig. 3. Perivascular pattern of GFAP positivity in glioblastoma cells. Hemalum counterstain. $\times 400$

Ryc. 3. Okołonaczyniowy układ GFAP-dodatnich komórek glejaka. Preparat podbarwiony hematoksyliną. Pow. $400\times$

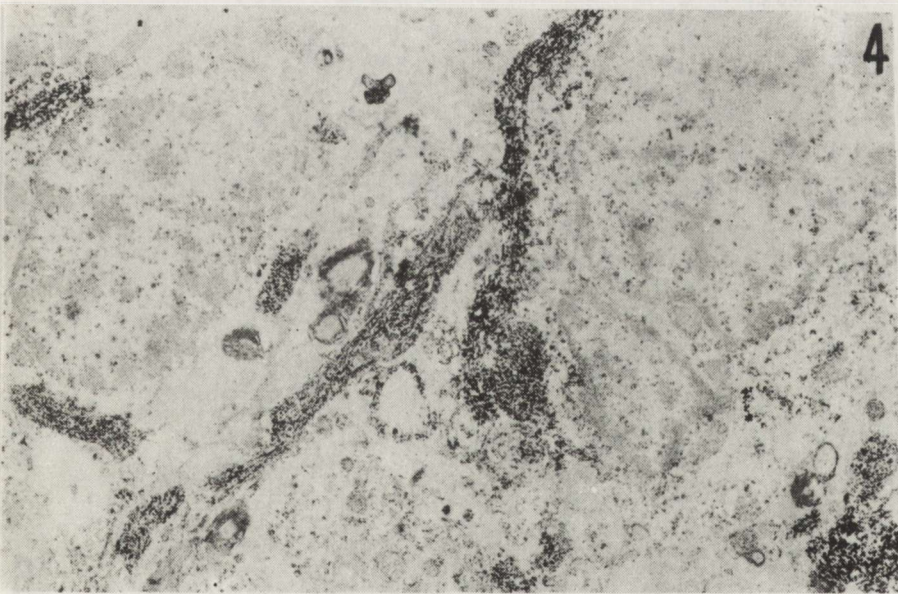


Fig. 4. Tumor cells with signs of nuclear anaplasia. Some tumor cell processes reveal GFAP positivity. Without counterstaining. $\times 5068$

Ryc. 4. Komórki nowotworowe z wykładnikami atypii jąder komórkowych. Część wypustek komórek nowotworu wykazuje GFAP-dodatni odczyn. Bez kontrastowania. Pow. $5068\times$

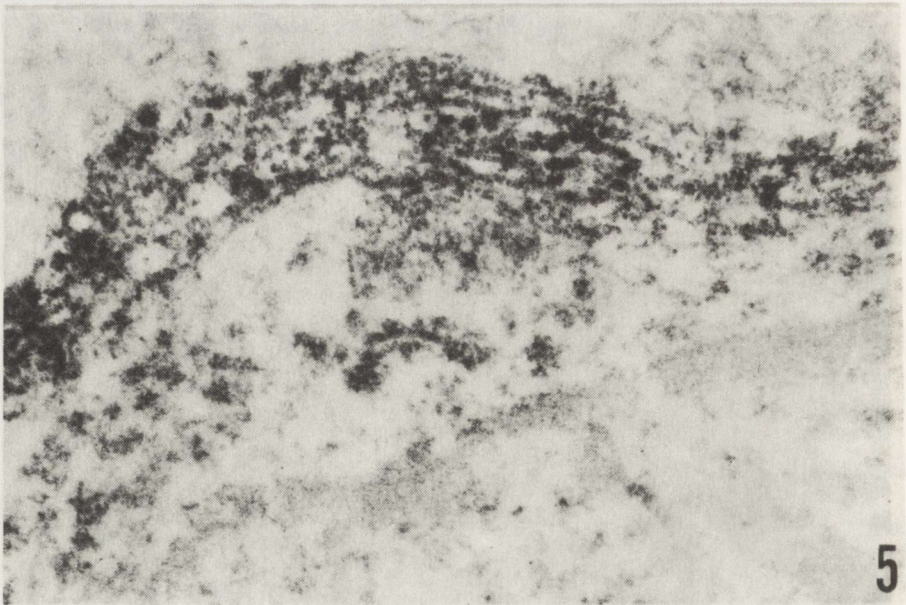


Fig. 5. Coarse reaction products decorate cytoplasmic filaments. Without counterstaining. $\times 27514$

Ryc. 5. Gruboziarniste produkty reakcji immunohistochemicznej układają się na przebiegu włókienek znajdujących się w cytoplazmie. Bez kontrastowania. Pow. $27514 \times$

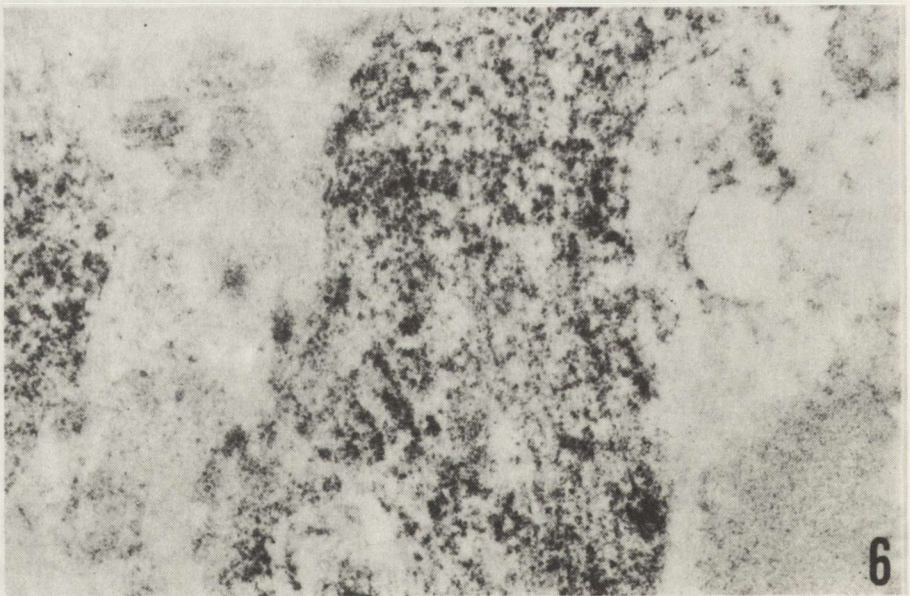


Fig. 6. Two processes filled with intermediate filaments with dense peroxidase reaction products. Without counterstaining. $\times 27514$

Ryc. 6. Dwie wypustki zawierające liczne włókienka pośrednie z obfitymi produktami reakcji immunohistochemicznej. Bez kontrastowania. Pow. $27514 \times$

confined to a narrow perinuclear rim and contained numerous polyribosomes and mitochondria. GFAP immunoreactivity was better visible in unstained sections and was confined mainly to intermediate filaments in the cytoplasm and processes (Fig. 4). However, some bundles of these filaments were GFAP-negative. The endoplasmic reticulum was well developed but there were only a few microtubules and GFAP-positive intermediate filaments (Fig. 5). The number of large and giant cells varied from case to case. These cells formed cytoplasmic extensions or even processes containing GFAP-positive intermediate filaments (Fig. 6). The nuclei were of irregular shape and exhibited a distinct peripheral zone of condensed chromatin and active nucleoli. In a few cells the reaction product was attached to the endoplasmic reticulum, but this was not a common feature.

In 6 samples of glioblastoma GFAP content was quantified by rocket immunoelectrophoresis. Following Triton X-100 extraction the GFAP content ranged from 2.03 mg/g w.w. to 18.3 mg/g w.w. (6.75 ± 5.53). In three tumors in which Triton X-100 insoluble residue tissue was re-extracted an additional amount of 0.25–2.98 mg GFAP/g w.w. was obtained (1.74 ± 1.08) (Table 1). Triton X-100 extraction in consequence, is able to recover 73–90% of total GFAP.

Table 1. Interdependence between water-soluble and water-insoluble GFAP

Tabela 1. Zależność pomiędzy rozpuszczalną i nierozpuszczalną frakcją GFAP

Material	GFAP water-soluble	GFAP water-insoluble	Total	GFAP water-soluble
Material	Frakcja rozpuszczalna (mg/g w.w.)	Frakcja nierozpuszczalna (mg/g w.w.)	Całkowite (mg/g w.w.)	Frakcja rozpuszczalna %
Normal white matter*	0.254	—	—	20
Prawidłowa istota biała				
Reactive white matter**	2.06 ± 0.08	1.98 ± 0.9	4.04	48
Odczynowa istota biała				
Astrocytoma pinocyticum**	6.19 ± 0.17	3.98 ± 0.19	10.17	61
Astrocytoma anaplasticum**	16.50 ± 0.58	6.41 ± 0.31	22.91	72
	5.19 ± 0.13	2.00 ± 0.07	7.19	72
Glioblastoma multiforme	2.03 ± 0.02	—	—	—
	3.01 ± 0.18	—	—	—
	3.91 ± 0.12	—	—	—
	4.84 ± 0.21	1.80 ± 0.04	6.64	73
	18.30 ± 0.75	2.98 ± 0.12	21.28	86
	2.17 ± 0.14	0.25 ± 0.02	2.42	90

w. w. — wet weight

— (mokra masa)

Data after

Dane z pracy: * Eng et al. (1976) ** Szymaś (1986)

DISCUSSION

The main histological characteristics of glioblastoma are invasive and destructive growth, infiltration, focal and often extensive areas of necrosis, proliferation of blood vessels and hemorrhages. The screening of cellular

anaplasia on HE stained sections is very subjective and should not lead to the diagnosis of glioblastoma without consideration of the above given characteristics. In the present investigation, therefore, only cases were included in which enough biopsy material was available to ascertain all these histological criteria.

It has been previously shown that HE staining is adequate for the diagnosis of glioblastoma in most cases (Zülch 1979). Other stains such as PTAH contribute little further information. In particular, this stain has failed to demonstrate glial filaments in the cytoplasm of neoplastic cells in gemistocytic astrocytoma and anaplastic astrocytoma (Szymaś 1985) and did not reveal glial filaments in the present study of glioblastoma, either. Cajal impregnations have been previously used for demonstration of astrocytic differentiation in glioblastoma. The present study indicates, that these impregnations correlate quite well with the immunohistochemical reaction against GFAP.

The intensity of GFAP immunoreactivity allows the distinction of two subgroups of glioblastoma. The first group included 17 cases of small and spindle-like cell glioblastomas with weak GFAP positivity. These tumors probably belong to the group of "primary" glioblastomas (Scherer 1940; Jellinger 1978). The second group consisted of 35 cases of pleomorphic glioblastomas with more frequent GFAP positivity. They probably correspond to the "secondary" glioblastoma of Scherer (1940) also referred to as "astrozytäres Glioblastom" (Arendt 1977) or "astrocytic type of glioblastoma" (Burger, Vogel 1982). In these tumors most intense GFAP immunoreactivity was observed in subpial infiltrations, perivascular concentrations of tumor cells, and giant cells. Conspicuous GFAP immunoreactivity of tumors with pia infiltrations has also been reported by Herpers et al. (1984) and Gullotta et al. (1985). This was interpreted as enhanced expression of GFAP in order to adapt the cytoskeleton of infiltrating cells, induced by the connective tissue in a still unknown way. In the present study GFAP positivity was also frequently observed in those cells which were in contact with the perivascular basement membrane or collagen fibers. It is conceivable that these structures influence and promote the formation of glial filaments in tumor cells. This process may be analogous to the previously demonstrated influence of the basement membrane on the cytoskeleton of spatially oriented perivascular cancer cells (Ingber et al. 1986). It has also been demonstrated that the collagen of mouse basement membrane material stimulates GFAP production in human glioblastoma (Mandybur et al. 1986), and that another component of the basement membrane, laminin, may promote differentiation of attachment cells (Dárnell et al. 1986). The most intense GFAP immunoreactivity was observed in large and giant tumor cells. It has been suggested that these cells do not proliferate or even degenerate because of the slow incorporation of precursors of nucleic acid (Hoshino et al. 1980).

In the biochemical part of our study we were able to extract two forms of GFAP: water "soluble" (Triton X-100 extraction) and water "insoluble" (SDS re-extraction). Treatment with 1% Triton X-100 results in complete disruption of cell membranes and in quantitative recovery of GFAP from cytosol with the exception of the extremely stable and water-insoluble glial filaments. This technique is commonly used for extraction of intermediate filaments and allows selective recovery of the proteins of these filaments (Apgar et al. 1985;

Wiedenmann et al. 1985; Goetschy et al. 1986; Suzuki et al. 1986). For extraction of a GFAP polymerized into glial filaments, an excess of ionic detergent such as SDS is necessary (Lee et al. 1976; Kretschmar et al. 1985). In normal rodent brain and in normal white matter of man 20–25% of GFAP is water-soluble (Eng, DeArmond 1982). In gliomas this fraction increased to 50–70% (Szymaś 1986) and in glioblastomas to 73–90% (results of the present study), irrespective of the total amount of GFAP. This demonstrates that the malignancy of neuroectodermal tumors with glial differentiation depends on the fraction rather than the amount of water-soluble GFAP, as suggested by Jacque et al. (1978) and Palfreyman et al. (1979). This conclusion is in line with previous studies by Rasmussen et al. (1980) who were not able to establish a relationship between malignancy and concentration of GFAP. According to Eng and DeArmond (1982) the GFAP immunohistochemical reaction is specially intense in the presence of soluble GFAP. However, the tumors in the present study reacted only weakly despite their high content of soluble GFAP. A similar dissociation between the histological and biochemical findings has been reported in reactive astrocytes of human white matter (Newcombe et al. 1986). This suggests that during the fixation and embedding process used for immunohistochemistry most of the soluble fraction of GFAP is lost. However, it cannot be excluded that the antigens of soluble GFAP are selectively masked by intra- and intermolecular bonds induced by the aldehyde-containing fixative (Brandtzaeg, Rognum 1984).

Immuno-electron microscopy revealed that GFAP positivity was seen almost exclusively in connection with glial filaments. This indicates that GFAP positivity in glioblastoma after formaldehyde fixation reflects the presence of glial filaments and in this way the differentiation of these tumor cells.

The results obtained demonstrate that in fact glioblastomas have a high content of GFAP which, however, can only be partially revealed by immunohistochemical techniques. Further efforts, therefore, have to be made to intensify the immunostaining ability of glioblastoma.

KWAŚNE WŁÓKIENKOWE BIAŁKO GLEJOWE W LUDZKIM GLEJAKU WIELOPOSTACIOWYM

Streszczenie

Przebadano kwaśne włókienkowe białko glejowe (GFAP) w glejakach wielopostaciowych. Badania immunohistochemiczne przeprowadzono na materiale utrwalonym w formalinie, pochodzącym z 52 przypadków tego nowotworu. Intensywność odczynu immunohistochemicznego pozwoliła na wyróżnienie dwóch podgrup glejaków wielopostaciowych: jednej ze skąpym odczynem i drugiej z odczynem bardziej wydatnym. Badanie immunohistochemiczne na poziomie ultrastrukturalnym, przeprowadzone w 5 przypadkach, wykazało, że pozytywny odczyn na obecność GFAP jest związany z obecnością włókienek glejowych. Na podstawie przeprowadzonych badań biochemicznych wykazano obecność dwóch frakcji GFAP: frakcji rozpuszczalnej w roztworze ekstrakcyjnym z użyciem detergentów niejonowych, stanowiącej pułk niezagregowanych we włókienka cząsteczek białka oraz frakcji nierozpuszczalnej w tym roztworze, stanowiącej frakcję białka zagregowanego we włókienka glejowe. Rozpuszczalna frakcja stanowiła 73–90% całkowitego GFAP ekstrahowanego z badanych nowotworów; 10–25% stanowiło GFAP zagregowane we włókienka glejowe i prawdopodobnie tylko ta frakcja uwidoczniła się na skrawku histologicznym, badanym metodą immunohistochemiczną.

REFERENCES

1. Apgar J. R., Herrmann S. H., Robinson J. M., Mescher M. F.: Triton X-100 extraction of P815 tumor cells: evidence for a plasma membrane skeleton structure. *J Cell Biol*, 1985, 100, 1369–1378.
2. Arendt A.: *Histologisch-diagnostischer Atlas der Geschwülste des Zentralnervensystems und seiner Anhangsgebilde*. Fischer, Jena, 1977, pp. 74–84.
3. Axelsen N. H., Bock E.: Electroimmunoassay (rocket immunoelectrophoresis). In: *Handbook of immunoprecipitation in gel techniques*. Ed.: Axelsen N. H. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1983, pp. 103–106.
4. Bonnin J. M., Rubinstein L. J.: Immunohistochemistry of central nervous system tumors. Its contributions to neurosurgical diagnosis. *J Neurosurg*, 1984, 60, 1121–1133.
5. Brandtzaeg P., Rognum T. O.: Evaluation of nine different fixatives. *Histochemistry*, 1984, 81, 213–219.
6. Budka H.: Tumoren des Zentralnervensystems. In: *Histologische Tumorklassifikation*. Eds.: Breitenacker G., Budka H., Denk H., Feigl W., Hanak H., Holzner J. H., Kessler Th. J., Höhler H., Lederer B., Leibl W., Obiditsch-Mayer I., Wuketich. Springer St., Wien, New York, 1984, pp. 140–146.
7. Burger P. C., Vogel F. S.: *Surgical pathology of the nervous system and its coverings*. J. Wiley and Sons, New York, 1982, pp. 242–266.
8. Clark G., Powers J. M.: A consistent phosphotungstic acid hematoxylin stain for glial fibers. *Stain Technol*, 1976, 51, 227–229.
9. Darnell J., Lodish H., Baltimore D.: *Molecular cell biology*. Scient. Amer. Books Inc., New York, 1986, pp. 851–855.
10. DeArmond S. J., Eng L. F., Rubinstein L. J.: The application of glial fibrillary acidic protein (GFA) immunohistochemistry in neurooncology. A progress report. *Pathol Res Pract*, 1980, 168, 374–394.
11. Debus E., Weber K., Osborn M.: Monoclonal antibodies specific for glial fibrillary acidic (GFA) protein and for each of the neurofilament triplet polypeptides. *Differentiation*, 1983, 25, 193–203.
12. Deck J. H. N., Eng L. F., Bigbee J., Woodcock S. M.: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1978, 42, 183–190.
13. Descalzo C.: Modification der Goldsublimat-Methode Cajals für Paraffinschnitte. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1963, 2, 501–503.
14. Duffy P. E., Graf L., Huang Y. Y., Rapport M. M.: Glial fibrillary acidic protein in ependymomas and other brain tumors. *J Neurol Sci*, 1979, 40, 133–146.
15. Eng L. F., DeArmond S. J.: Immunocytochemical studies of astrocytes in normal development and disease. In: *Advances in Cellular Neurobiology*. Eds.: Fedoroff S., Hertz L. Acad. Press, New York, 1982, pp. 143–165.
16. Eng L. F., DeArmond S. J.: Immunohistochemistry of the glial fibrillary acidic (GFA) protein. In: *Progress in Neuropathology*. Ed.: Zimmerman H. M. Raven Press, New York, 1983, 5, 19–39.
17. Eng L. F., Lee Y. L., Miles L. E. M.: Measurement of glial fibrillary acidic protein by a two-site immunoradiometric assay. *Anal Biochem*, 1976, 71, 243–259.
18. Goetschy J. F., Ulrich G., Aunis D., Ciesielski-Treska J.: The organization and solubility properties of intermediate filaments and microtubules of cortical astrocytes in culture. *J Neurocytol*, 1986, 15, 375–387.
19. Gottschalk J., Szymaś J.: Bedeutung der Immunhistochemie für die Neuroonkologie. VI. Mitteilung: Vorkommen, Lokalisation und Verteilungsmuster des sauren Gliafaserproteins (GFAP) in 820 Tumoren. *Zentralbl Allg Pathol*, 1987, 133, 319–330.
20. Gullotta F., Schindler F., Schmutzler R., Weeks-Seifert A.: GFAP in brain tumor diagnosis: possibilities and limitations. *Pathol Res Pract*, 1985, 180, 54–60.
21. Herpers M. J., Budka H., McComick D.: Production of glial fibrillary acidic protein (GFAP) by neoplastic cells: Adaptation to the microenvironment. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1984, 64, 333–338.
22. Hoshino T., Townsed J. J., Muraoka I., Wilson C. B.: An audioradiographic study of human gliomas: growth kinetics of anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Brain*, 1980, 103, 967–984.

23. Ingber D. E., Madri J. A., Jamieson J. D.: Basement membrane as a spatial organizer of polarized epithelia. Exogenous basement membrane reorients pancreatic epithelial tumor cells *in vitro*. *Am J Pathol*, 1986, 122, 129–139.
24. Jacque C. M., Vinner C., Kujas M., Raoul M., Racadot J., Baumann N. A.: Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J. Neurol. Sci*, 1978, 35, 147–155.
25. Jellinger K.: Glioblastoma multiforme: Morphology and biology. *Acta Neurochir*, 1978, 42, 5–32.
26. Kretschmar H. A., DeArmond S. J., Forno I. S.: Measurement of GFAP in hepatic encephalopathy by ELISA and transblots. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1985, 44, 459–471.
27. Lee Y. L., Eng L. F., Miles L. E. M.: Extraction and immunologic identity of “soluble” and “insoluble” GFA protein. *Abstract. Trans Am Soc Neurochem*, 1976, 7, 240.
28. Mandybur T. I., Sawaya R., Ormsby I.: The morphology and biologic behavior of human glioblastoma growing in nude mice. *Cancer*, 1986, 58, 1061–1069.
29. Newcombe J., Woodroffe M. N., Cuzner M. L.: Distribution of glial fibrillary acidic protein in gliosed human white matter. *J Neurochem*, 1986, 47, 1713–1719.
30. Paetau E., Elovaara I., Paasivuo R., Virtanen I., Palo J., Haltia M.: Glial filaments are a major brain fraction in infantile neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1985, 65, 190–194.
31. Palfreyman J. W., Thomas D. G. T., Ratcliffe J. G., Graham D. I.: Glial fibrillary acidic protein. *J Neurol Sci*, 1979, 41, 101–113.
32. Pasquier B., Lachard A., Pasquier D., Couderc P., Delpuch B., Corel M. N.: Protéine gliofibrillaire acide (GFA) et tumeurs nerveuses centrales. Etude immunohistochimique d'une série de 207 cas. *Ann Pathol*, 1983, 3, 127–135.
33. Rasmussen S., Bock E., Warecka K., Althage G.: Quantitation of glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. *Br J Cancer*, 1980, 41, 113–116.
34. Reifenberger G., Szymaś J., Wechsler W.: Differential expression of glial- and neuronal-associated antigens in human tumors of the central and peripheral nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1987, 74, 105–123.
35. Scherer H. J.: Cerebral astrocytomas and their derivatives. *Am J Cancer*, 1940, 40, 159–198.
36. Sternberger L. A., Hardy P. H., Cuculis J. J., Mayer H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem*, 1970, 18, 315–333.
37. Suzuki T., Kato T., Fuji T., Tanaka R.: Cytoskeletal changes of glioblasts after morphological differentiation induced by glia maturation factor. *Neurochem Int*, 1986, 9, 305–313.
38. Szymaś J.: Diagnostic value of demonstrating glial fibrillary acidic protein in human astrocytomas. *Neuropatol Pol*, 1985, 23, 23–35.
39. Szymaś J.: Das saure Gliafaserprotein. Ein wertvolles Hilfsmittel in der neuropathologischen Diagnostik. *Zentralbl Allg Pathol*, 1986, 131, 3–18.
40. Szymaś J., Morkowski S.: Antiserum against glial fibrillary acidic protein. Production and specificity control. *Immunol Pol*, 1984, 9, 135–144.
41. Van der Meulen J. D. M., Houthoff H. J., Ebels E. J.: Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1978, 4, 177–190.
42. Wiedenmann B., Lawley K., Grund Ch., Branton D.: Solubilization of proteins from bovine brain coated vesicles by proteins perturbants and Triton X-100. *J Cell Biol*, 1985, 101, 12–18.
43. Zülch K. J.: Histological typing of tumours of the central nervous system. *International Histological Classification of tumours. WHO, Geneva, 1979, pp. 50–51.*

Address for correspondence: Dr. J. Szymaś, Department of Clinical Pathomorphology, School of Medicine, 49 Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland.

ANNA KAMIŃSKA, ANNA FIDZIAŃSKA

BASEMENT MEMBRANE COMPONENT CHANGES DURING EXPERIMENTAL SKELETAL MUSCLE DEGENERATION AND REGENERATION

Neuromuscular Unit, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

The basement membrane (BM) of the muscle fiber, which constitutes an important component of extracellular matrix is known to consist of several collagenous and noncollagenous proteins. Type IV collagen and laminin are generally accepted as intrinsic components of the BM. Fibronectin, considered to be an extrinsic component of BM, exists in two forms: plasma (soluble) and tissue (insoluble) fibronectin. The amino acid composition and immunological properties of these two forms are similar. The relation of fibronectin, type IV collagen and laminin to the normal muscle fiber has already been studied at the light and the electron microscopic levels by Bertolotti et al. (1983), Hantai et al. (1983), Sanes, Cheney (1982), Rampoldi et al. (1986). The distribution of various BM components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration in autotransplanted muscle was first studied by Gulati et al. (1982, 1983, 1984) and Gulati (1985). The authors stressed that the BM was not a static structure as was previously believed, but one which changes rapidly during muscle degeneration and regeneration. A variety of experimental procedures has been shown to produce muscle fiber degeneration and regeneration. It appeared that the process of muscle regeneration following a local anesthetic Bupivacaine hydrochloride (BPVC) application was more rapid, homogeneous, synchronous and complete than that following local physical damage i.e. damage by heat, cold, crushing, acute ischemia or autotransplantation (Allbrook 1981). In the BPVC model well preserved satellite cells, functionally intact motor innervation, preserved vascular supply and absence of connective tissue proliferation are responsible for successful muscle fiber regeneration. Therefore, the present study was undertaken to examine the possible changes of the BM components in BPVC-induced skeletal muscle degeneration and regeneration. We were unaware of any studies describing BM changes in BPVC-treated muscle.

MATERIALS AND METHODS

A total of 27 adult (approximately of 200 g weight) male Wistar rats were used. Eight groups of 3 rats received injections of BPVC. Three control rats

received only 0.6 ml physiological saline. The rats were anesthetized with ether. BPVC (0.75%) was injected in a dose of 0.6 ml into the Anterior Tibial (AT) muscle. Rats receiving BPVC were sacrificed by an overdose of ether after 4, 8, 12 hours and 1, 2, 3, 5, 7 days. The AT muscles were dissected and immediately frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. Frozen sections of 8 μm thickness were cut in a cryostat. Serial sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), modified Gomori trichrome and by histochemical methods including NADH-TR, ATP-ase with preincubation at pH 9.4, 4.6 and 4.3 and alkaline phosphatase. The indirect immunofluorescence staining procedure was used to monitor BM changes in muscle. In brief, appropriate monoclonal antibodies were applied to adjacent tissue sections rinsed in phosphate buffer saline (PBS) and incubated with fluorescein-conjugated secondary antibody. Controls were prepared using nonimmune goat serum. None of these controls exhibited any nonspecific fluorescence. Photographs were taken with an Opton Zeiss standard Lab 16 microscope using Kodak Ectachrome film ASA 100.

RESULTS

Control group. No regenerating fibers in saline-injected AT muscles were observed.

Four hours after BPVC injection. The majority of myofibers in BPVC-treated AT muscle showed extensive alterations such as hyalinized cytoplasm and circular outline. Several hypercontracted "opaque" fibers stained dark by HE (Fig. 1A). Collagen IV and laminin were relatively well preserved, whereas fibronectin presented irregular and patchy endomysial distribution (Fig. 1B).

Eight hours after BPVC injection. Similar, but more advanced changes were observed in all examined AT muscles. Most fibers showed hyalinization. Many of them presented focal loss of the myofibrils often located in the center. Numerous fibers appeared as empty sarcolemma tubes (Fig. 2A). The degenerating muscle fibers showed a decreased pericellular localization of fibronectin and accumulation of fibronectin in the cytoplasm (Fig. 2B). Endomysial collagen and, in lesser degree, laminin became patchy and irregular.

Twelve hours after BPVC injection. The degeneration of damaged fibers progressed. The necrotic fibers were often surrounded by macrophages. Numerous degenerating myofibers showed decreased endomysial and increased sarcoplasmic fibronectin. Collagen IV and laminin have also been found in the sarcoplasm of several degenerating muscle fibers. The distribution of collagen IV and laminin in the *endomysium* became patchy and discontinuous.

One day after BPVC injection. At the transverse section (Fig. 3A) cellular infiltration of the necrotic zone was prominent with many phagocytes between and inside the degenerating muscle fibers. Numerous myofibers showing central necrosis were seen in HE staining. Intracellular accumulation of fibronectin (Fig. 3B), laminin (Fig. 3C) and collagen IV (Fig. 3D) was visible in the degenerating muscle fibers. The profile of myofibers, although irregular and fragmented was still defined.

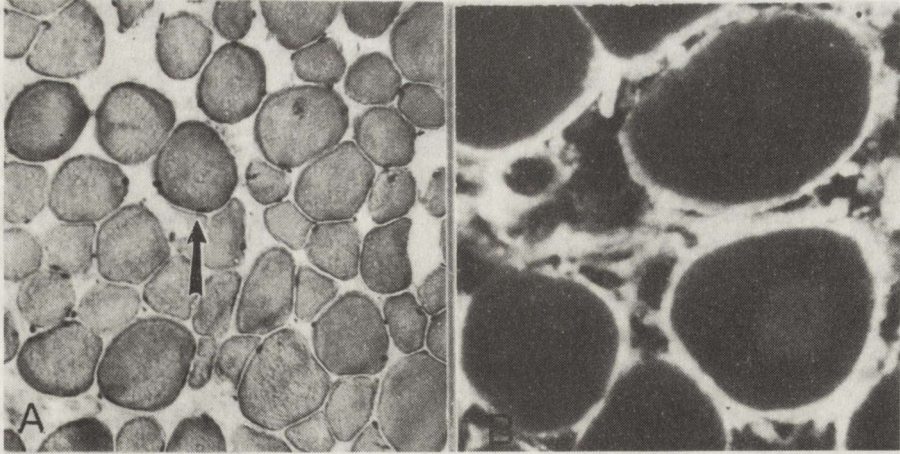


Fig. 1. 4 hours after BPVC injection. A – Numerous fibers with hyalinized cytoplasm and circular outline; many “opaque” fibers stained dark (arrow). HE. $\times 200$. B – Irregular and patchy endomysial distribution of fibronectin. Anti-fibronectin staining. $\times 400$

Ryc. 1. 4 godziny po podaniu BPVC. A – Wiele włókien wykazujących hialinizację cytoplazmy i zaokrąglony kształt; liczne włókna homogenne o zwiększonej barwliwości (strzałka). HE. Pow. $200\times$. B – Nieregularny rozkład fibronektyny w endomysium. Antyfibronektyna. Pow. $400\times$

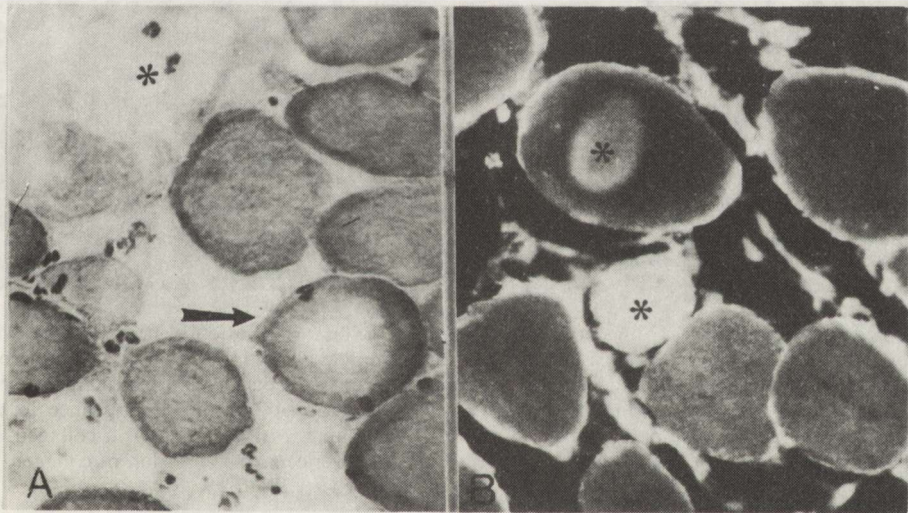


Fig. 2. 8 hours after BPVC injection. A – Many fibers seem empty with no visible myofibrils (asterisk), many show focal loss of myofibrils, often located in the center (arrow). HE. $\times 400$. B – Progressing loss of pericellular localization of fibronectin with accumulation of the fluorescence in the sarcoplasm of degenerating myofibers (asterisks). Anti-fibronectin staining. $\times 400$

Ryc. 2. 8 godzin po podaniu BPVC. A – Liczne włókna pozbawione miofibryli, widoczne jako puste tuby (gwiazdka), włókna z ubytkiem miofibryli w części środkowej (strzałka). HE. Pow. $400\times$. B – Ubytek fibronektyny związanej z błoną podstawną, pojawienie się fibronektyny w cytoplazmie martwiczych włókien (gwiazdki). Antyfibronektyna. Pow. $400\times$

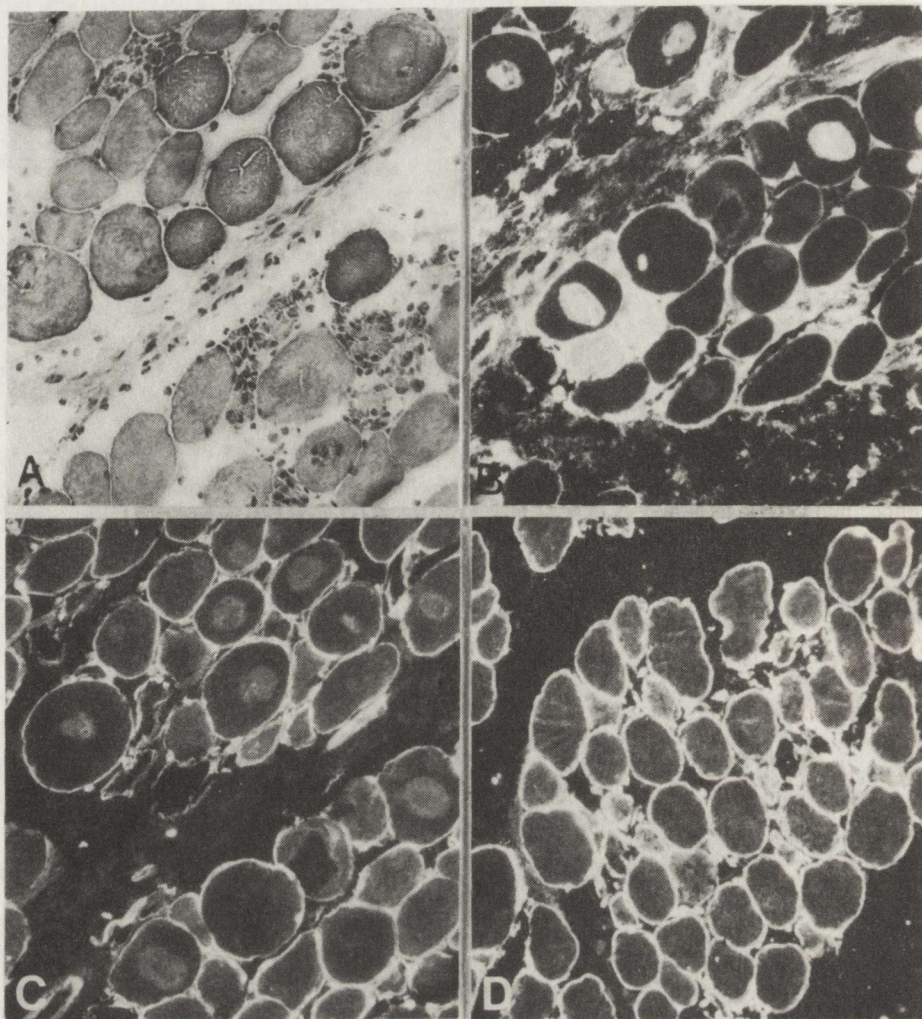


Fig. 3. 24 hours after BPVC injection. A — Prominent cellular infiltration of necrotic zone with many phagocytes between and inside the degenerating muscle fibers. HE. $\times 200$. B — Numerous fibers with both intracellular accumulation of fibronectin and dispersed expression between myofibers. Anti-fibronectin staining. $\times 200$. C — Accumulation of laminin fluorescence in the sarcoplasm of numerous muscle fibers. Anti-laminin staining. $\times 200$. D — Anti-collagen IV staining. Intracellular fluorescence in many necrotic fibers. Pericellular expression of collagen IV appears patchy and fragmented. $\times 200$

Ryc. 3. 24 godziny po podaniu BPVC. A — Widoczny naciek z fagocytami zarówno pomiędzy martwicznymi włóknami, jak i wewnątrz nich. HE. Pow. $200\times$. B — Wewnątrzkomórkowa fluorescencja fibronektyny w wielu włóknach. Widoczna także rozproszona fluorescencja pomiędzy włóknami. Antyfibronektyna. Pow. $200\times$. C — Wewnątrzkomórkowa fluorescencja lamininy w wielu włóknach, często w części środkowej. Antylaminina. Pow. $200\times$. D — Antykolagen IV. Wewnątrzkomórkowa fluorescencja w wielu włóknach. Pow. $200\times$

Two days after injection. Fibers surviving BPVC injection surrounded by massive infiltration of unidentifiable in this staining mononuclear cells (probably macrophages, fibroblasts and proliferating myoblastic cells) were seen (Fig. 4A). An intense patchy fluorescence of fibronectin between infiltrating cells was observed (Fig. 4B), whereas staining for laminin and collagen IV was negative in this area.

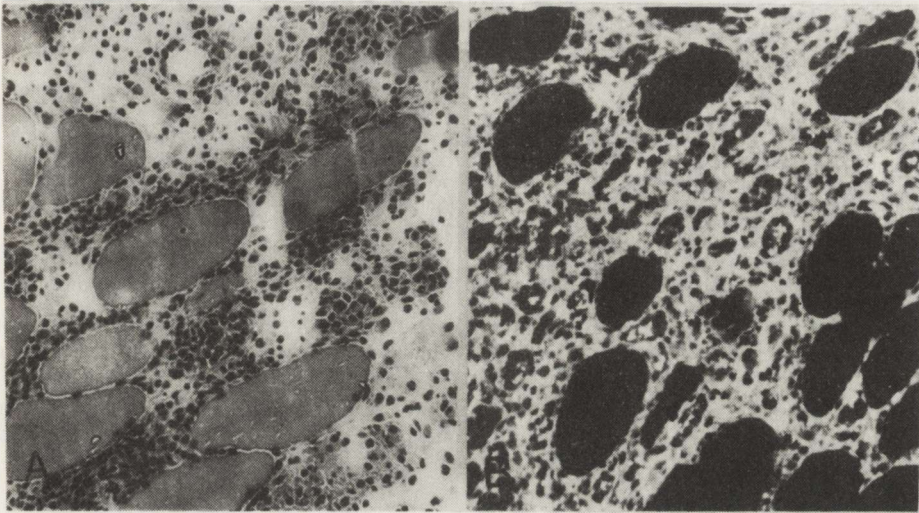


Fig. 4. 2 days after BPVC injection. A – Among clusters of macrophages muscle fibers surviving BPVC injection. HE. $\times 400$. B – Fibronectin forms meshwork between surviving myofibers. Anti-fibronectin staining. $\times 400$

Ryc. 4. 2 dni po podaniu BPVC. A – Pomiedzy skupiskami makrofagów widoczne przetrwałe włókna mięśniowe. HE. Pow. $400\times$. B – Pomiedzy przetrwałymi włóknami mięśniowymi widoczna siatka fibronektyny. Antyfibronektyna. Pow. $400\times$

Three days after BPVC injection. Numerous small cells showing intense basophilia in HE staining were observed in the newly regenerated area. Fibronectin fluorescence in this area was very intense and dispersed between regenerating cells (Fig. 5A). In contrast, each regenerating cell or cluster of regenerating cells was enclosed by ring-like collagen IV and a laminin rich sheath (Fig. 5B).

Five days after BPVC injection. Areas of previous damage filled with well defined small fibers with central, often multiple nuclei and with cytoplasmic basophilia in HE were noted. Such newly formed fibers in the ATP-ases and DPNH methods exhibited increased enzymatic activity. The fibronectin staining (Fig. 6A) was intense and showed a circular outline around the regenerating cells and a dense meshwork between them. Fibronectin deposits delineated also numerous regenerating blood vessels. Collagen IV and laminin contoured each cell or cluster of regenerating cells, whereas the space between them was negative. Deformed and collapsed old BM fragments were still visible in antilaminin staining (Fig. 6B).

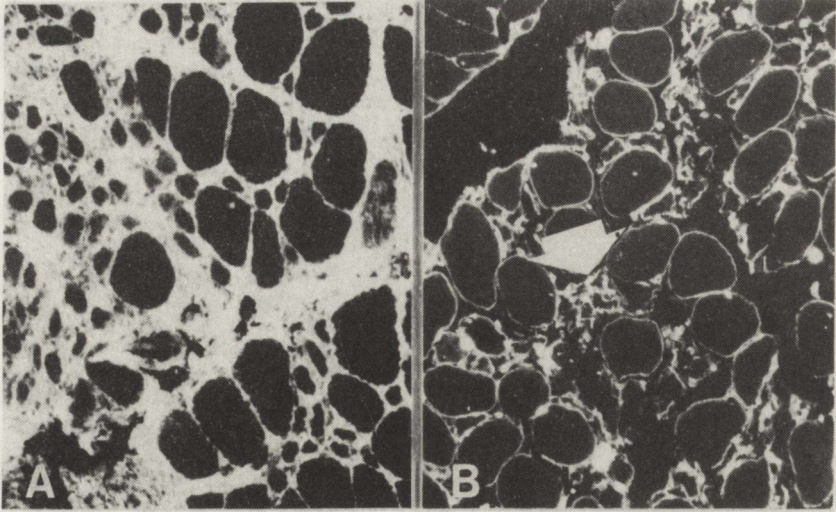


Fig. 5. 3 days after BPVC injection. A — Anti-fibronectin staining. Bright dispersed fluorescence between regenerating myotubes. $\times 200$. B — Laminin forms delicate ring-like structure around regenerating myotubes (arrow). Anti-laminin staining. $\times 200$

Ryc. 5. 3 dni po podaniu BPVC. A — Intensywna rozproszona fluorescencja fibronektyny pomiędzy regenerującymi miotubami. Antyfibronektyna. Pow. $200\times$. B — Laminina tworzy delikatne obwódki wokół regenerujących miotub (strzałka). Antylaminina. Pow. $200\times$

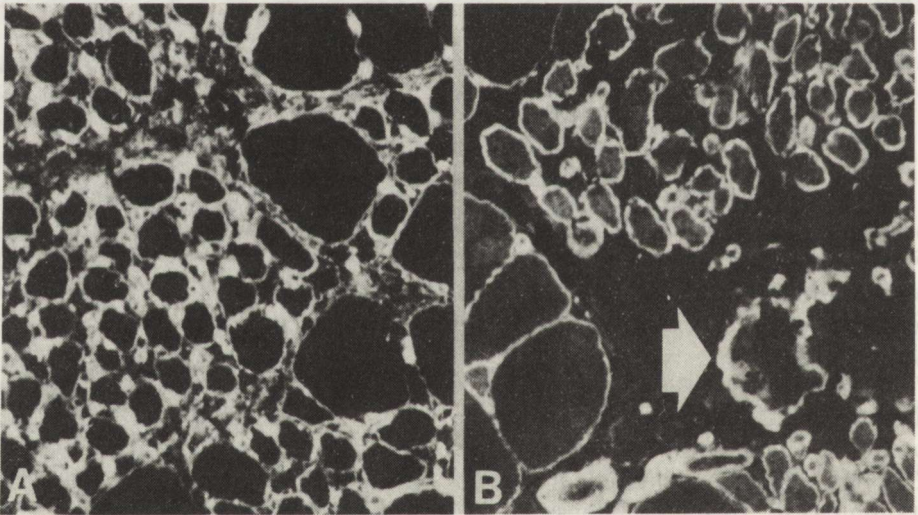


Fig. 6. 5 days after BPVC injection. A — Still dispersed fibronectin around newly formed myotubes. Anti-fibronectin staining. $\times 400$. B — Continuous ring of laminin around regenerated myotubes. Note fragments of old basement membrane (arrow). Anti-laminin staining. $\times 400$

Ryc. 6. 5 dni po podaniu BPVC. A — Pomiędzy nowo utworzonymi włóknami widoczna rozproszona fluorescencja fibronektyny. Antyfibronektyna. Pow. $400\times$. B — Laminina tworzy ciągłą obwódkę dookoła nowo utworzonych miotub. Widoczne resztki starej błony podstawnej (strzałka). Antylaminina. Pow. $400\times$

Seven days after BPVC injection. The new fibers enlarged and became less basophilic in HE staining. The nuclei of newly regenerated fibers were still centrally located. Such myotubes in ATP-ases and DPNH methods showed increased enzymatic activity. Anti-fibronectin stained the circular outline around myotubes and also endo- and perimysial spaces between the regenerating fibers (Fig. 7A), whereas each myotube was enclosed by a collagen IV and laminin-rich ring (Fig. 7B). Anti-collagen IV and anti-laminin stained also regenerating blood vessels in this area.

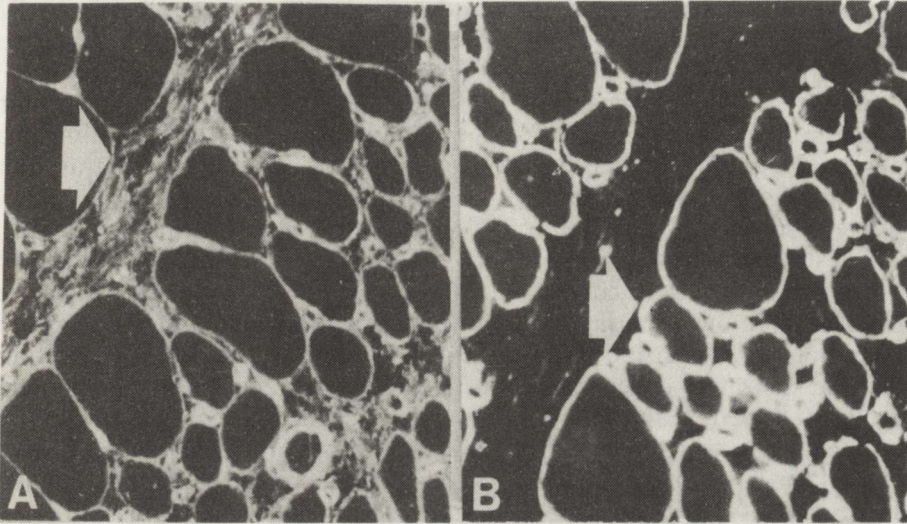


Fig. 7. 7 days after BPVC injection. A – Dispersed fibronectin expression between regenerating fibers and in *perimysium* (arrow). Anti-fibronectin staining. $\times 400$. B – Regenerating fibers with prominent ring of laminin (arrow). Lack of fluorescence in *perimysium*, Anti-laminin staining. $\times 400$ Ryc. 7. 7 dni po podaniu BPVC. A – Rozproszona fluorescencja pomiędzy włóknami i w *perimysium* (strzałka). Antyfibronektyna. Pow. $400\times$. B – Regenerujące włókna z wyraźną obwódką lamininy (strzałka), brak fluorescencji w *perimysium*. Antylaminina. Pow. $400\times$

In summary: during BPVC-induced muscle fiber degeneration endomysial fibronectin decreased first and as first appeared in the sarcoplasm of necrotic muscle fibers. The regenerating muscle fibers produced a new basement membrane. Dispersed fibronectin appeared first in the regenerated area and was followed by laminin and collagen IV forming ring-like structures around newly regenerating muscle fibers.

DISCUSSION

The present study reconfirms the cytotoxic effect of BPVC on skeletal muscle fibers. The morphological changes and their time-course observed by us were similar to those reported in previous studies by Benoit and Belt (1970), Jirmanova, Thesleff (1972), Foster, Carlson (1980), Nonaka et al. (1983). BM of the skeletal muscle fiber is believed to persist, even if the muscle fiber

degenerates, allowing proper regeneration of myoblasts and myotubes within it (Foster, Carlson 1980). In the past few years, however, the availability of antibodies against BM components has opened new possibilities of studying BM changes in various experimental conditions (Chiquet, Fambrough 1984; Mauger et al. 1984). From immunofluorescent studies of skeletal muscle grafts undergoing regeneration or rejection (Gulati et al., 1982, 1983, 1984; Gulati 1985), it became clear that the individual component rather than the whole BM changed sequentially during muscle fiber degeneration and regeneration. The gradual breakdown of BM components and their sequential appearance was also observed by us in the BPVC model. The early damage of various BM components may be due to temporary ischemia at the site of BPVC injection (Seibel et al. 1978). This is followed by gradual disappearance of fibronectin, laminin and collagen IV macromolecules, related probably to their enzymatic degradation. Enzymes involved in the process of BM degradation may penetrate the area from infiltrating macrophages or accumulating extracellular fluid (Liotta et al. 1981; Beach et al. 1982).

The presence of fibronectin in the sarcoplasm of degenerating muscle fibers was first described by Gulati et al., in 1982 and was attributed to the synthesis of fibronectin by activated myosatellite cells or to the altered muscle cell permeability. In our experiment all three studied components were observed in the sarcoplasm of necrotic fibers. Sarcoplasmic fibronectin appeared first and was present in most degenerating fibers. To a lesser extent this phenomenon was also observed in anti-laminin and anti-collagen IV staining. The reported (Martinez-Hernandez, Amenta 1983) molecular weight for fibronectin is lower than that for laminin and collagen IV. This may explain the increased muscle cell permeability to fibronectin during muscle cell degeneration.

The new BM formation around the regenerated muscle cells was studied in autotransplanted muscle by Gulati et al. (1982, 1983, 1984). It has been shown that the various components of BM reappeared sequentially around the regenerated myotubes, with fibronectin appearing last of all (Gulati 1985). In contrast, in BPVC-treated muscle meshwork fibronectin expression in the regenerating area was observed first. Such extracellular meshwork was occasionally observed by Hantai et al. (1985a,b) in myoblast cell cultures and was constantly present in myotube cultures. On the other hand, fibronectin, an extrinsic component of BM is synthesized not only by myogenic cells, but mostly by fibroblasts (Gardner, Fambrough 1983), numerously present in the regenerating area. This may, in our experiment, explain the dispersed distribution of fibronectin in the extracellular space between newly formed myogenic cells.

Laminin and collagen IV are also synthesized by fibroblastic and myogenic cells (Kühl et al. 1982). After myoblast fusion and formation of myotubes, laminin and collagen IV has been shown to form a continuous BM ring (Kühl et al. 1982). Our results are in agreement with previous *in vitro* (Kühl et al. 1982; Beach et al. 1985) and *in vivo* (Gulati et al. 1982, 1983, 1984; Gulati 1985) studies and demonstrate that the formation of new BM in regenerating BPVC-treated muscle is a terminal step during muscle regeneration.

Acknowledgements. We thank Prof. Irena Hausmanowa-Petrusewicz for her valuable comments on this manuscript.

ZMIANY SKŁADNIKÓW BŁONY PODSTAWNEJ WŁÓKNA MIĘŚNIOWEGO W PROCESIE DOŚWIADCZALNEJ MARTWICY I REGENERACJI

Streszczenie

Za pomocą przeciwciał przeciwko poszczególnym składnikom błony podstawnej komórki mięśniowej oceniano zmiany zachodzące w procesie martwicy i regeneracji mięśnia, wywołane podaniem Bupivacainy. Wskazano, że najwcześniej ulega uszkodzeniu fibronektyna, ona też jako pierwsza pojawia się ponownie wokół regenerujących włókien mięśniowych, tworząc wokół nich rozproszoną sieć. Laminina i kolagen IV są bardziej odporne na uszkodzenie; wokół regenerujących włókien tworzą charakterystyczne pierścieniowate obwódki. Wyniki te świadczą, że błona podstawna komórki mięśniowej nie jest tak trwała jak wcześniej uważano, ale ulega istotnym zmianom w czasie zwyrodnienia i regeneracji mięśnia.

REFERENCES

1. Allbrook D.: Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*, 1981, 4, 234–245.
2. Beach R. L., Burton W. V., Hendricks W. J., Festoff B. W.: Extracellular matrix synthesis by skeletal muscle in culture: Proteins and effect of enzyme degradation. *J Biol Chem*, 1982, 257, 11437–11442.
3. Beach R. L., Rao J. S., Festoff B. W.: Extracellular matrix synthesis by skeletal muscle culture: Major secreted collagenous proteins of clonal myoblasts. *Biochem J*, 1985, 225, 619–627.
4. Benoit P. W., Belt W. D.: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, Bupivacaine (Marcaine). *J Anat*, 1970, 3, 547–556.
5. Bertolotti A., Palmucci L., Doriguzzi C., Mongini T., Gagnor E., Del Rosso M., Tarong G.: Laminin and fibronectin distribution in normal and pathological human muscle. *J Neurol Sci*, 1983, 60, 377–382.
6. Chiquet M., Fambrough D. M.: Extracellular matrix assembly during muscle development studied with monoclonal antibodies. *Exp Biol Med*, 1984, 9, 87–92.
7. Foster A. H., Carlson B. M.: Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth Analg*, 1980, 59, 727–736.
8. Gardner J. M., Fambrough D. M.: Fibronectin expression during myogenesis. *J Cell Biol*, 1983, 96, 474–485.
9. Gulati A. K.: Basement membrane component changes in skeletal muscle transplants undergoing regeneration or rejection. *J Cell Biochem*, 1985, 27, 337–346.
10. Gulati A. K., Reddi A. H., Zalewski A. A.: Distribution of fibronectin in normal and regenerating skeletal muscle. *Anat Rec*, 1982, 204, 175–183.
11. Gulati A. K., Reddi A. H., Zalewski A. A.: Changes in the basement membrane zone components during skeletal muscle fiber degeneration and regeneration. *J Cell Biol*, 1983, 97, 957–962.
12. Gulati A. K., Reddi A. H., Zalewski A. A.: Changes in the extracellular matrix components fibronectin and laminin during immune rejection of skeletal muscle. *Anat Rec*, 1984, 209, 21–27.
13. Hantai D., Gautron J., Labat-Robert J.: Immunolocalization of fibronectin and other macromolecules of the intracellular matrix in the striated muscle fiber of the adult rat. *Coll Relat Res*, 1983, 3, 381–391.
14. Hantai D., Labat-Robert J., Grimaud J. A., Fardeau M.: Fibronectin, laminin, type I, III and IV collagens in Duchenne's muscular dystrophy, congenital muscular dystrophies and congenital myopathies: An immunocytochemical study. *Connect Tissue Res*, 1985a, 13, 273–281.
15. Hantai D., Tassin A. M., Gautron J., Labat-Robert J.: Biosynthesis of laminin and fibronectin in rat satellite cells during myogenesis *in vitro*. *Cell Biol Int Rep*. 1985b, 9, 647–654.
16. Jirmanova I., Thesleff S.: Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. *Z Zellforsch*, 1972, 131, 77–97.
17. Kühl U., Timp R., Von Dem Mark K.: Synthesis of type IV collagen and laminin in cultures of skeletal muscle cells and their assembly on the surface of myotubes. *Dev Biol*. 1982, 93, 344–354.

18. Liotta L. A., Goldfarb R. H., Brundage R., Siegal G. P., Terranova V., Garbisa S.: Effect of plasminogen activation on glycoproteins and collagenous components of basement membrane. *Cancer Res.* 1981, 41, 4629–4636.
19. Martinez-Hernandez A., Amenta P. S.: The basement membrane in pathology. *Lab Invest.* 1983, 48, 656–677.
20. Mauger A., Kieny M., Goetinck P. F.: Immunofluorescent localization of extracellular matrix components during morphogenesis. II. In chick embryos with hereditary muscular dysgenesis (cn/cn). *J Exp Zool.* 1984, 232, 343–358.
21. Nonaka I., Takagi A., Ishiura S., Nakase H., Sugita H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by Bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60, 167–174.
22. Rampoldi E., Meola G., Tuhrman Conti A. M., Velicogna M., Larizza L.: A comparative analysis of collagen III, IV, laminin and fibronectin in Duchenne muscular dystrophy biopsies and cell cultures. *Eur J Cell Biol.* 1986, 42, 27–34.
23. Sanes J. R., Cheney J. M.: Laminin, fibronectin and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J Cell Biol.* 1982, 93, 442–451.
24. Seibel H. R., Dolwick M. F., Bush F. M., Craig S. C.: Electron-microscopic study of the rat masseter muscle following injection of lidocaine. *Acta Anat.* 1978, 100, 354–364.

Authors' address: Neuromuscular Unit Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 1A Banacha Str., 02-097 Warsaw, Poland.

ANNA KAMIŃSKA, ANNA FIDZIAŃSKA

REGENERATIVE CAPABILITY
OF DENERVATED RAT SKELETAL MUSCLE:
ULTRASTRUCTURAL STUDY*

Neuromuscular Unit, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

It is well known that skeletal muscle is capable of regeneration in response to injury (Allbrook 1981). There are many features essential for complete muscle regeneration, with the intact innervation being most important. Several authors have reported successful early phases of regeneration when denervation and experimental muscle injury were done at the same time (Zhenewskaya 1962; Studitsky et al. 1963; Jirmanova, Thesleff 1972; Hall-Craggs, Seyan 1975; Gulati 1988). However, complete maturation of regenerating fibers occurred only if the muscle was subsequently reinnervated. The purpose of our study was to define, at the ultrastructural level, the effect of chronic denervation on muscle fiber regeneration in rats.

In order to evaluate the age-related factor in muscle regeneration, we compared the regenerative ability of neonatally and adult denervated muscle. We studied a sequential series of muscles which had been denervated by sciatic nerve section at different ages before treatment with a myotoxic agent — Bupivacaine (BPVC). BPVC, a local anesthetic, has been shown to produce pronounced, yet reversible, muscle degeneration (Benoit, Belt 1970; Hall-Craggs 1974; Nonaka et al. 1983). In this model, well preserved satellite cells, functionally intact motor innervation, uninterrupted vascular supply and absence of connective tissue proliferation are responsible for extremely rapid muscle fiber regeneration.

MATERIAL AND METHODS

The anterior tibial (AT) muscle of male Sprague-Dawley rats was used in the experiments. All operative procedures except neonatal denervation were performed under ether anesthesia. Neonatal denervation (within 12 hours after birth) was performed under cold anesthesia. Denervation was accomplished by right sciatic nerve transection at the sciatic notch and removal of a 2 mm

* This research was partly supported by grant from the Medical Dystrophy Association of America.

(neonatal) or 1 cm (adult) segment of the nerve to prevent reinnervation. Injection of 0.6 ml of BPVC (0.75%, dissolved in 0.9% NaCl) was made into the AT muscle. The rats were divided into 3 experimental groups:

Group I (control group) – 16-week-old rats injected with a single dose of BPVC.

Group II – Rats denervated at the age of 8 weeks and injected with a single dose of BPVC 8 weeks later.

Group III – Neonatally denervated rats injected with a single dose of BPVC 8 weeks later.

The AT muscles were removed in all 3 groups, 5, 7, 14 and 28 days after injection, and in group I 3 days after injection and prepared for electron microscopic examination.

RESULTS

Group I – control muscle

Three days after BPVC injection. Necrotic muscle cells invaded by phagocytes (Fig. 1A), damaged capillaries and small venules were present in the necrotic zone. The persisting sarcolemmal tubes contained necrotic muscle cell debris, macrophages and mononucleated activated cells. Macrophages and neutrophil leukocytes were also observed in extracellular spaces. Mononuclear activated cells seen in the sarcolemmal tubes showed a different than macrophages morphology. Their clear cytoplasm contained clusters of ribosomes and polyribosomes, a few large mitochondria and rough endoplasmic reticulum. The large nuclei were oval or round, euchromatic and had prominent nucleoli (Fig. 1B). These presumptive myoblasts very often con-



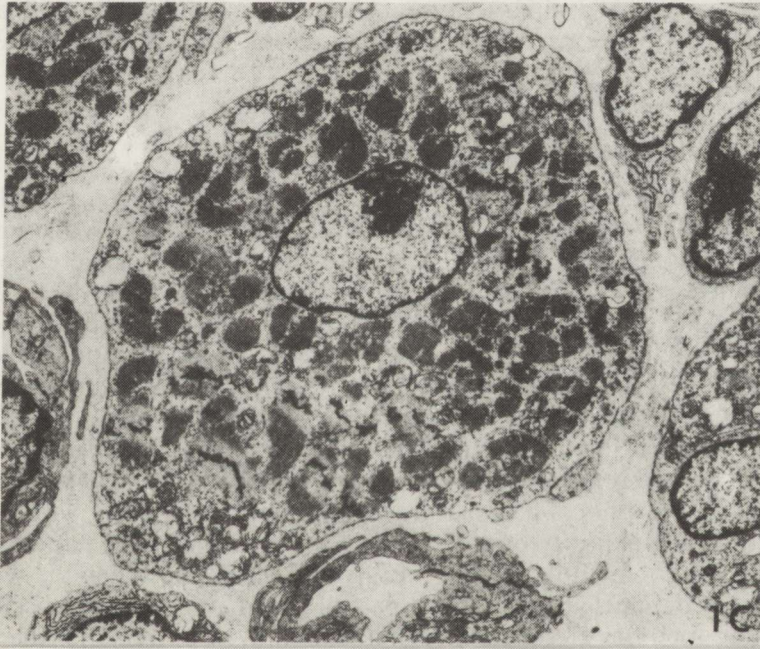
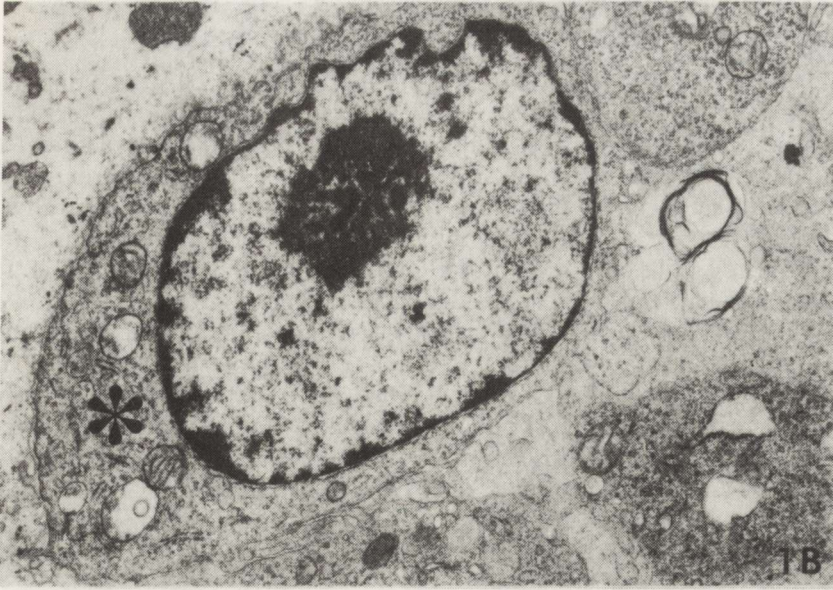


Fig. 1. Group I – normal 16-week-old rat injected with single dose of BPVC. 1A – 3 days after BPVC injection. Necrotic muscle fiber invaded by macrophages. Note peripherally located indifferent cell (arrow). $\times 8100$. 1B – 3 days after BPVC injection. Presumptive myoblast (asterisk) with large euchromatic nucleus and prominent nucleolus. $\times 13000$. 1C – 5 days after BPVC injection. Mature myotube. $\times 6000$

Ryc. 1. Grupa I – 16-tygodniowe szczury, którym podano pojedynczą dawkę BPVC. 1A – 3 dni po podaniu BPVC. Włókno martwicze z makrofagami i widoczna na obwodzie komórka niezróżnicowana (strzałka). Pow. $8100\times$. 1B – 3 dni po podaniu BPVC. Mioblast (gwiazdka) z euchromatycznym jądrem i dużym jąderkiem. Pow. $13000\times$. 1C – 5 dni po podaniu BPVC. Dojrzała miotuba. Pow. $6000\times$

tained thin filaments longitudinally oriented. A few clusters consisted of mononuclear cells within the old basement membrane were observed.

On the 5th day after BPVC injection, most of the old sarcolemmal tubes were filled with several (4 to 7) fusing mononucleated cells at different stages of development. Cells containing myofibrils were located more centrally than undifferentiated ones. Focal continuities and numerous vesicles were present between fusing cells. More mature large myotubes (Fig. 1C) were found occasionally on the periphery of the regenerating zone.

By the end of the first week most of the young small muscle fibers had the appearance of a mature muscle cell. Their cytoplasm contained highly developed myofibrils which completely filled the cell. The sarcotubular system showed normal morphology. Triads were regularly located at the A-I junctions level. The majority of the muscle nuclei were located at the periphery but some of them were still in the center of the fibers. At the periphery of these young muscle fibers large activated satellite cells as well as small secondary myotubes were frequently observed. They were closely connected and enveloped by a common basement membrane.

By the end of the second week the muscle fibers increased in diameter and most of them reached almost normal size. The majority of nuclei migrated towards the periphery but some of them were still located in the center of the fiber.

Group II – adult denervated rats

5 days after administration of BPVC the regenerating denervated muscle showed visible differences, as compared with control muscle. While in normal innervated muscle massive necrosis and active phagocytosis were seen up to 3 days, in denervated muscle they were still present on the 5 day (Fig. 2A). The periphery of numerous necrotic fibers was occupied by presumptive myoblasts, often forming semilunar caps (Fig. 2A). Very few clusters of mononuclear cells within the old basement membrane tubes were found. The number of fusing cells forming clusters was less numerous than in control muscle. They contained also less myofibrils in their cytoplasm. On the 7th day noticeable differences were observed between adult denervated and control muscle. While the control muscle fibers had matured to young muscle fibers with activated satellite cells, the majority of regenerating cells in the denervated muscles had the appearance of myotubes with centrally located nuclei. When the sectioning plane missed the nucleus, the central part of the muscle fiber was occupied by sarcoplasm, rich in glycogen and mitochondria. Contrary to the control muscle, no clusters were observed. After 14 days two populations of myotubes were seen in regenerating adult denervated muscle. Larger myotubes, 13 to 14 μm in diameter, with abundant cytoplasm tightly filled with myofibrils and smaller ones 6 to 7 μm in diameter with scanty cytoplasm were present. Heterochromatic nuclei, irregular in shape, had very often a folded or indented surface. The outline of the myotubes became slightly irregular. The regenerating adult denervated muscle 4 weeks after BPVC injection consisted of small irregular in shape myotubes with heterochromatic and folded nuclei (Fig. 2B).

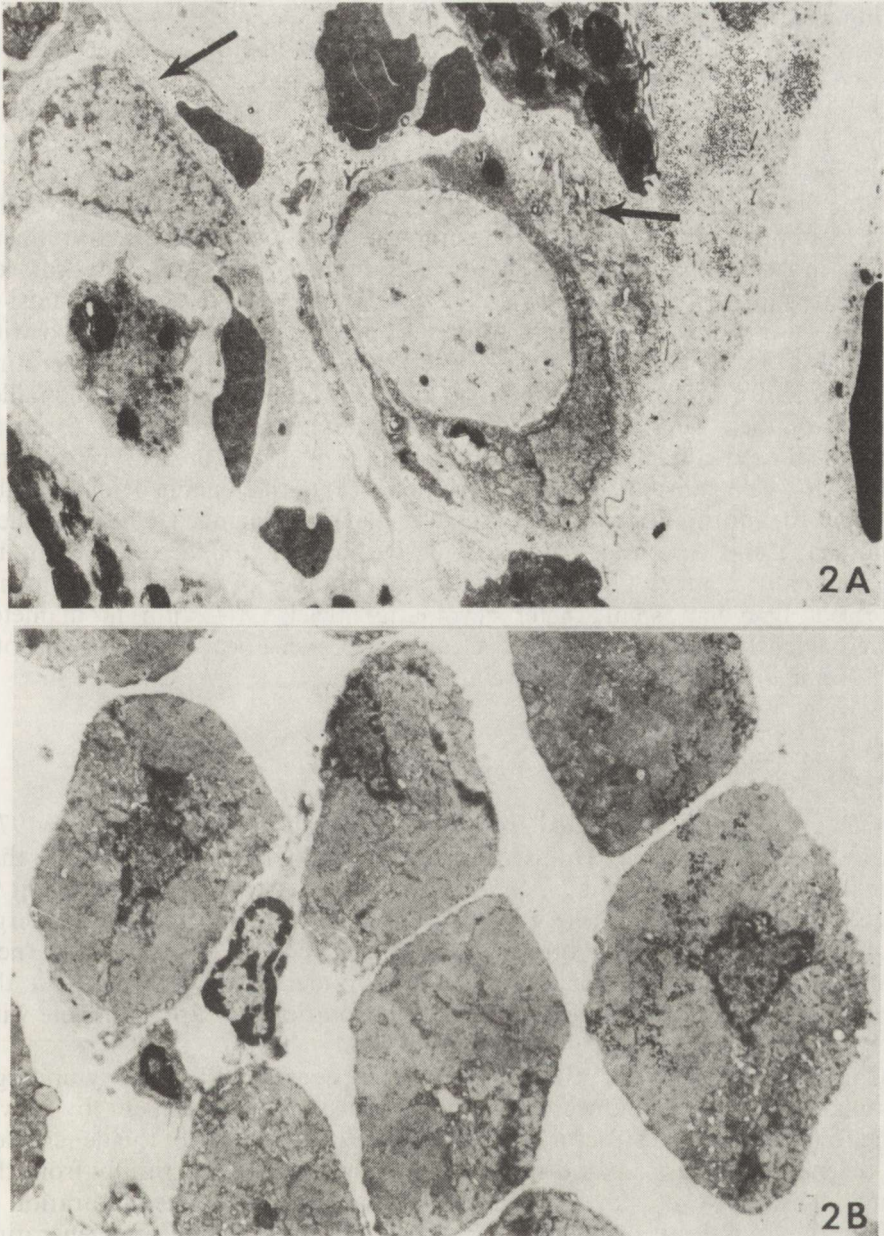


Fig. 2. Group II – rats denervated at the age of 8 weeks and injected with single dose of BPVC 8 weeks later. 2A – 5 days after BPVC injection. Presumptive myoblasts (arrows) forming caps at the periphery of necrotic muscle cells. $\times 4680$. 2B – 28 days after BPVC injection. Myotubes irregular in shape with heterochromatic nuclei. $\times 4680$

Ryc. 2. Grupa II – szczury odnerwione w 8 tygodniu życia, którym 8 tygodni później podano pojedynczą dawkę BPVC. 2A – 5 dni po podaniu BPVC. Mioblasty układające się na obwodzie włókien martwiczych. Pow. $4680\times$. 2B – 28 dni po podaniu BPVC. Miotuby o nieregularnym kształcie z heterochromatycznymi jądrami. Pow. $4680\times$

Group III — neonatally denervated muscle

Five days after BPVC administration distinct differences were observed between groups II and III. While in adult denervated muscle (Group II), necrotic muscle cells invaded by macrophages were the most characteristic finding, in group III the majority of regenerating fibers had the appearance of myotubes (Fig. 3A). These myotubes varied in size from 4 to 9 μm and contained large euchromatic nuclei with prominent nucleoli. Hof regions of the nuclei contained ribosomes, rough endoplasmic reticulum and a prominent Golgi complex. The cytoplasm of myotubes contained different numbers of well formed myofibrils. On the 7th day, the myotubes increased in diameter, most of them reaching from 11 to 14 μm . Abundant cytoplasm was tightly filled with myofibrils (Fig. 3B). Fourteen days after BPVC injection the regenerating myotubes had a morphology similar to that on the 7th day except a smaller diameter of their nuclei. Central nuclei irregular in shape, 2.2 to 2.5 μm in diameter showed condensation and margination of the chromatin. By the end of the 4th week, most of the newly formed fibers still remained in myotube stage, but the morphology of these cells was markedly changed. They lost their round shape and became irregular. Extensive infolding of the cell membrane was frequently observed. Fiber diameter and number of contractile elements decreased. Irregular, small, heterochromatic nuclei 1.8–2 μm in diameter showed extensive infolding of the nuclear membrane. Focal dilatation of both the SR and T-system was also frequently found.

DISCUSSION

Our experiment confirmed previous observations (Benoit, Belt 1970; Jirmanova, Thesleff 1972; Hall-Craggs 1974; Hall-Craggs, Seyan 1975) that normal adult muscle exhibits an excellent regenerative capacity. Subsequent to BPVC injury the satellite cells of normal muscle are activated and undergo mitotic divisions providing numerous myoblasts which fuse and form new myotubes. By the 7th day mature young myofibers extend throughout the originally damaged area. By the 14th day regeneration is nearly complete with most muscle cells showing a mature structural pattern.

Chronically denervated adult muscles subsequent to BPVC injury undergo a similar time course of necrosis, phagocytosis and replacement by newly formed myoblasts. The structural pattern of the initial stages of the denervated and regenerating muscle could not be distinguished ultrastructurally from the normal ones. However, starting with the 7th day, slowing of the maturation of regenerating muscles became noticeable and by 4 weeks, when in regenerating innervated muscle newly formed muscle cells appeared normal, the regenerating muscle cells in denervated muscle remained at the myotube stage. These observations are in agreement with those made at the ultrastructural level by Jirmanova and Thesleff (1972). These authors found that the initial stages of regeneration in muscle denervated at the time of BPVC injection proceeded normally, but delay was apparent by the 5th day. By the 15th day, maturation had not proceeded beyond the stage of small immature muscle fibers with centrally located nuclei. The persistence of myotubes was probably due to

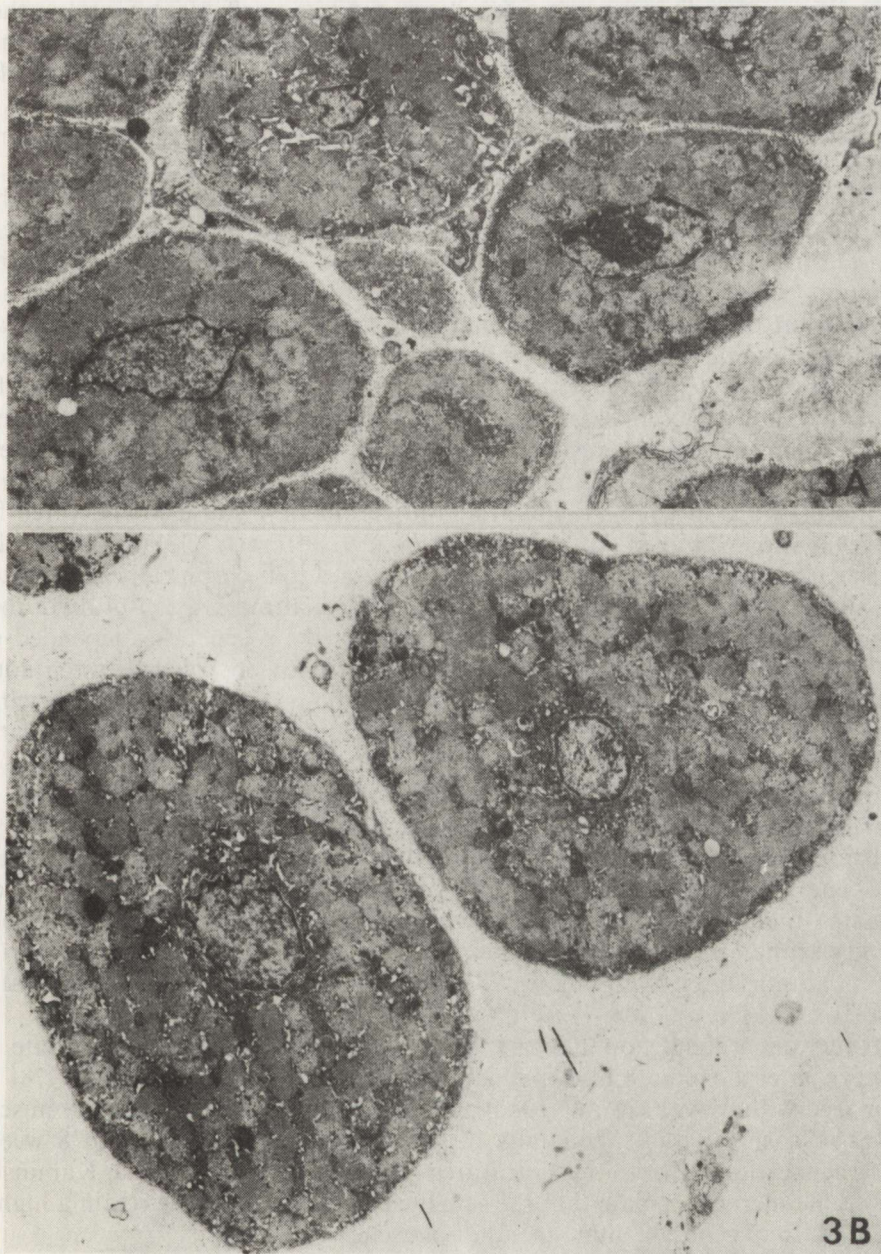


Fig. 3. Group III – neonatally denervated rats injected with single dose of BPVC 8 weeks later. 3A – 5 days after BPVC injection. Myotubes with well preserved structure, variable in size. $\times 4200$. 3B – 7 days after BPVC injection. Large myotubes tightly filled with myofibrils. $\times 6000$

Ryc. 3. Grupa III – szczury odnerwione po urodzeniu, którym podano pojedynczą dawkę BPVC 8 tygodni później. 3A – 5 dni po podaniu BPVC. Miotuby o różnej średnicy i prawidłowej strukturze. Pow. $4200\times$. 3B – 7 dni po podaniu BPVC. Duże miotuby ściśle wypełnione miofibrilami. Pow. $6000\times$

a lack of neurotrophic influence since Jirmanova, Thesleff (1972) found in their electrophysiological studies, that in the innervated muscle motor nerves had formed contact with regenerating muscle cells by the third day after methyl BP injection. In the same experimental model Sadeh et al. (1985) observed regenerating myotubes with newly-formed end-plates delineated by cholinesterase stain on the 4th day.

These data as well as our results agree with the observations of other authors (Jirmanova, Thesleff 1972; Hall-Craggs, Seyan 1975; Gulati 1988) who reported that the lack of contact with the nervous system resulted in a slowing down of growth and of maturation of muscle fibers. A question that had received but little attention in the literature is whether muscle can regenerate after longstanding denervation. While the first stage of the regeneration process could proceed independently, motor innervation, however, was necessary for the maintenance of cell differentiation and maturation. In 1956 Walton and Adams found no signs of regeneration in adult rabbit muscle which had been denervated for 3 months before being injected with oil and alcohol, and only few muscle buds of small regenerating muscle fibers in muscle denervated for 6 weeks and examined 10 days after injury. Recently, Gulati (1988) also observed successful muscle fiber regeneration in adult, chronically denervated and autotransplanted rat muscle with only a partial maturation of myotubes. He too suggested that the late differentiation of the regenerates depended on innervation. In the present experiment the difference observed between adult and neonatally denervated muscle is of special interest. Neonatally denervated muscle showed more active *de novo* myotube formation than the denervated adult as well as control muscle. Small regenerating myotubes found in neonatally denervated muscle were formed earlier in the time course of regeneration than in adult innervated muscle.

It is widely accepted (Allbrook 1981) that muscle regenerates from satellite cells. The fact that regeneration can occur in chronically denervated muscle indicates that the satellite cells retain their myoblastic potential for a long period of time. In fact an increased number of satellite cells have been reported both in adult (Ontell 1975; Snow 1983) and neonatal (Schultz 1978) denervated muscle.

However, a significant increase in satellite cells was observed as late as 6 weeks after denervation in neonatal denervated muscle (Schultz 1978) as compared with 3 weeks (Snow 1983) and 30 days (Ontell 1975) in adult muscle. It was also shown that neonatally denervated muscle retains up to 8 weeks after denervation morphological features of immaturity (Finowicka, Kamińska 1988). One might speculate that the satellite cells in such muscle retain a higher potential to regenerate than in adult muscle.

It can be summarized that the ability of the muscle to regenerate in response to injury is a property which can survive for a long period after loss of its nerve supply. Regenerating muscle fibers originate from primarily non-innervated satellite cells present in chronically denervated muscle. The initial stages of regeneration proceed relatively independent from neural influences, motor innervation, however, is necessary for muscle fiber differentiation and maturation.

Acknowledgements. We wish to thank Prof. I. Hausmanowa-Petrusewicz for critically reading this paper and helpful suggestions.

REGENERACJA ODNERWIONEGO MIĘŚNIA SZKIELETOWEGO SZCZURA.
BADANIA ULTRASTRUKTURALNE

Streszczenie

Celem badań była ocena elektronowo-mikroskopowa procesu regeneracji zachodzącego w przewlekłe odnerwionym mięśni szkieletowym szczura, po podaniu miotoksycznego środka bupiwakainy (BPVC). Porównywano mięsień szczura odnerwiony bezpośrednio po urodzeniu, odnerwiony mięsień szczura dorosłego i prawidłowo unerwiony mięsień szczura dorosłego, do których wstrzyknięto BPVC.

Z przeprowadzonych badań wynika, że najaktywniejszą regenerację obserwowano w mięśni szczura odnerwionego bezpośrednio po urodzeniu. O ile jednak początkowe stadia regeneracji włókna mięśniowe są niezależne od unerwienia, to dojrzewanie i różnicowanie metaboliczne regenerujących włókien mięśniowych jest ściśle związane z unerwieniem.

REFERENCES

1. Allbrook D.: Skeletal muscle regeneration. *Muscle Nerve*, 1981, 4, 234–245.
2. Benoit P. W., Belt W. D.: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat*, 1970, 107, 547–556.
3. Hall-Craggs E. C. B.: Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcaine). *Exp Neurol*, 1974, 43, 349–358.
4. Hall-Craggs E. C. B., Seyan H. S.: Histochemical changes in innervated and denervated skeletal muscle fibers following treatment with bupivacaine (Marcaine). *Exp Neurol*, 1975, 46, 345–354.
5. Jirmanova S., Thesleff S.: Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. *Z Zellforsch*, 1972, 131, 77–97.
6. Finowicka J., Kamińska A.: Effect of denervation on muscle maturation in rats. *Neuropatol Pol*, 1988, 26, 283–301.
7. Gulati A. K.: Long-term retention of regenerative capability after denervation of skeletal muscle and dependency of late differentiation on innervation. *Anat Rec*, 1988, 220, 429–434.
8. Nonaka I., Takagi A., Ishiura S., Nakase H., Sugita H.: Pathophysiology of muscle fiber necrosis induced by bupivacaine hydrochloride (Marcaine). *Acta Neuropathol (Berl)*, 1983, 60, 167–174.
9. Ontell M.: Evidence for myoblastic potential of satellite cells in denervated muscle. *Cell Tissue Res*, 1975, 160, 345–353.
10. Sadeh M., Stern L. Z., Czyżewski K.: Changes in end-plate cholinesterase and axons during muscle degeneration and regeneration. *J Anat*, 1985, 140, 165–176.
11. Schlutz E.: Changes in the satellite cells of growing muscle following denervation. *Anat Rec*, 1978, 190, 299–312.
12. Snow M. H.: A quantitative ultrastructural analysis of satellite cells in denervated fast and slow muscles. *Anat Rec*, 1983, 207, 593–604.
13. Studitsky A. N., Zhenevskaya R. P., Rumyantseva O. N.: The role of neurotrophic influence upon the restitution of structure and function of regenerating muscles. *Rev Canad Biol*, 1963, 22.
14. Walton J. N., Adams R. D.: The response of the normal, the denervated and the dystrophic muscle cell to injury. *J Pathol Bacteriol*, 1956, 72, 273–298.
15. Zhenevskaya R. P.: Experimental histologic investigation of striated muscle tissue. *Rev Canad Biol*, 1962, 21, 457–470.

Authors' address: Neuromuscular Unit, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 1 A Banacha Str., 02-097 Warsaw, Poland.

MILENA LAURE-KAMIONOWSKA

PARANEOPLASTIC CEREBELLOPATHIES IN INFANTS

Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

Paraneoplastic disorders may be defined as diseases due to neoplasms elsewhere in the body, but not due to local metastases or infiltrations. The central nervous system, especially the cerebellum is frequently involved by paraneoplastic processes (Norris 1972).

The aim of the present investigation was to study the changes in the maturing cerebellum of infants who died of neoplastic disease. Attention was focused on the structure and topography of cerebellar lesions in the course of primary neoplasms localized beyond the nervous system.

MATERIAL AND METHODS

The investigations were carried out on 30 brains of children who died at different ages (months - 17 years) in the course of neoplastic diseases. The brain was involved neither by tumor nor cerebral and meningeal metastases. The neoplasms had various localizations. Autopsy examination showed 7 neuroblastomas, 5 liver carcinomas, 2 kidney neoplasms, 3 carcinomas of other internal organs, 4 sarcomas and 8 disseminated neoplasms (such as leukemias, lymphogranulomatosis and malignant lymphomas). Eight of them were not treated, others were treated by polytherapy (chemotherapy, radiotherapy and surgery). Antimitotic drugs were used in classical compositions. Neurological symptoms characteristic for cerebellar dysfunction have not been observed in any cases.

Neuropathological examination was carried out on representative slides from the cerebellar hemispheres and vermis at several levels.

RESULTS

The severity and topography of cerebellar lesions allowed to divide the examined cases into 4 groups.

The first group included 6 cases which showed minimal lesions of Purkinje

Table 1. Group 1. Clinicopathological data
Tabela 1. Grupa 1. Dane kliniczne i anatomopatologiczne

Case Przypadek	Age Wiek	Diagnosis Rozpoznanie	Treatment Leczenie	Neuropathological examination Badanie neuropatologiczne		
				Hemisphaeria cerebelli	Vermis	Lobulus nodulo-floccularis
99/79	2 mos mies.	neuroblastoma	—	—	—	—
25/84	1 yr/rok	nephroblastoma	—	—	—	P
7/80	3 yrs lata	hepatoblastoma	surgery operacja	—	—	—
55/80	3 yrs lata	sarcoma	no data brak danych	—	—	P
65/80	6 yrs lat	ca hepatocell.	surgery operacja	—	—	P
22/83	15 yrs lat	craniopharyng.	surgery operacja	—	—	P

P — Purkinje cells lesions
uszkodzenie komórek Purkiniego

Table 2. Group 2. Clinicopathological data
Tabela 2. Grupa 2. Dane kliniczne i anatomopatologiczne

Case Przypadek	Age Wiek	Diagnosis Rozpoznanie	Treatment Leczenie	Neuropathological examination Badanie neuropatologiczne		
				Hemisphaeria cerebelli	Vermis	Lobulus nodulo-floccularis
97/79	6 mos mies.	neuroblastoma	—	P	—	—
10/83	1 yr rok	neuroblastoma	—	—	P	P
35/82	3 yrs lata	rhabdomyosarcoma	chtr, surg	P	—	—
61/82	4 yrs lata	neuroblastoma	chtr	—	P	P
23/84	7 yrs lat	nephroblastoma	chtr	P	P	P
9/83	10 yrs lat	leucaemia	chtr	P	—	P

chtr — chemotherapy
chemioterapia
surg — surgery
operacja

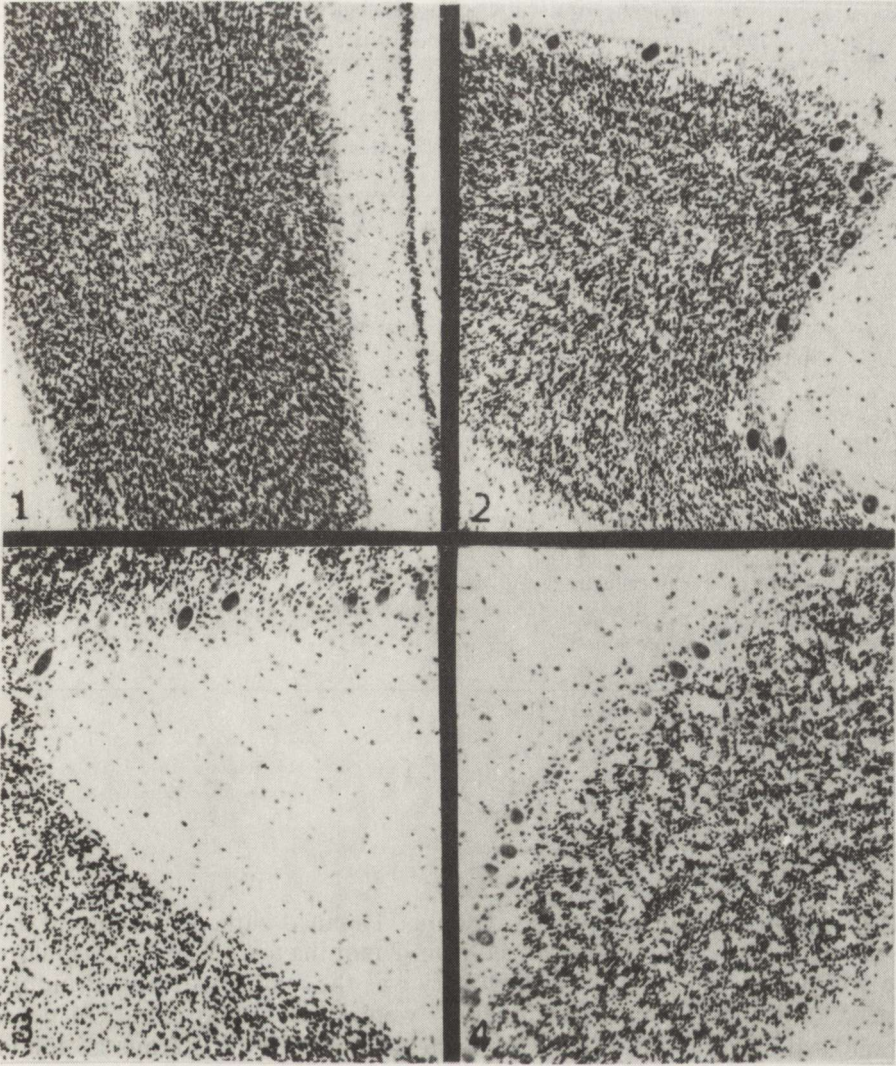


Fig. 1. Cerebellar cortex with minimal lesions of Purkinje cells. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 1. Minimalne uszkodzenie komórek Purkiniego. Fiolet krezyłu. Pow. $100\times$

Fig. 2. Damage and loss of Purkinje cells at the top of cerebellar gyri. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 2. Uszkodzenie komórek Purkiniego na szczycie zawojów mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. $100\times$

Fig. 3. Widespread loss of Purkinje cells at the bottom of cerebellar sulci. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 3. Rozległe ubytki komórek Purkiniego na dnie rowków. Fiolet krezyłu. Pow. $100\times$

Fig. 4. Aggregations of granule cells and loss of Purkinje cells in the flocculonodular lobe. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 4. Skupienia komórek ziarnistych i ubytki komórek Purkiniego. Fiolet krezyłu. Pow. $100\times$

Table 3. Group 3. Clinicopathological data
 Tabela 3. Grupa 3. Dane kliniczne i anatomopatologiczne

Case Przypadek	Age Wiek	Diagnosis Rozpoznanie	Treatment Leczenie	Neuropathological examination Badanie neuropatologiczne		
				Hemisphaeria cerebelli	Vermis	Lobulus nodulo- flocularis
32/80	4 mos mies.	hepatoblastoma	—	P	P, Gr	no exam. nie badany
79/79	8 mos. mies.	neuroblastoma	chtr, rtg	P	P, Gr	P, Gr
102/79	8 mos. mies.	histiocytosis X	—	P, Gr	—	P, Gr
40/80	5 yrs lat	adenoca gl. mand.	chtr, rtg	P, Gr	no exam. nie badany	P, Gr
33/80	8 yrs lat	neuroblastoma	surg	P, Gr	P	P, Gr
66/80	11 yrs lat	ca hepatocellulare	chtr, surg	P, Gr	P, Gr	no exam. nie badany
54/80	15 yrs lat	ca hepatocellulare	no data brak danych	P, Gr	no exam. nie badany	P, Gr
69/80	17 yrs lat	lymphoma mal.	chtr, rtg	P, Gr	—	P, Gr

rtg — radiotherapy
 radioterapia

Gr — granular layer damage
 uszkodzenie warstwy ziarnistej

cells limited to the flocculonodular lobulus. Detailed clinicopathological data are shown in Table 1. The age ranged from 2 months to 15 years. Two children died without treatment, in 2 cases surgery was the main treatment. Prolonged surgery, radiotherapy and chemotherapy were given in two cases. On neuropathological examination of the cerebellar hemispheres and vermis no lesions were observed. However, in the flocculonodular lobulus minimal degeneration of the Purkinje cells was found (Fig. 1).

In the second group (6 cases) disseminated lesions of the Purkinje cells including all structures of the vermis and hemispheres were found. Clinicopathological data are shown in Table 2. The children died at the age of 6 months to 10 years. One infant was not treated, to another chemotherapy was administered only for a few days, in others complex, prolonged therapy was applied.

Involvement of the Purkinje cells concerned the hemispheres, vermis and flocculonodular lobulus. At the top of cerebellar gyri damage and loss of Purkinje cells were noted with some glial proliferation (Fig. 2). At the bottom of the sulci of the cerebellar hemispheres lesions of the Purkinje cells were very widespread (Fig. 3). The changes were localized mainly in the centrally located lobuli. Similar changes were observed in the vermis at the marginal lobuli. Bergmann's glia proliferation was uncommon in the depth of the sulci. In the

Table 4. Group 4. Clinicopathological data
 Tabela 4. Grupa 4. Dane kliniczne i anatomopatologiczne

Case Przypadek	Age Wiek	Diagnosis Rozpoznanie	Treatment Leczenie	Neuropathological examination Badanie neuropatologiczne		
				Hemisphaeria cerebelli	Vermis	Lobulus nodulo- flocularis
12/83	2 mos mies.	adenoca gl. mand.	—	Gr	Gr > P	P, Gr
101/79	1,5 yrs roku	histiocytosis	—	no exam. nie badany	Gr > P	Gr
56/80	2 yrs lata	neuroblastoma	chtr, rtg	Gr > P	Gr > P	P, Gr
96/79	7 yrs lat	lymphosarcoma	chtr, rtg	Gr	Gr	P, Gr
64/80	7 yrs lat	lymphoma mal.	chtr	P, Gr	Gr > P	P, Gr
11/80	8 yrs lat	neo mal. femoris	chtr, rtg, surg	Gr	Gr	no exam. nie badany
114/79	9 yrs lat	lymphogranulo- matosis mal.	chtr, rtg	Gr > P	Gr > P	P, Gr
108/79	12 yrs lat	sarcoma Evingi	no data brak danych	Gr	Gr	no exam. nie badany
26/83	13 yrs lat	leucaemia lymph.	chtr	Gr	Gr	no exam. nie badany
77/82	14 yrs lat	ca mucocell. recti	—	Gr	Gr > P	P, Gr

flocculonodular lobulus, besides the Purkinje cells lesions, minimal changes of the granular layer were seen in the form of aggregations of granule cells (Fig. 4). Generalized lesions concerning both, the Purkinje and granule cells, in all cerebellar structures were found in 8 cases and constituted the third group (Table 3). The age of the children ranged from 4 months to 17 years. Extensive, almost complete loss of the Purkinje cells included central and peripheral parts of the gyri. It was associated with thinning of the granular layer (Fig. 5). Rarefaction of granule cells was disseminated among the cerebellar lobuli. Widespread loss of granule cells in the vermis was also observed.

The fourth group (Table 4) included 10 cases which showed a predominance of granular layer lesions. The children's age was in the range of 2 months—14 years. In 2 of them chemotherapy was given only for a few days. In others, complex prolonged therapy was administered.

Neuropathological examination revealed predominance of the lesions of the granular layer. Changes were found in the vermis and hemispheres in the form of focal granule cells loss with moderate glial reaction or widespread disappearance of the granule cells (Fig. 6). The Purkinje cells were comparatively normal. In the cerebellum of a 2-month-old child atrophy concerned both granular layers — the internal and external Obersteiner's layer from which granule cells arise during brain development.

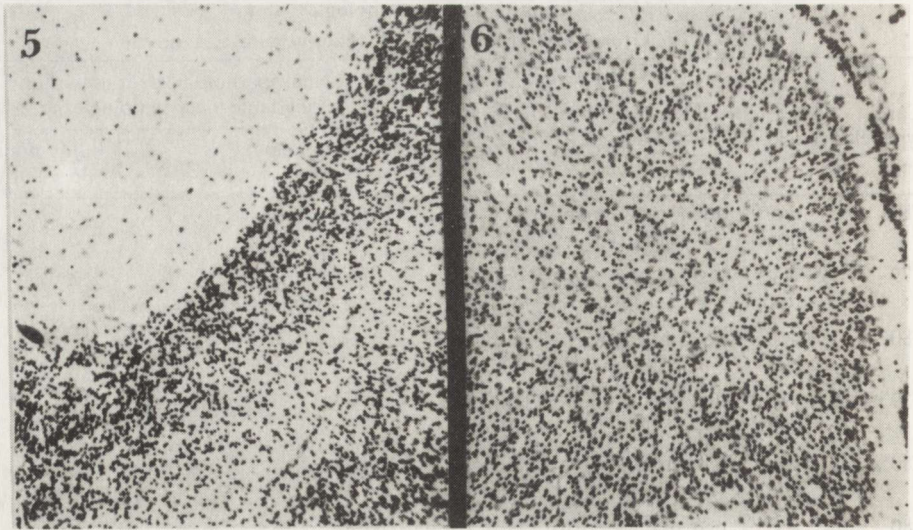


Fig. 5. Almost complete loss of the Purkinje cells and rarefaction of the granular layer. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 5. Zanik komórek Purkiniego i rozrzedzenie warstwy ziarnistej. Fiolet kryzylu. Pow. $100\times$

Fig. 6. Disappearance of the granule cells and moderate glial reaction. Cresyl violet. $\times 100$

Ryc. 6. Zanik komórek ziarnistych z umiarkowaną reakcją glejową. Fiolet kryzylu. Pow. $100\times$

DISCUSSION

On histopathological examination of the cerebellum only 1/5 of cases showed minimal lesions of the Purkinje cells limited to the flocculonodular lobe. The remaining cases had generalized lesions in all the examined structures. Pathological changes of various intensity were observed in the form of disseminated lesions of Purkinje cells, widespread lesions concerning both the Purkinje and granule cells, and prevalent granular layer lesions.

Cerebellar changes were seen in more than 2/3 of cases, despite the absence of clinical symptoms of cerebellar dysfunction. The appearance of cerebellar lesions in infants is similar to that observed in adults (Tarnowska-Dziduszko 1987) with prominent lesions of the granular layer in half of the cases. In the examined material there was no connection between the localization and intensity of changes in the cerebellum and the type of neoplastic disease or the treatment. Similar conclusions concerning paraneoplastic cerebellopathies in adults were reached by Urich (1967) and Smith (1976). The particular feature of the paraneoplastic cerebellopathies in infants was the damage of the granular external Obersteiner's layer.

The structure and localization of the described pathological changes may explain the pathomechanism of those lesions. The most remarkable diffuse loss of Purkinje cells was found at the border zones of the vascularization regions (in the cerebellar tonsillae, the edge of vermis and centrally located lobuli). Damage of vascular walls may be partially responsible for these lesions. Fibrosis, hyalinization or even necrosis of vessel walls are seen in brains of

children with neoplastic disease (Dąbska et al. 1986). Disturbances in the blood flow resulting in ischemia could lead to widespread disappearance of the particularly vulnerable Purkinje cells. In the granular layer anaerobic glycolysis takes place in the course of ischemia, leading to edema and rarefaction of the granule cells (Friede 1963). Generalized metabolic disturbances during the fatal course of neoplastic disease and the toxic effect of the treatment could be another cause of granule cell degeneration (Hirano et al. 1973).

Probably very complex pathomechanisms lead to the development of paraneoplastic cerebellopathy. The pathological cerebellar changes are, on the one hand, directly or indirectly of toxic origin, on the other hand, they seem conditioned by the anoxic-ischemic processes due to damage of vascular walls and the particular vulnerability of the cerebellar cortex to hypoxia.

CEREBELLOPATIE PARANOWOTWOROWE W MATERIALE DZIECIĘCYM

Streszczenie

Opracowanie dotyczy mózdków trzydziściorga dzieci zmarłych z powodu choroby nowotworowej narządów wewnętrznych, nie leczonych lub leczonych chemioterapią, radioterapią i operacyjnie. W 1/5 przypadków stwierdzono niewielkie uszkodzenie mózdku, głównie płacika grudkowo-kłaczkowego (grupa 1). W pozostałych przypadkach zmiany były uogólnione, dotyczyły wszystkich struktur. Obserwowano rozsiane uszkodzenie komórek Purkiniego we wszystkich strukturach (grupa 2), uogólnione zmiany dotyczące zarówno warstwy komórek Purkiniego, jak i warstwy ziarnistej (grupa 3) oraz przeważające uszkodzenie warstwy ziarnistej (grupa 4). W mózdku dziecka dwumiesięcznego uszkodzenie dotyczyło obu warstw ziarnistych – wewnętrznych i zewnętrznej Obersteiner. Uszkodzenia warstwy ziarnistej były rozlane, występowały w robaku oraz centralnych i obwodowych częściach płacików półkul. Największe nasilenie zaników komórek Purkiniego obserwowano na pograniczu obszarów unaczynienia w centralnie rozmieszczonych płacikach mózdku, brzeżnych zakrętach robaka i migdałkach. Nasilenie i lokalizacja zmian nie wykazywały związku z rodzajem nowotworu ani ze sposobem i czasem leczenia.

REFERENCES

1. Dąbska M., Schmidt-Sidor B., Laure-Kamionowska M., Izbiński T.: Changes in brains of infants and children who died of neoplastic disease. *Neuropatol Pol*, 1986, 24, 261–269.
2. Friede R. L.: Cerebellar edema. A metabolic and cell statistical analysis. *Arch Neurol*, 1963, 8, 67–81.
3. Hirano A., Dembitzer H. M., Ghatak N., Fan K. J., Zimmerman H. M.: On the relationship between human and experimental granule cell type cerebellar degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1973, 32, 493–502.
4. Norris F. H.: The remote effects of cancer on the nervous system. *Z Neurol*, 1972, 201, 201–210.
5. Smith T.: Nutritional deficiencies and disorders neuropathies associated with carcinoma. In: *Greenfield's Neuropathology*. Eds.: Blackwood W., Corsellis Arnold J. A. N., London, 1976, p. 219.
6. Tarnowska-Dziduszko E.: Morphological picture of the cerebellum in the course of malignant neoplasm developing primarily beyond the central nervous system. VIIth Conf of Assoc of Polish Neuropathologists, Gdańsk, 1987, Abstracts, p. 30.
7. Ulrich H.: The remote effects of cancer on the nervous system pathology. *Proc R Soc Med*, 1967, 60, 690-692.

Author's address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteura Str., 02-093 Warszawa, Poland.

SPIS PRAC ZAMIESZCZONYCH
W KWARTALNIKU „NEUROLOGIA POLSKA”
TOM XXVI – 1988

Beskid Miroslaw, Markiewicz Danuta: Zmiany morfologiczne w mózgu szczurów po dosercowym i dootrzewnowym podaniu kwasu chinolinowego	61
Bugera-Piecuch Teresa: Poziom kwasu homowanilinowego (HVA) i aktywność amino transferazy 4-aminomaślan: 2-oksoglutaranu (GABA-T) w mózgu szczura po zatruciu octanem kobaltowym	69
Dąbska Maria: Ewolucja poglądów na choroby i procesy zwyrodnieniowe układu nerwowego	1
Finowicka Jolanta, Kamińska Anna M.: Effect of denervation on muscle maturation in rats	283
Gajkowska Barbara, Viron Annie: Immuno-gold staining of leu-enkephalin the rat hypothalamic neurosecretory nuclei	203
Gajkowska Barbara, Zaręba-Kowalska Anna: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego	317
Gajkowska Barbara, Gadamski Roman, Wawrzyniak Elżbieta: Wpływ krótkotrwałego niedokrwienia na ultrastrukturę zakrętu hipokampa u chomików mongolskich. Część I. Ultrastrukturalna charakterystyka odcinka CA ₁ rogu Amona ze szczególnym uwzględnieniem obrazu połączeń synaptycznych	455
Godlewski Antoni, Szczech Józef, Florczak Jolanta: Multiple, primary multifocal brain astrocytoma. Case report	111
Goncerzewicz Andrzej : The role of astroglia in pathological processes characterized by myelin disintegration. II. Electron enzyme and immunocytochemistry of the astroglia in experimental injury to white matter	127
Hausmanowa-Petrusewicz Irena: The Emery-Dreifuss disease	265
Iwanowski Lech: Apoptosis and dark neurons	573
Kałuża Józef, Adamek Dariusz, Mieżyński Witold, Stolfa Wojciech: Morfologiczne wykładniki zmian w ośrodkowym układzie nerwowym w sinicznych i niesinicznych wadach wrodzonych serca w wieku rozwojowym I. Morfometryczna ocena unaczynienia mózgu i mózdzku w wrodzonych wadach sinicznych i niesinicznych serca	49
Kapuściński Andrzej: Bariera krew-mózg w modelu śmierci klinicznej u szczurów	175
Kida Elżbieta, Renkawek Krystyna: Morphological alterations of rat substantia nigra induced by short-lasting anoxia <i>in vitro</i>	193
Kida Elżbieta, Matyja Ewa, Khaspekov Leonid: The ultrastructure of rat hippocampal formation in organotypic tissue culture after exposure to quinolinic acid	507
Kowalczuk Krystyna, Jesionek Danuta, Nowosadzka Ewa, Borkowska Irena: Badania aktywności β -monooksygenazy dopaminowej w mózgu i nadnerczach królika pt.	225
Krajewski Stanisław, Dolińska Ewa, Rafałowska Janina: Ocena bariery krew-mózg w wybranych przypadkach zawałów mózgu człowieka. Badania immunocytochemiczne	359
Krajewski Stanisław, Dolińska Ewa, Rafałowska Janina: Kwaśne włókienkowe białko glejowe oraz znaczniki histiocytarne w wybranych przypadkach zawałów mózgu człowieka	493
Kuchna Izabela, Kulerski Marek, Róg-Marczuk Joanna: Neuropatologia zespołu Reye'a	547
Liberski Paweł P.: The occurrence of cytoplasmic lamellar bodies in scrapie infected and normal hamster brains	79
Liberski Paweł P., Papierz Wielisław, Alwasiak Janusz, Szulc-Kuberska Janina, Różniecki Jacek: Diagnostic difficulties in a case of subacute sclerosing encephalitis. Light and electron-microscopic studies	97
Markiewicz Danuta, Matuszkiewicz Ludwik, Pawińska Elżbieta: Podostre stwardniające	

zapalenie mózgu z rozlanym uszkodzeniem kory w przypadku z przebyłym urazem czaszki	561
Matyja Ewa, Renkawk Krystyna: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in patient with dominating dementia	87
Matyja Ewa, Kida Elżbieta: Dynamics of rat hippocampus development in organotypic tissue culture. Light and electron-microscopic study	431
Matyja Ewa, Kroh Halina: Atypical morphological components in a tumor of the cerebello-pontine angle	581
Mossakowski Mirosław J.: Aleksander Arendt	123
Mossakowski Mirosław J., Krajewski Stanisław: Antineural antibodies in blood sera of rats subjected to global cerebral ischemia	163
Niebrój-Dobosz Irena, Wiśniewska Wiesława, Barcikowska-Litwin Maria: Influence of aging on density of myelin fractions isolated from human brain white matter. Preliminary report	19
Olejniczak Piotr: Mioklonie podniebienia a przerost oliwek. Opis przypadku	377
Pachecka Jan, Podleśny Jerzy, Gaździk Wiesław, Zaremba Katarzyna, Bicz Włodzimierz: Effect of high ambient temperature on distribution of carbamazepine and its main metabolite 10,11-epoxy-carbamazepine in rat brain	259
Pietrzak Marek: Influence of vincristine on the neurosecretory nuclei of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the developing rat	521
Rafałowska Janina, Krajewski Stanisław, Dolińska Ewa, Barcikowska-Litwin Maria: On modification of the histopathological picture of multiple sclerosis in advanced age	211
Skonieczna Maria, Dorsz-Drożdż Urszula, Siwicka Małgorzata, Bicz Włodzimierz: Oxidative phosphorylation and activity of some chosen oxidoreductases of mitochondria of rat brain subjected to severe environmental hyperthermia	245
Szumańska Grażyna, Mossakowski Mirosław J., Januszewski Sławomir: Zmiany aktywności fosfatazy zasadowej i cykazy adenylowej w sieci naczyniowej mózgu w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym	335
Śmiałek Mieczysław: Effect of reduced glutathione (GSH) on dopamine (DA) and gamma-aminobutyric acid (GABA) concentration in the mouse brain following intoxication with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP).	415
Śmiałek Mieczysław, Kittel Marek: Effect of quinolinic acid on gamma-aminobutyric acid concentration in the rat brain	423
Taraszevska Anna: Ultrastructure of axons in disturbed CNS myelination in pt rabbit	385
Walski Michał, Borowicz Jerzy: Badania mikroskopowo-elektronowe elementów szkieletu komórkowego neuronów jąder neurosekrecyjnych podwzgórza szczura	233
Wehr Hanna, Węgiel Jerzy, Dziedzic Wojciech, Medyńska Elżbieta, Nowicka Grażyna: Morphometric analysis of very low density lipoproteins (VLDL) in chronic alcoholics	537
Wender Mieczysław, Adamczewska-Goncerzewicz Zofia, Żórawski Andrzej, Sroczyński Eugeniusz, Grochowalska Alina: Effect of moderate hypoxia on content and pattern of free fatty acids in cerebral white matter	39
Wender Mieczysław, Adamczewska-Goncerzewicz Zofia, Talkowska Danuta, Pankrac Jadwiga: Myelin lipids in senile rat brain	555
Wender Mieczysław, Hejduk-Hantke Hanna, Godlewski Antoni: Karyometric studies of glial cells in corpus callosum of rats developing on a fat deficient diet	403
Wender Mieczysław, Hejduk-Hantke Hanna, <u>Goncerzewicz Andrzej</u> , Wyglądalska-Jernas Halina: Morphometry of myelin in the aging human brain	9
Wender Mieczysław, Hejduk-Hantke Hanna, <u>Goncerzewicz Andrzej</u> , Wyglądalska-Jernas Halina: Morphometric studies of the nerve fibers in corpus callosum of rats exposed to mild hypoxia	185
Wender Mieczysław, Lenart-Jankowska Danuta, Pruchnik-Grabowska Danuta, Kowal Piotr: Different temporal trends in stroke types in the light of autoptic cases	477
Zaręba-Kowalska Anna, Gajkowska Barbara: Wpływ całkowitego niedokrwienia mózgu na ultrastrukturę jądra olbrzymiokomórkowego pnia mózgu szczura	303
Zelman Irmina B., Taraszevska Anna: Histologiczna ocena gleju w procesie mielinizacji u królika pt.	27
Zelman Irmina B., Mossakowski Mirosław J.: Remote pathological brain changes in rats following experimentally induced clinical death	151

INDEKS NAZWISK AUTORÓW

- Adamczewska-Gonczerzewicz Z. 39, 555
 Adamek D. 49
 Alwasiak J. 97
 Barcikowska-Litwin M. 19, 211
 Beskid M. 61
 Bicz W. 245, 259
 Borkowska I. 225
 Borowicz J. 233
 Bugera-Piecuch T. 69
 Dąbska M. 1
 Dolińska E. 211, 359, 493
 Dorsz-Drożdż U. 245
 Dziedziak W. 537
 Finowicka J. 283
 Florczak J. 111
 Gadamski R. 455
 Gajkowska B. 203, 303, 317, 455
 Gaździk W. 259
 Godlewski A. 111, 403
Gonczerzewicz A. 9, 127, 185
 Grochowalska A. 39
 Hausmanowa-Pietruszewicz I. 265
 Hejduk-Hantke H. 9, 185, 403
 Iwanowski L. 573
 Januszewski S. 335
 Jesionek D. 225
 Kałuża J. 49
 Kamińska A. M. 283
 Kapuściński A. 175
 Khaspekov L. 507
 Kida E. 193, 431, 507
 Kittel M. 423
 Kowal P. 477
 Kowalczyk K. 225
 Krajewski S. 163, 211, 359, 493
 Kroh H. 581
 Kuchna I. 547
 Kulerski M. 547
 Lenart-Jankowska D. 477
 Liberski P. P. 79, 97
 Markiewicz D. 61, 561
 Matuszkiewicz L. 561
 Matyja E. 87, 431, 507, 581
 Medyńska E. 537
 Mieżyński W. 49
 Mossakowski M. J. 123, 151, 163, 335
 Niebrój-Dobosz I. 19
 Nowicka G. 537
 Nowosadzka E. 225
 Olejniczak P. 377
 Pachecka J. 259
 Pankrac J. 555
 Papierz W. 97
 Pawińska E. 561
 Pietrzak M. 521
 Podleśny J. 259
 Pruchnik-Grabowska D. 477
 Rafałowska J. 211, 359, 493
 Renkawek K. 87, 193
 Róg-Marczuk J. 547
 Różniecki J. 97
 Siwicka M. 245
 Skonieczna M. 245
 Sroczyński E. 39
 Stolfa W. 49
 Szczech J. 111
 Szulc-Kuberska J. 97
 Szumańska G. 335
 Śmiałek M. 415, 423
 Talkowska D. 555
 Taraszewska A. 27, 385
 Viron A. 203
 Walski M. 233
 Wawrzyniak E. 455

Wehr H. 537
Wender M. 9, 39, 185, 403, 477, 555
Węgiel J. 537
Wiśniewska W. 19
Wyglądalska-Jernas H. 9, 185

Zaręba-Kowalska A. 303, 317
Zaremba K. 259
Zelman I. B. 27, 151
Żórawski A. 39

A. Jędrzejewska, E. Staff-Zielińska, T. Wierzbę-Bobrowicz, Z. Poszwińska, P. Olejniczak: Histological pattern of the central nervous system in rats after intensive chronic ethanol intoxication	93
K. Bombicki: The influence of transplantable epithelioma Guérin on myoelectrical activity	101
P. Nowacki, D. Dolińska: Degenerative changes within the nervous system in non-Hodgkin's lymphomas	109
A. Godlewski, J. Szczęch: <i>Encephalomeningitis chronica eosinophilica</i> caused by cisticercosis cerebri	117
J. Szymaś, K.-A. Hossmann, F. Weber, U. Oschlies: Glial fibrillary acidic protein in human glioblastoma	129
A. Kamińska, A. Fidziańska: Basement membrane component changes during experimental skeletal muscle degeneration and regeneration	141
A. Kamińska, A. Fidziańska: Regenerative capability of denervated rat skeletal muscle: ultrastructural study	151
M. Laure-Kamionowska: Paraneoplastic cerebellopathies in infants	161

SPIS TREŚCI

J. Rafałowska, E. Dolińska, D. Dziewulska, S. Krajewski: Zawały mózgu ludzi w wieku średnim i starczym. I. Zaburzenia przepuszczalności bariery krew-mózg w badaniach immunocytochemicznych	1
A. Kapuściński: Ischemia mózgu zmniejsza gęstość miejsc wiążących ¹²⁵ J-jodipinę w mózgu szczura	19
E. Matyja, E. Kida: Efekt ochronny blokera kanałów wapniowych — nimodipiny na hodowle hipokampa szczura poddane anoksji	25
J. Rafałowska, S. Krajewski, E. Dolińska: Przepuszczalność bariery krew-mózg (BBB) w stwardnieniu rozsianym	41
H. Kroh: Śródnacyniowe elementy aksonalne w doświadczalnym procesie demielinizacyjnym	55
E. Kida, E. Matyja: Charakter i dynamika uszkodzeń ultrastrukturalnych wywołanych przez kwas chinolinowy w organotypowej hodowli hipokampa szczura	67
M. Pietrzak: Wpływ CCNU (Lomustine) na neurosekrecję jąder podwzgórza i nerwowej części przysadki szczura we wczesnym okresie rozwoju pozamacicznego	83
A. Jędrzejewska, E. Staff-Zielińska, T. Wierzba-Bobrowicz, Z. Poszwińska, P. Olejniczak: Obraz histologiczny ośrodkowego układu nerwowego szczura w intensywnym przewlekłym zatruciu etanolem	93
K. Bombicki: Wpływ przeszczepialnego nabłoniaka Guérina na aktywność mioelektryczną	101
P. Nowacki, D. Dolińska: Zmiany zwyrodnieniowe w układzie nerwowym w chłoniakach złośliwych niezłośliwych	109
A. Godlewski, J. Szczech: <i>Encephalomeningitis chronica eosinophila</i> w przebiegu wągrzycy mózgu	117
J. Szymaś, K.-A. Hossmann, F. Weber, U. Oschlies: Kwaśne włókienkowe białko glejowe w ludzkim glejaku wielopostaciowym	129
A. Kamińska, A. Fidziańska: Zmiany składników błony podstawnej włókna mięśniowego w procesie doświadczalnej martwicy i regeneracji	141
A. Kamińska, A. Fidziańska: Regeneracja odnerwionego mięśnia szkieletowego szczura. Badania ultrastrukturalne	151
M. Laure-Kamionowska: Cerebellopatie paranowotworowe w materiale dziecięcym	161

CONTENTS

J. Rafałowska, E. Dolińska, D. Dziewulska, S. Krajewski: Human brain infarcts in middle and senile age. I. Blood-brain barrier permeability in immunocytochemical studies	1
A. Kapuściński: Cerebral ischemia reduces the density of ¹²⁵ I-iodipine binding sites in the rat brain	19
E. Matyja, E. Kida: Protective effect of the calcium entry blocker nimodipine on hippocampal rat cultures submitted to anoxia	25
J. Rafałowska, S. Krajewski, E. Dolińska: The blood-brain barrier (BBB) permeability in multiple sclerosis	41
H. Kroh: Intravascular axonal debris in the experimental demyelination process	55
E. Kida, E. Matyja: Dynamics and pattern of ultrastructural alterations induced by quinolinic acid in organotypic culture of rat hippocampus	67
M. Pietrzak: The influence of CCNU (Lomustine) on the neurosecretion of the hypothalamic nuclei and the neurohypophysis in early stages of extrauterine development of the rat	83