

eqz 2



PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE  
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

# NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 24

1986

ZESZYT 4

---

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

<http://rcin.org.pl>

# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 24

1986

ZESZYT 4

## KOMITET REDAKCYJNY

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

## PRZY WSPÓLPRACY

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

## REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

## REDAKCJA

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

## ADRES REDAKCJI

Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk,  
ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa, tel. 49-82-79, 49-70-18

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1987.  
Nakład: 570 egz. Objętość: ark. wyd. 12,40, ark. druk. 10,75, ark.  
A<sub>1</sub> - 14. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do skła-  
dania 1986.07.16. Podpisano do druków 1987.02.6. Druk ukończono  
w lutym 1987. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 1356/86. J-11.  
Cena zł 150.—

PAWEŁ P. LIBERSKI

## PRZEKAZYWALNA ENCEFALOPATIA GĄBCZASTA. CHOROBY NATURALNE I BADANIA EKSPERYMENTALNE \*

Katedra i Klinika Neurologii AM, Łódź

Podostra przekazywalna encefalopatia gąbczasta obejmuje grupę chorób ośrodkowego układu nerwowego, do której należą: kuru (Gajdusek i wsp. 1966) i choroba Creutzfeldta-Jakoba (CJD) u człowieka (Gibbs i wsp. 1968), a scrapie u owiec i kóz (Dickinson 1976), przekazywalna encefalopatia norek (Marsh, Hanson 1979), przewlekłe choroby neurologiczne u jeleni i łośi północnoamerykańskich (Williams, Young 1980) oraz u białych tygrysów (Kelly i wsp. 1980)\*\*. Choroby te charakteryzuje długi okres inkubacji trwający od miesięcy do dziesiątków lat i przewlekły przebieg, zawsze prowadzący do zejścia śmiertelnego, a z neuropatologicznego punktu widzenia należą do grupy procesów zwyrodnieniowych (Gajdusek 1977).

Są one wywołane przez czynnik infekcyjny, o nie ustalonej strukturze fizykochemicznej. Dla podkreślenia jego odrębności od wirusów „konwencjonalnych”, wiroidów i plazmidów, zaproponowano ostatnio dwa neologizmy, tj. wirino (Dickinson, Outram 1979) i prion (Prusiner 1982). Wydaje się obecnie bardziej uzasadnione używanie nazwy „czynnik”, która nie posiada odniesień do nie znanej struktury fizykochemicznej.

### NEUROPATOLOGIA

Grupę przekazywalnych encefalopatii gąbczastych charakteryzuje triada objawów: ubytki neuronalne, zmiany gąbczaste lub stan gąbczasty oraz przerost i rozplem astrocytów. W ostatnich latach wyróżniono jeszcze jeden element — tworzenie płytek amyloidowych (plak).

\* Praca częściowo finansowana przez Ministerstwo Zdrowia i Opieki Społecznej (Program nr 5).

\*\* Istnieją dane o pozytywnym wyniku przeniesienia choroby z inokulum otrzymanego od chorych jeleni (P. Brown — informacja własna).

Ubytki neuronalne dotyczą różnych układów czynnościowych ośrodkowego układu nerwowego, np. w kuru typowe jest zajęcie paleocerebellum i jego połączeń (Beck, Daniel 1979). Zarówno w chorobach naturalnych, jak i eksperymentalnych właściwie wszystkie struktury mogą być zajęte, chociaż w różnym stopniu. Wydaje się, że zróżnicowanie topograficzne ubytków neuronalnych jest na tyle znaczne, iż wyróżnianie poszczególnych podtypów, np. w CJD (Kirschbaum 1968), jest nieuzasadnione.

Zmiany gąbczaste związane są obecnością wakuoli utworzonych w obrębie perikarionów lub wypustek neuronów i astrocytów (Fraser 1979a—c, Tateishi 1983). Charakterystyczne jest „pączkowanie” wakuoli. W obrazie mikroskopowo-elektronowym wakuole są zlokalizowane wewnątrzkomórkowo i zawsze otoczone błoną (Kim, Manuelidis 1983). Typowe jest tworzenie wakuoli wtórnych. Według Becka i wsp. (1982) wakuole powstają poprzez odsznurowywanie z błon wielowarstwowych (multilaminated membranes), utworzonych z pomnożenia warstwy typowej błony podstawowej. Doniesienie to jest krytykowane, ze względu na możliwy aretefaktyczny charakter zmian. Liczba wakuoli w zależności od ich lokalizacji w OUN stała się podstawą do opracowania systemu numerycznego, służącego do identyfikacji danego szczepu czynnika scrapie replikowanego poprzez dany genotyp gospodarza (Fraser 1979b). Tak zwany „przekrój uszkodzenia” jest stały dla dużego rozrzutu dawki infekcyjnej inokulum, jednak jego stabilność w trakcie narastania zmian nie jest całkowicie pewna (Masters i wsp. 1984).

Przerost i rozplem astrocytów występują we wszystkich encefalopatiach gąbczastych. W niektórych przypadkach naturalnej scrapie, przy nieobecności zmian gąbczastych, rozrost astrocytów w jądrach pnia mózgu jest traktowany jako zjawisko znamienne diagnostycznie (Hadlow i wsp. 1979).

Przerost i rozplem astrocytów, wraz z rozrostem mikrogleju, nosi nazwę gliocytozy lub stwardnienia (sclerosis) (Fraser 1979a, c). Tego typu zmiany występują głównie we wzgórzu oraz w pniu mózgu i w formacji hipokampa, stanowiąc skrajną formę reakcji gospodarza w stosunku do czynnika infekcyjnego (Liberski, Alwasiak 1983).

Płytki (plaki) amyloidowe występują we wszystkich encefalopatiach gąbczastych, aczkolwiek w różnym procencie przypadków. Stanowią one pomost neuropatologiczny w kierunku choroby Alzheimerera, pomimo kwestionowania doniesienia o przekazaniu choroby Alzheimerera na naczelne (Goudsmit i wsp. 1980). Trzy zasadnicze elementy strukturalne płytki stanowią dystroficzne (wyrodniające) neuryty, amyloid i komórki glejowe (Wiśniewski, Terry 1973). Płytką utworzoną wyłącznie z dystroficznych neurytów nosi nazwę plaki neurytycznej, natomiast płytkę z domieszką amyloidu nazwano płytką prymitywną. Centrum utworzone z przeplatających się włókienek amyloidu, otoczone obrzeżem wyrodnienia

jących neurytów stanowi tzw. płytkę amyloidową (gwiazdzistą), natomiast samo centrum amyloidowe określa się jako plakę wypaloną (burn out). Większość płytek w encefalopatiach gąbczastych stanowią płytki gwiazdziste, ale występują także inne postacie amyloidu (Bruce, Fraser 1975). Płytki amyloidowe w chorobie Alzheimera różnią się głównie obfitym odczynem glejowym, natomiast plaki w również przekazywalnym zespole Gerstmann-Strauslera mają wygląd pośredni (Masters i wsp. 1981). Ostatnio opisano także płytki amyloidowe w eksperymentalnej CJD u myszy (Tateishi i wsp. 1984).

Produkcja płytek jest pod częściową kontrolą genomu gospodarza, jest także zależna od szczepu czynnika infekcyjnego (izolatu). Liczba plak wzrasta wraz z wydłużeniem okresu inkubacji choroby. Plaki pojawiają się jako pierwsza zmiana neuropatologiczna, mniej więcej w połowie okresu inkubacji. Być może stanowią one obszar replikacji czynnika zakaźnego (Bolton i wsp. 1984).

Odkrycie w 1980 r. przez Merza i wsp. włókienek towarzyszących scrapie (scrapie associated fibrils — SAFs) otworzyło prawdopodobnie nowy rozdział w badaniach nad encefalopatiami gąbczastymi. SAFs występują w dwóch odmianach — utworzone z podjednostek ułożonych helikalnie, bądź występujących równolegle. Długość SAFs wynosi od 100 do 300 nm. Poza scrapie, SAFs występują także w naturalnej i eksperymentalnej CJD (Merz i wsp. 1983). Wykazano korelację pomiędzy liczbą SAFs i mianem infekcyjności w mózgu, lecz nie w śledzionie. Powiązanie SAFs z patogenezą scrapie, czy nawet samym czynnikiem scrapie nie jest dotychczas wyjaśnione (patrz niżej).

#### PATOGENEZA

Replikacja czynnika infekcyjnego scrapie odbywa się pod ścisłą kontrolą genomu gospodarza (Dickinson, Fraser 1979; Dickinson, Outram 1979). U owiec operuje gen SIP (od scrapie incubation period), u myszy Sinc (od shorter incubation period). Gen Sinc posiadający dwa allele Sinc<sup>s7</sup> (od shorter) i Sinc<sup>P7</sup> (od prolonged) prawdopodobnie kontroluje fazę „zero” okresu inkubacji (Kimberlin 1979). Allel Sinc<sup>s7</sup> jest odpowiedzialny za krótszy okres inkubacji grupy szczepów ME7 w homozygotach Sinc<sup>s7s7</sup>, natomiast dłuższy okres inkubacji charakteryzuje grupę szczepów 22A. W przypadku homozygot Sinc<sup>P7P7</sup> odnotowuje się zjawisko odwrotne (szczepy z grupy 22A wykazują krótszy okres inkubacji). Gen SIP u owiec jest prawdopodobnie powiązany z genem H-2 układu HLA.

Poza wymienionymi istnieją niezależne od układu Sinc efekty genetyczne, odpowiedzialne za różnice w długości inkubacji, sięgające do dwóch procent. Na szczególną uwagę zasługuje gen Dh. Heterozygoty (Dh/+) pozbawiony śledziony wykazują przedłużenie okresu inkubacji, ale tylko przy obwodowej drodze zakażenia.

Czynniki dziedziczne nie wywierają wpływu na kliniczną ekspresję kuru (Gajdusek 1977), natomiast szereg przypadków CJD to przypadki rodzinne (Asher i wsp. 1983); przy czym w niektórych rodzinach występują także inne choroby zwyrodnieniowe OUN, np. choroba Alzheimerera. Dziedziczenie jest autosomalne, dominujące, przy czym poprzez analogię do eksperymentalnej scrapie należy przypuszczać, iż dziedziczy się kompleks bliżej nieokreślonej „wrażliwości” na zakażenie (infectability). Należy podkreślić, że przypadki rodzinne są także przekazywalne.

Okres wylegania eksperymentalnej CJD (szczepu K. Fu) również pozostaje pod kontrolą genotypu gospodarza z efektem naddominacji. Wysłunięto hipotezę, iż gen nazywany PID (od prion incubation determinant) jest zlokalizowany w subregionie D (H-2) 17 chromosomu myszy. Allel d koduje dłuższy okres inkubacji, allel g krótszy, natomiast allele b, s, p, ki byłyby odpowiedzialne za okresy inkubacji o długości pośredniej.

Po wnikięciu czynnika infekcyjnego drogą obwodową (domózgowa droga podania, najczęściej stosowana w eksperymencie jest też najbardziej „nienaturalna”, ponieważ omija fazę pozanerwową) następuje jego namnażanie w węzłach chłonnych drenujących daną okolicę (Kimberlin 1979). Początkowo miano infekcyjności (tj. ilość dawek infekcyjnych w jednostce objętości czy masy mózgu) spada, co odzwierciedla prawdopodobnie degradację czynnika infekcyjnego z pierwotnego inokulum, po czym nie udaje się wykazać infekcyjności. Okres ten, noszący nazwę fazy „zero”, pozostaje pod kontrolą genu Sinc. Po zakończeniu fazy „zero” następuje powolny i osiągający plateau wzrost miana infekcyjności w śledzienie. Prawdopodobnie drogą nerwów trzewnych czynnik infekcyjny osiąga rdzeń kręgowy w środkowym odcinku piersiowym, szerząc się następnie ku górze, tj. domózgowo, i ku dołowi, tj. w kierunku lędźwiowych i krzyżowych segmentów rdzenia kręgowego. W obrębie OUN miano infekcyjności narasta stale, osiągając najwyższe wartości przed zgonem zwierzęcia. Należy podkreślić fakt krótkiej fazy „wiremii” zarówno w eksperymentalnej scrapie, jak i CJD. Droga rozprzestrzeniania się czynnika infekcyjnego w warunkach naturalnych nie jest znana.

W obrębie OUN czynnik infekcyjny szerzy się wzdłuż szlaków nerwowych, przy czym szybkość jego rozprzestrzeniania się, wynosząca od 0,5 do 1 mm na dobę, odpowiada szybkości wolnego przepływu aksonalnego. Podanie inokulum wybiórczo do gałki ocznej wywołuje pierwsze objawy zgąbczenia w homolateralnym nerwie wzrokowym, a następnie w heterolateralnym wzgórku górnym, homolateralnym wzgórku górnym i heterolateralnym nerwie wzrokowym.

Dla patogenezy przekazywalnej encefalopatii gąbczastej istotny jest stan dojrzałości układu immunologicznego, chociaż brak jest danych, który z jego podukładów jest włączony w proces zakażenia (Outram 1976; Fraser 1979; Kimberlin 1979). U osesków myszy, u których układ immunologiczny jest niedojrzały, okres inkubacji jest dłuższy niż u zwie-

rząt dorosłych. Stymulacja fitohemaglutyniną, polisacharydami bakteryjnymi lub ekstraktami BCG zwiększa podatność na zakażenie i skraca okres inkubacji eksperymentalnej scrapie. Efekt przeciwny, tj. wydłużenie okresu inkubacji z towarzyszącym wzrostem odporności, odnotowuje się po podaniu preparatów sterydowych i oleju arachidonowego. Wiadomo, że śledziona jest istotnym miejscem początkowej replikacji czynnika zakaźnego i u zwierząt pozbawionych śledziony w sposób naturalny, jak np. w przypadku heterozygot Dh/+ lub pozbawionych śledziony eksperymentalnie, obserwuje się przedłużony okres inkubacji. Wiadomo jednak, że u chomików syryjskich zakażanych szczepem 263K splenektomia nie wpływa na długość okresu inkubacji, z czego wynika, że opisane uprzednio zjawiska mogą nie być tak powszechne jak do niedawna uważano.

Szereg środków blokujących makrofagi układu siateczkowo-śródbłonkowego, np. dekstran 500, hamuje namnażanie czynnika infekcyjnego. Także szereg polianionów, takich jak: HPA 23, 57 i 39, czy heparyna powoduje spadek miana infekcyjności, prawdopodobnie na drodze sekwestracji czynnika. W podsumowaniu tej części pracy należy raz jeszcze podkreślić, że układ siateczkowo-śródbłonkowy stanowi pierwotny obszar replikacji czynnika infekcyjnego, a stan funkcjonalny tego układu bezpośrednio wpływa na następne etapy patogenetyczne.

#### STRUKTURA FIZYKOCHEMICZNA CZYNNIKA INFEKCYJNEGO

Struktura fizykochemiczna czynnika infekcyjnego scrapie nie została dotychczas poznana, nie udało się też wyosobnić go ani oczyścić do homogenności. Od połowy lat pięćdziesiątych wiadomo, że czynnik infekcyjny scrapie, a następnie czynniki kuru i CJD są niezwykle odporne na rutynowe techniki dekontaminacyjne, działanie formaliny i podwyższonej temperatury (Gajdusek 1977). Bardziej współczesne dane wskazują jednak, iż oporna subpopulacja stanowi jedynie niewielki odsetek, tj. około 0,05% całej populacji czynnika infekcyjnego (Rohwer 1984), natomiast pozostała jej część, tj. około 99,5%, wykazuje wrażliwość porównywalną z wrażliwością bardziej „konwencjonalnych” wirusów. Wydaje się zatem wątpliwe, czy na podstawie właściwości tak znikomej frakcji czynnika infekcyjnego można wyciągać daleko idące wnioski dotyczące jego struktury fizykochemicznej.

Zbliżone rozumowanie jest prawdopodobnie również uzasadnione przy analizie wyników badań radiacyjnych (Latarjet 1979), które interpretowane na podstawie tzw. „teorii tarczy” ustaliły rozmiar genomu czynnika scrapie na około 50—70 000 daltonów oraz porównywalne pod względem wielkości rozmiary genomów czynników infekcyjnych kuru i CJD. Z jednej strony czynnik scrapie wykazuje wybitną zdolność do agregacji, zarówno pomiędzy sobą, jak i do elementów subkomórkowych,

zwłaszcza błon komórkowych, co powinno zaniżyć wyniki otrzymane w badaniach radiacyjnych (Brown 1984; Rohwer 1984), z drugiej strony należy wziąć pod uwagę znaczny rozrzut odporności wirusów „konwencjonalnych” na radiację. Ponowna analiza cytowanych badań, opierających się na zmienionych założeniach, ustaliła rozmiar genomu czynnika infekcyjnego scrapie porównywalny z genomem wirusów polyoma (Brown 1984; Rohwer 1984).

Mały rozmiar genomu, określony na podstawie teorii tarczy, oraz nietypowe spektrum inaktywacji promieniowaniem jonizującym (tj. wzrost stopnia aktywności inaktywującej przy przechodzeniu w kierunku niższych długości fali), przy jednoczesnym braku wrażliwości na działanie dezoksynukleaz i rybonukleaz (Millson i wsp. 1976; Gajdusek 1977) skłaniało do przyjęcia nieortodoksyjnych hipotez opartych o założenie braku kwasu nukleinowego (DNA lub RNA) specyficznego dla czynnika infekcyjnego. Także nowsze dane, uzyskane na podstawie zastosowania „nick-translacji” o czułości detekcji do DNA wielkości 10 par zasad, okazały się negatywne (Manuelidis, Manuelidis 1981). Podobnie negatywne, w sensie detekcji kwasu nukleinowego, okazało się zastosowanie szeregu psoralenów o różnym stopniu hydrofobowości, które są zdolne do tworzenia fotoadduktów z kwasami nukleinowymi (Prusiner 1982). Interpretacja, w skrócie przytoczonych danych eksperymentalnych, może być w zasadzie dwojaka — albo czynnik infekcyjny scrapie rzeczywiście nie posiada kwasu nukleinowego, albo też kwas ten jest niedostępny dla dotychczas zastosowanych metod służących jego inaktywacji i pośrednio wykryciu.

W odróżnieniu od negatywnych wyników badań, zmierzających do wykrycia potencjalnego DNA czy RNA, dane dotyczące białka wydają się obiecujące (Prusiner 1982). Wiadomo, że czynnik scrapie jest wrażliwy na działanie szeregu proteinaz oraz denaturujących detergentów jonowych (Millson i wsp. 1976; Prusiner 1982) silnych jonów chaotropowych, jak jony cyjankowe czy guanidynowe, fenolu czy DEP (pirowęglan dietylowy), przy czym działanie tego ostatniego związku jest odwracalne pod wpływem hydroksyalaniny. Dane powyższe można interpretować, przyjmując założenie, iż wspólną tarczą wszystkich wymienionych metod inaktywujących jest białko.

Zastosowanie pomiaru poziomu infekcyjności przez analizę długości okresu inkubacji pozwoliło opracować wydajny schemat oczyszczania czynnika scrapie (Prusiner 1982; Prusiner i wsp. 1983). Składa się on z szeregu wirowań przy wzrastających przyspieszeniach, działaniu związków powierzchniowo czynnych, enzymów proteolitycznych i nukleolitycznych oraz w ostatniej fazie, elektroforezy na żelu poliakrylamidowym. Metoda ta pozwoliła na wydzielenie frakcji E<sub>6</sub>, zawierającej białko swoiste dla scrapie, które nazwano PrP (od prion protein) (Mc Kinley i wsp. 1983), o ciężarze cząsteczkowym około 36 000 daltonów i współ-



oczyszczane z infekcyjnością. Wydaje się, że istnieje ścisła korelacja pomiędzy poziomem PrP a obecnością SAFs (Mc Kinley i wsp. 1983; Merz i wsp. 1983). Warto zaznaczyć, że w nomenklaturze przyjętej przez grupę Prusiner SAFs noszą nazwę spłaszczonych pałeczek (flatten rods). Dane te sugerują, że SAFs są agregatem PrP, przy czym na jeden SAF przypadałoby 1000 cząsteczek PrP, zaś na jedną ID<sub>50</sub> (ID — dawka infekcyjna) przypadałoby około 10 do 100 SAFs lub 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> cząsteczek PrP (McKinley i wsp. 1983). Najnowsze dane wydają się wskazywać na istnienie bliżej nieokreślonej zależności pomiędzy SAFs a amyloidem tworzącym płytki, sugerującej, że agregujące SAFs tworzą płytki amyloidowe (Prusiner i wsp. 1983). Być może encefalopatie gąbczaste stanowią szczególną postać amyloidozy OUN.

Dalszych danych na temat zależności SAFs i PrP a czynnikiem infekcyjnym scrapie dostarczyły badania, które wykazały morfologiczną zmienność szczepową SAFs oraz PrP (zmienność liczby prążków otrzymanywanych po elektroforezie na żelach) w zależności od szczepu czynnika infekcyjnego. Wiadomo, że czynnik infekcyjny scrapie występuje w postaci szczepów izolatów wykazujących ustalony okres inkubacji w homozygotach mysich pod względem genu Sinc, stały „przekrój uszkodzenia”, określoną klasę stabilności oraz stopień produkcji amyloidu (Dickinson, Fraser 1979; Dickinson, Outram 1979). Istnienie stabilnych genetycznie szczepów czynnika scrapie oraz zdolność do interferencji pomiędzy tymi szczepami (Bruce, Dickinson 1979) skłoniły do wysunięcia hipotezy tzw. miejsc replikacyjnych (replicating site hypothesis) (Dickinson, Outram 1979). Hipoteza ta opiera się na założeniu, iż czynnik infekcyjny scrapie, posiadający samodzielny genom, jest replikowany na ograniczonej liczbie tzw. miejsc replikacyjnych, będących produktem lub pozostających dostatecznie blisko produktu genu Sinc. Do niedawna pojęcia „szczepu” czy „miejsca replikacyjnego” były pojęciami pozbawionymi ściśle określonego podłoża materialnego. Obecnie jednak wykazano, że SAFs pochodzący z różnych szczepów scrapie wykazują różną liczbę prążków uzyskanych w wyniku elektroforezy na żelach. Jest to pierwszy dowód istnienia heterogenności biologicznej czynnika scrapie (Merz i wsp. 1984).

Problem, czy czynnik infekcyjny scrapie (a także czynnik infekcyjny kuru i CJD) jest tylko białkiem, a więc prionem, ma znacznie szersze implikacje ogólnobiologiczne. Otwiera bowiem dyskusję nad mechanizmami powielania prionu, niemożliwymi w chwili obecnej do wyjaśnienia bez podważania centralnego dogmatu biologii molekularnej, tj. twierdzenia o przepływie informacji genetycznej od DNA (czy RNA plus w przypadku niektórych wirusów RNA) poprzez mRNA aż do białka (Kimberlin 1982). Nie istnieją żadne dane pozwalające na rozróżnienie pomiędzy hipotezami wysuniętymi przez Prusiner (1982), tj. odwrotnej translacji z białka prionu lub aktywacji preegzystujących w genomie gospodarza

sekwencji komplementarnych, do sekwencji mRNA, na którym odbywała się translacja prionu. Trudno jest także pogodzić hipotezę istnienia czynnika infekcyjnego w postaci prionu z danymi świadczącymi o względnie stabilnym, ale podlegającym mutacjom genomie czynnika. Nie wydaje się, żeby w chwili obecnej można było się spodziewać szybkiego rozwiązania tych podstawowych kwestii.

W podsumowaniu można stwierdzić, że opracowanie metod pozwalających uzyskiwać bardziej oczyszczone frakcje, zawierające czynnik scrapie, oraz wydzielenie SAFs może pozwolić na włączenie się w prace rutynowych laboratoriów biologii molekularnej oraz uzyskanie ostatecznej odpowiedzi na podstawowe pytanie, jaka jest istota czynnika infekcyjnego scrapie?

TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY.  
NATURAL DISEASES AND EXPERIMENTAL STUDIES

Summary

Present day state of investigations on pathomorphology and pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies is presented.

ПЕРЕДАВАЕМАЯ СПОНГИОТИЧЕСКАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ.  
НАТУРАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Резюме

Описаны современные достижения в исследованиях патоморфологии и патогенеза группы подострых спонгиозических энцефалопатий.

PISMIENICTWO

1. Asher D. M., Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Familial spongiform encephalopathies. W: Genetics of neurological and psychiatric disorders. Red.: S. S. Kety, L. P. Rowland, R. L. Sidman, S. W. Mathyse. Raven Press, New York, 1983, 273—290.
2. Beck E., Daniel P. M.: Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological lesions and their significance. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 1. Red.: S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 253—270.
3. Beck E., Daniel P. M., Davey A. J., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: The pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathy. An ultrastructural study. Brain, 1982, 105, 755—786.
4. Bolton D. C., McKinley M. P., Prusiner S. B.: Molecular characteristics of the major scrapie protein. Biochemistry, 1984, 23, 5898—5907.
5. Brown P.: Biological and chemotherapeutic forays into the field of unconventional viruses. W: Targets for the design of antiviral agents. Red.: R. T. Walker. Plenum Publ. Corp., 1984, 131—156.

5. Bruce M. E., Dickinson A. G.: Biological stability of different classes of scrapie agent. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 2. Red.: S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 71—86.
7. Bruce M. E., Fraser H.: Amyloid plaques in the brains of mice infected with scrapie: morphological variation and staining properties. *Neuropat. appl. Neurol.*, 1975, 1, 189—202.
8. Dickinson A. G.: Scrapie in sheep and goats. W: Slow virus diseases of animals and man. Red. R. Kimberlin. North Holland Publ. Comp., Amsterdam 1976, 210—241.
9. Dickinson A. G., Fraser H.: An assesment of the genetics of scrapie in sheep and mice. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 2. Red. S. B. Prusiner, W. B. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 367—385.
10. Dickinson A. G., Outram G. W.: The scrapie replication site hypothesis and its implication for pathogenesis. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Red. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 14—31.
11. Fraser H.: Neuropathology of scrapie: the precision of the lesions and their diversity. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 1. Red.: S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979 a, 387—406.
12. Fraser H.: Scrapie: a transmissible CNS disease. W: Progress in neurological research with particular reference to motor neuron disease. Red. P. O. Behan, F. C. Rose. Pitman Med., London, 1979b, 194—210.
13. Fraser H.: The pathogenesis and pathology of scrapie. W: Aspects of slow persistent and virus infections. Red. A. J. Tyrrell. Martinus Nijhoff, Hague, 1979c, 30—60.
14. Gajdusek D. C.: Unconventional viruses and origin and dissapearance of kuru. *Science*, 1977, 197, 943—960.
15. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M.: Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, 1966, 209, 794—796.
16. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews W. B.: Creutzfeld-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science*, 1968, 161, 383—389.
17. Goudsmit J., Morrow C. H., Gajdusek D. C., Asher D. M., Yanagihara R. T., Masters C. L., Gibbs C. J.: Evidence for and against the transmissibility of Alzheimer disease. *Neurology*, 1980, 30, 945—950.
18. Hadlow W. J., Race R. E., Kennedy R. C., Elund C. M.: Natural infection of sheep with scrapie virus. W: Slow transmissible diseeseases of the nervous system. Vol. 2. Red. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 3—12.
19. Kelly D. F., Pearson H., Wright A. I., Greenham L. W.: Morbidity in captive white tigers. W: The comparative pathology of zoo animals. (Symposia of the National Zoological Park). Red. R. J. Montali, G. Mikaki, Smithsonian Institution Press, Washington, 1980, 183—188.
20. Kim J. H., Manuclidis E. E.: Ultrastructural findings in experimental Creutzfeld-Jakob disease in Guinea pigs. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1983, 42, 29—43.
21. Kimberlin R. H.: The biology of scrapie agent. W: The aspects of slow transmissible virus infection. Red. D. A. Tyrrell. Martinus Nijhoff, Hague, 1979, 2—29.
22. Kimberlin R. H.: Scrapie agent: prions or virinos? *Nature*, 1982, 297, 107—108.

23. Kirschbaum W.: Jakob-Creutzfeldt disease. Am. Elsevier Publ. Comp., New York, 1968.
24. Latarjet R.: Inactivation of the agents of scrapie, Creutzfeldt-Jakob disease, and kuru by radiations. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 2. Red. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 387—407.
25. Liberski P. P., Alwasiak J.: Neuropathology of experimental transmissible spongiform encephalopathy (263K strain of scrapie in golden syrian hamsters). I. Standard pathology and development of lesions. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 377—393.
26. Manuelidis L., Manuelidis E. E.: Search for specific DNAs Creutzfeldt-Jakob infectious brain fractions using "nick translations". *Virology*, 1981, 109, 435—443.
27. Marsh R. F., Hanson R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. W: Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 1. Red. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York, 1979, 451—461.
28. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*, 1981, 104, 559—588.
29. Masters C. L., Rohwer R., Franko M. C., Brown P., Gajdusek D. C.: The sequential development of spongiform changes and gliosis of scrapie in golden syrian hamsters. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1984, 43, 242—252.
30. McKinley M. P., Bolton D. C., Prusiner S. B.: A protease-resistant protein is a structural component of scrapie prion. *Cell*, 1983, 35, 57—62.
31. Merz P. A., Kascok R., Rubinstein R., Carp R. I., Wiśniewski H. M.: Variations in SAF from different scrapie sources. W: Proc. workshop on slow transmissible diseases. Red. J. Tateishi. Takenhashi-Kaikau. August 31th, 1984. Res. comm. on slow virus infection. The Jap. Min. of Health and Welfare, 137—147.
32. Merz P. A., Sommerville R. A., Wiśniewski H. M., Iqbal K.: Abnormal fibrils from scrapie infected brains. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1981, 54, 63—74.
33. Merz P. A., Sommerville R. A., Wiśniewski H. M., Manuelidis L., Manuelidis E. E.: Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 1983, 306, 474—476.
34. Millson G. C., Hunter G. D., Kimberlin R. H.: The physico-chemical nature of scrapie agent. W: Slow virus diseases of animals and man. Red. R. H. Kimberlin. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1976, 244—266.
35. Outram G. W.: Pathogenesis of scrapie in mice. W: Slow virus diseases of animals and man. R. H. Kimberlin. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam, 1976, 325—357.
36. Prusiner S. B.: Novel protainaceous infectious particle cause scrapie. *Science*, 1982, 136—144.
37. Prusiner S. B., McKinley M. P., Bowman K. A., Bolton D. C., Groth D. F., Glenner G. G.: Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 1983, 349—358.
38. Rohwer R.: Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation. *Nature*, 1984, 308, 658—661.
39. Tateishi J., Sato Y., Ohta M.: Creutzfeldt-Jakob disease in humans and laboratory animals. W: Progress in neuropathology. Vol. 5. Red. H. M. Zimmerman. Raven Press, New York, 1983, 195—221.

40. Tateishi J., Nagara H., Hikita H., Sato Y.: Amyloid plaques in the brains of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, 1984, 15, 278—280.
41. Williams E. S., Young S., Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wild Animals*, 1980, 16, 89—98.
42. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Reexamination of the pathogenesis of the senile plaques. W: *Progress of Neuropathology*. Vol. 2. Red. H. M. Zimmerman. Grune Stratton Inc., New York, 1973, 1—26.

Adres autora: Klinika Neurologii AM., Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź.

## DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

25 czerwca 1986 r. w Poznańskiej Akademii Medycznej im. K. Marcinkowskiego odbyło się uroczyste otwarcie sali wykładowej i nadanie jej imienia Mirosława B. Kozika.

Sala ta mieści się w budynku wzniesionym staraniem przedwcześnie zmarłego Profesora, twórcy nowoczesnego ośrodka neuropatologii klinicznej i doświadczalnej, wybitnego badacza, organizatora i nauczyciela akademickiego. Tablicę pamiątkową odsłoniła małżonka Profesora — dr med. Monika Znamierowska-Kozikowa. Sala wykładowa im. M. B. Kozika wyposażona w nowoczesny sprzęt audio-wizualny będzie służyła licznym rzeszom młodzieży studiującej.

Inicjatywę upamiętnienia Jego imienia podjęła doc. dr hab. med. Bożena Galas-Zgorzalewicz, która w części budynku przeznaczonej na cele kliniczne prowadzi Klinikę Neurologii Rozwojowej.

\*

4 września 1985 r. przy okazji XIII Światowego Kongresu Neurologów w Hamburgu został dokonany wybór władz Światowej Federacji Neurologii w następującym składzie:

przewodniczący — R. L. Masland,  
pierwszy zastępca przewodniczącego — Sir J. Walton,  
sekretarz i skarbnik generalny — J. F. Toole,  
zastępca sekretarza i skarbnika generalnego — A. Lowenthal,  
zastępcy przewodniczącego:

I. Hausmanowa-Petrusewicz,  
E. Herskovits,  
J. M. Martinez-Lage,  
H. Narabayashi.

A. Lowenthal został ponadto sekretarzem Komitetu Naukowego. Delegatem Polski w Radzie ŚFN została prof. Irena Hausmanowa-Petrusewicz.

Ustalono że następny, XIV Światowy Kongres Neurologii odbędzie się w Delhi (Indie) w okresie od 22 do 27 października 1989 r.

\*

Na podstawie decyzji Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z 30 maja 1986 r. Instytut Psychoneurologiczny został przemianowany na Instytut Psychiatrii i Neurologii.

*Jerzy Dymecki*

ANNA TARASZEWSKA, IRMINA B. ZELMAN

## MORFOMETRYCZNA OCENA PROCESU MIELINIZACJI W MÓZGU KRÓLIKA pt. II. SPOIDŁO WIELKIE.

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki

U królika pt z hipomielinizacją ośrodkowego układu nerwowego kolejność mielinizowania się poszczególnych struktur istoty białej jest taka sama jak u normalnych królików, ale rozwój osłonek mielinowych jest opóźniony i osłabiony (Taraszewska, Zelman 1981). Różnice w obrazie mieliny między królikami pt i zdrowymi zmniejszają się wraz z wiekiem, ale nie ulegają pełnemu wyrównaniu. Nasilenie zmian jest zróżnicowane w poszczególnych strukturach istoty białej, a także u poszczególnych królików pt w zależności od ciężkości przebiegu klinicznego (Zelman, Taraszewska 1984).

Badania morfometryczne przeprowadzone na nerwie wzrokowym w okresie tworzenia osłonek mielinowych wykazały, że zaburzenia mielinizacji u mutantu pt wiążą się z wielkością włókien, a zmniejszenie liczby zmielinizowanych włókien dotyczy przede wszystkim aksonów o średnicy poniżej 1  $\mu\text{m}$ . Aksony te mielinizują się później niż włókna większego kalibru, które już u 14- i 28-dniowych królików pt są prawie całkowicie zmielinizowane, podobnie jak u królików zdrowych (Taraszewska, Zelman 1985).

W niniejszej pracy przedstawiono badania morfometryczne spoidła wielkiego, w którym mielinizacja odbywa się znacznie później niż w nerwie wzrokowym. U królika spoidło wielkie zaczyna mielinizować się pod koniec drugiej dekady pierwszego miesiąca życia (Dąbska, Danielewicz-Kotowicz 1978) i u zwierząt w wieku 2 miesięcy proces ten nie jest jeszcze zakończony. Celem podjętych badań była ilościowa ocena zmian w mielinizacji spoidła wielkiego w zależności od wielkości aksonów, z uwzględnieniem okresu premielinizacyjnego i wczesnej oraz zaawansowanej mielinizacji, a także zmian utrzymujących się po zakończeniu mielinogenezy u mutantu pt.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiło 8 królików pt z typowymi objawami klinicznymi oraz 7 królików zdrowych spoza stada pt. Badania przeprowadzono w 14, 28 i 90 dniu życia oraz u dorosłych królików. Króliki pt i kontrolne zdrowe były hodowane w takich samych warunkach. Do badań pobierano wycinki z przedniego odcinka spoidła wielkiego przeciętego w linii pośredkowej. Materiał utrwalano i przygotowywano do badań w mikroskopie elektronowym w taki sam sposób, jak uprzednio do badania nerwu wzrokowego (Taraszewska, Zelman 1985). Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 100B. Do obliczeń przygotowywano z każdego przypadku 10 elektronogramów w pow. 18 000  $\times$ , na których liczone włókna zmielinizowane i niezmielinizowane oraz określano ich wielkości według średnicy aksonu, i 12 elektronogramów w pow. 40 000  $\times$ , na których liczone blaszki mielinowe w osłonkach włókien zmielinizowanych, określając również wielkość tych włókien. Dla określenia wielkości włókien posługiwano się przezroczystą kliszą z naniesionymi profilami aksonów o średnicy 0,3, 0,5, 0,7, i 1,0  $\mu\text{m}$ , klasyfikując wszystkie liczone włókna do odpowiedniego przedziału wielkości. Odsetki obliczano oddzielnie dla każdej grupy włókien od liczb uzyskanych z całego materiału w danym wieku. Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy użyciu testu „u” (Sawicki 1974), porównując odsetki włókien tej samej wielkości u królików pt i u kontrolnych w tym samym wieku.

## WYNIKI

Większość włókien w spoidle wielkim królików 14- i 28-dniowych stanowią drobne aksony o średnicy do 0,3  $\mu\text{m}$  i od 0,3 do 0,5  $\mu\text{m}$  (tab. 1). U królików w wieku 14 dni nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic między odsetkami włókien w poszczególnych grupach ich wielkości pomiędzy materiałem pt i kontrolnym. Natomiast u królików pt w wieku 28 i 90 dni oraz u dorosłych wykazano znacznie wyższe niż w kontroli odsetki włókien najdrobniejszych o średnicy do 0,3  $\mu\text{m}$ . Równocześnie u królików pt w wieku 28 i 90 dni obserwuje się obniżenie odsetków włókien większych o średnicy od 0,3  $\mu\text{m}$  do 0,5  $\mu\text{m}$  i od 0,5  $\mu\text{m}$  do 0,7  $\mu\text{m}$ , a w wieku 90 dni również od 0,7—1,0  $\mu\text{m}$ , w porównaniu z materiałem kontrolnym. Postępujący wraz z wiekiem wzrost odsetków włókien większych o średnicy powyżej 0,5  $\mu\text{m}$  i zmniejszanie się odsetka włókien najdrobniejszych o średnicy do 0,3  $\mu\text{m}$  jest wyraźnie widoczne u królików kontrolnych tylko pomiędzy 28 i 90 dniem życia, podczas gdy u królików pt występuje również po 90 dniu życia i różnice odsetków tych włókien są widoczne w wieku dorosłym.

Aksony spoidła wielkiego u 14-dniowych królików obu grup są niezmielinizowane, z wyjątkiem pojedynczych włókien o średnicy powyżej



Tabela 1. Rozkład odsetkowy włókien według średnicy aksonów w spoidle wielkim królików pt i w kontroli  
 Table 1. Percentage distribution of fibres according to axon diameters in corpus callosum of pt and control rabbits

Królik Rabbit	Wiek Age	Liczba zwierząt No. of animals	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)					Liczba liczonych włókien Number of counted fibres
			≤ 0,3	> 0,3–0,5	> 0,5–0,7	> 0,7–1,0	> 1,0	
pt	14 dni days	1	54,2	39,3	6,1	0,3	0,1	1165
	28 dni days	2	73,2*	22,6*	2,5*	1,0	0,6	9765
	90 dni days	2	42,8*	33,3*	11,3*	8,8*	3,8	4434
	dorośle adults	3	23,5*	28,9	24,9	14,8	7,9	3689
kontrola control	14 dni days	1	49,6	44,8	7,8	0,5	0,2	998
	28 dni days	2	59,3	29,3	5,6	3,7	2,1	7425
	90 dni days	2	10,1	42,5	22,3	17,1	8,0	2982
	dorośle adults	2	14,8	28,2	29,3	17,2	10,5	2062

\* Statystycznie istotna różnica w porównaniu z kontrolą w teście „u” ( $\alpha = 0,05$ )

\* Significant difference in comparison with control according to „u” test ( $\alpha = 0,05$ )

Tabela 2. Odsetki zmielinizowanych włókien w spoidle wielkim królika pt i w kontroli  
 Table 2. Percentage of myelinated axons in corpus callosum of pt and control rabbits

Królik Rabbit	Wiek Age	Liczba zwierząt No. of animals	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)					Odsetek włókien Percent of fibres	
			≤ 0,3	> 0,3–0,5	> 0,5–0,7	> 0,7–1,0	> 1,0	zmielinizo- wanych myelinated	niezmielini- zowanych unmyelina- ted
pt	14 dni days	1	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,09	99,91
	28 dni days	2	0,1	3,7*	42,1*	76,5*	100,0	3,3*	96,7
	90 dni days	2	0,5*	22,7*	67,4*	88,5*	98,2	27,0*	73,0*
	dorośle adults	3	18,2*	75,0*	95,2*	100,0	100,0	74,4*	27,6*
kontrola control	14 dni days	1	0,0	0,0	1,3	12,5	50,0	0,3	99,7
	28 dni days	2	0,0	9,2	60,3	93,4	100,0	11,6	88,4
	90 dni days	2	48,5	95,3	99,5	100,0	100,0	92,7	7,3
	dorośle adults	2	55,2	91,6	98,3	100,0	100,0	90,5	9,5

\* Statystycznie istotna różnica w porównaniu z kontrolą w teście „u” ( $\alpha = 0,05$ )

\* Significant difference in comparison with control according to “u” test ( $\alpha = 0,05$ )

Tabela 3. Średnia liczba blaszek mielinowych w osłonkach włókien zmielinizowanych w spoidle wielkim królika pt i w kontroli  
 Table 3. Average number of myelin lamellae per sheath in the myelinated axons in corpus callosum of pt and control rabbits

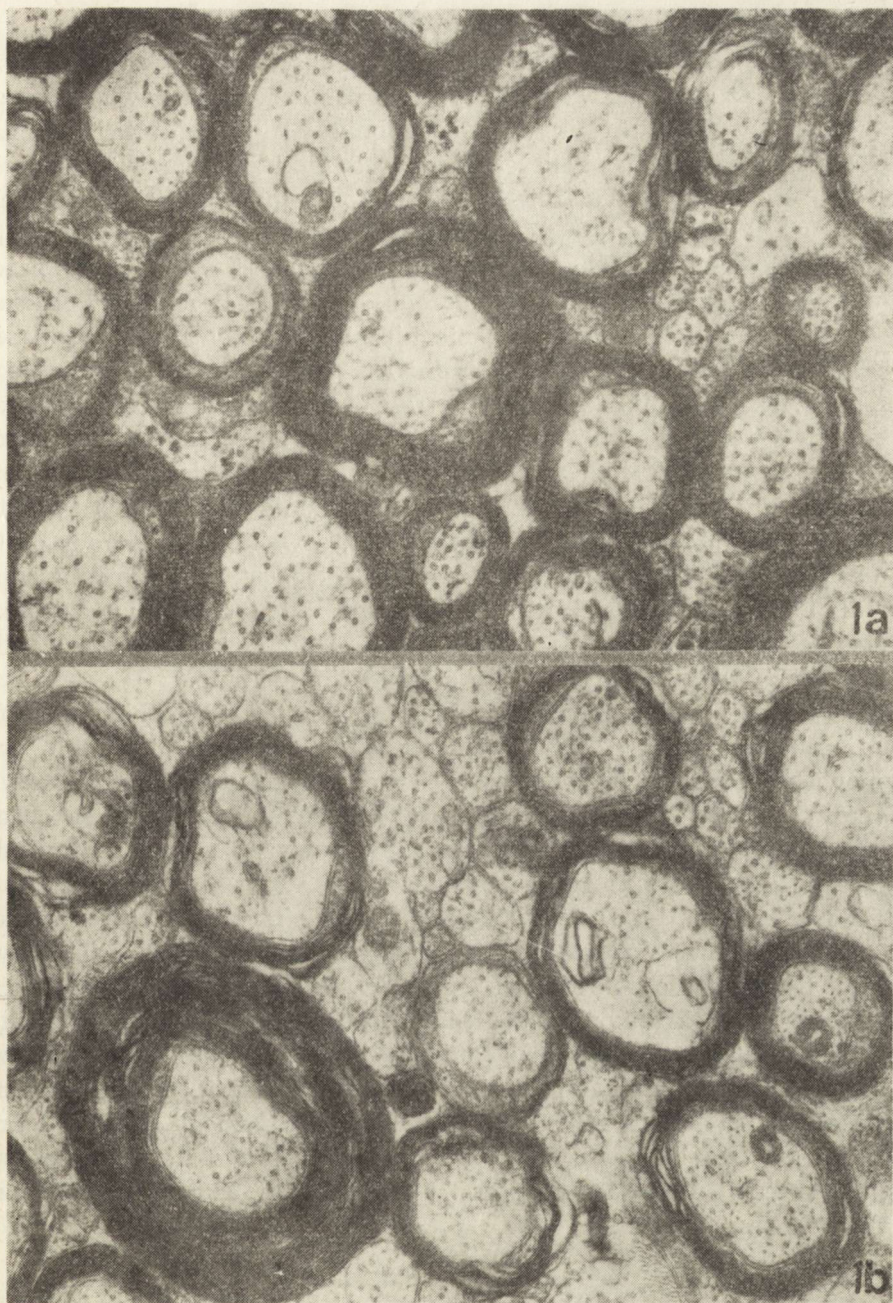
Królik Rabbit	Wiek Age	Liczba zwierząt No. of animals	Średnica aksonów ( $\mu\text{m}$ ) Axon diameter ( $\mu\text{m}$ )					Liczba badanych włókien Number of fibres examined
			$\leq 0,3$	$> 0,3-0,5$	$> 0,5-0,7$	$> 0,7-1,0$	$> 1,0$	
pt	28 dni days	2	5,0	5,1	5,8	6,5	6,5	135
	90 dni days	2	—	4,2	4,5	5,1	6,5	167
	dorośle adults	3	6,3	6,5	7,6	9,1	10,2	716
kontrola control	28 dni days	2	—	6,0	6,6	7,5	7,3	267
	90 dni days	2	6,5	6,3	6,7	7,8	9,7	322
	dorośle adults	2	6,0	6,8	7,6	9,2	12,6	493

Tabela 4. Odsetki zmielinizowanych włókien z bardzo cienkimi osłonkami (< 5 blaszek) w spoidle wielkim królika pt i w kontroli  
 Table 4. Percentage of myelinated fibres with extremely thin myelin sheaths (< 5 lamellae) in corpus callosum of pt and control rabbits

Królik Rabbit	Wiek Age	Liczba zwierząt No. of animals	Średnica aksonów (μm) Axon diameter (μm)					Odsetek włókien z liczbą blaszek Percent of fibres with number of myelin lamellae	
			≤ 0,3	> 0,3–0,5	> 0,5–0,7	> 0,7–1,0	> 1,0	< 5	≥ 5
pt	28 dni days	2	50,0	48,0*	39,5*	16,2	26,9*	32,6*	67,4*
	90 dni days	2	—	66,7*	60,0*	37,7*	28,6*	38,9*	61,1*
	dorośle adults	3	26,7*	15,4*	7,1*	3,5*	9,1*	10,1*	89,9*
kontrola control	28 dni days	2	—	11,1	13,5	8,0	5,9	9,7	90,3
	90 dni days	2	12,5	19,0	4,6	0,9	0,0	4,0	96,0
	dorośle adults	2	7,3	8,0	1,4	0,0	0,0	2,8	97,2

\* Statystycznie istotna różnica w porównaniu z kontrolą w teście „u” ( $\alpha = 0,05$ )

\* Significant difference in comparison with control according to “u” test ( $\alpha = 0.05$ )



*Ryc. 1a.* Dorosły królik kontrolny w wieku 3 lat. Zmielinizowane włókna różnego kalibru i nieliczne drobne aksony niezmielinizowane. Osłonki mielinowe regularnej grubości. Pow. 33350  $\times$

*Fig. 1a.* Adult control rabbit aged 3 years. Myelinated fibres of various caliber and a few unmyelinated small axons. Regular thickness of the myelin sheaths.  $\times$  33350

*Ryc. 1b.* Dorosły królik pt w wieku 3 lat. Grubość osłonek mielinowych zróżnicowana we włóknach tego samego kalibru. Widoczne włókno z nieprawidłowo grubą osłonką mielinową i liczne niezmielinizowane aksony. Pow. 33350  $\times$

*Fig. 1b.* Adult pt rabbit aged 3 years. Various thickness of the myelin sheaths in fibres of the same caliber. Among nerve fibres one with abnormally thick myelin sheath. Numerous axons are unmyelinated.  $\times$  33350

0,5  $\mu\text{m}$  (tab. 2). W 28 dniu życia mielinizacja aksonów o średnicy powyżej 0,5  $\mu\text{m}$  jest już zaawansowana, w tym wszystkie włókna powyżej 1,0  $\mu\text{m}$  są zmielinizowane u królików pt, podobnie jak w kontroli, natomiast w pozostałych grupach wielkości aksonów odsetki zmielinizowanych włókien u królików pt są znacznie niższe. U kontrolnych królików w wieku 90 dni wysokości odsetków zmielinizowanych włókien są podobne jak u dorosłych. Dane te wskazują, że u 3-miesięcznych królików mielinizacja spoidła wielkiego jest prawie zakończona, ale około 45% drobnych aksonów o średnicy do 0,3  $\mu\text{m}$  pozostaje niezmielinizowanych w wieku dorosłym. U królików pt w wieku 90 dni i u dorosłych odsetki zmielinizowanych włókien są niższe niż w kontroli, z wyjątkiem włókien powyżej 1,0  $\mu\text{m}$  (u dorosłych również od 0,7—1,0  $\mu\text{m}$ ), przy czym największe różnice dotyczą grup aksonów o średnicy  $\leq 0,3$  i od 0,3 do 0,5  $\mu\text{m}$ . W materiale 90-dniowych królików pt odsetek zmielinizowanych włókien o średnicy  $\leq 0,3$   $\mu\text{m}$  wynosi zaledwie 0,5%, a włókien o średnicy od 0,3 do 0,5  $\mu\text{m}$  — 22,7%, podczas gdy w kontroli odsetki te wynoszą odpowiednio 48,5 i 95,3%. Ogólne odsetki włókien zmielinizowanych są niższe, a niezmielinizowanych wyższe u królików pt niż w kontroli we wszystkich grupach wieku i różnice te są statystycznie istotne.

Średnie liczby blaszek mielinowych dla włókien wszystkich kalibrów są niższe u królików pt niż u kontrolnych w wieku 28 i 90 dni, przy czym większe różnice są widoczne w 90 dniu życia (tab. 3). U dorosłych królików pt i kontrolnych średnie liczby blaszek mielinowych są podobne, z wyjątkiem grupy włókien o średnicy powyżej 1,0  $\mu\text{m}$  z nieco niższą średnią liczbą blaszek w materiale pt.

Oślonki mielinowe, w których liczba blaszek mielinowych jest mniejsza niż 5, występują częściej w materiale królików pt niż w kontrolnym (tab. 4). Najwyższe odsetki włókien z tak cienkimi osłonkami stwierdzono u 3-miesięcznych królików pt. Również u dorosłych królików pt włókien tych jest znacznie więcej niż w kontroli, mimo że średnie liczby blaszek mielinowych są podobne. Rozbieżność ta wynika z dużego zróżnicowania grubości osłonek mielinowych we włóknach tego samego kalibru u królików pt (ryc. 1a-1b), co powoduje, że pojedyncze włókna z bardzo grubymi osłonkami wpływają na podwyższenie średniej liczby blaszek mielinowych u mutanta.

#### OMÓWIENIE

Wielkość aksonów odgrywa istotną rolę w procesie mielinizacji, zarówno w ośrodkowym, jak i w obwodowym układzie nerwowym (Matthews 1968; Friede 1972; Remahl, Hildebrand 1962). W badaniach na różnych gatunkach zwierząt wykazano, że duże aksony mielinizują się najwcześniej, po czym następuje okres intensywnej mielinizacji aksonów o coraz mniejszych średnicach aż do tzw. krytycznej wielkości, którą

aksony muszą osiągnąć przed zapoczątkowaniem ich mielinizacji. Według Waxmana i Swadlowa (1976) oraz Wigginsa i wsp. (1985) najmniejsza średnica zmielinizowanych aksonów w spoidle wielkim wynosi około  $0,3 \mu\text{m}$  i dane te są zgodne z naszymi obserwacjami.

Z badań przeprowadzonych na spoidle wielkim wynika, że u mutantu pt kolejność mielinizowania się aksonów w zależności od ich wielkości jest zachowana. Wczesne stadium mielinizacji dużych aksonów jest najmniej zaburzone, natomiast największe zmiany występują w przebiegu mielinizacji drobnych aksonów o średnicy poniżej  $0,5 \mu\text{m}$ . W porównaniu z poprzednio badanym nerwem wzrokowym (Taraszewska, Zelman 1985), zaburzenia mielinizacji w spoidle wielkim są bardziej nasilone, co łączy się z różnicą wielkości włókien w obydwu strukturach. W spoidle wielkim występuje więcej włókien małego kalibru i normalnie pewna ilość drobnych aksonów pozostaje niezmielinizowana.

U kota odsetek niezmielinizowanych aksonów w części przedniej spoidła wielkiego wynosi około 15–20% (Remahl, Hildebrand 1982). W płacie spoidła wielkiego u królika niezmielinizowane aksony stanowią około 45% wszystkich włókien, a ich średnica waha się od  $0,08$  do  $0,6 \mu\text{m}$ , podczas gdy średnica włókien zmielinizowanych wynosi od  $0,3$  do  $1,85 \mu\text{m}$  (Waxman, Swadlow 1976). W naszym materiale u dorosłych królików kontrolnych aksony o średnicy  $\leq 0,3 \mu\text{m}$  stanowią około 15% wszystkich włókien i prawie połowa ich jest niezmielinizowana. Znacznie wyższe odsetki aksonów o średnicy  $\leq 0,3 \mu\text{m}$  występują natomiast u królików pt, u których równocześnie odsetki włókien większych są obniżone w porównaniu z kontrolą we wszystkich grupach wieku, z wyjątkiem królików 14-dniowych.

Wyniki te wskazują na opóźnienie i zahamowanie wzrostu aksonów w spoidle wielkim u mutantu pt. Zaburzenia we wzroście aksonów występują równolegle z zaburzeniami mielinizacji, natomiast nie są widoczne w okresie premielinizacyjnym. Mielinizacja małych aksonów przebiega u mutantu pt z wybitnym opóźnieniem. Największe różnice w odsetkach zmielinizowanych aksonów między królikami pt i kontrolnymi obserwuje się w wieku 90 dni i dorosłym w grupie aksonów o średnicy poniżej  $0,5 \mu\text{m}$ . U dorosłych królików pt występuje znamienne mniej włókien zmielinizowanych w porównaniu z kontrolą. Wyniki te świadczą o zahamowaniu procesu mielinizacji, szczególnie drobnych włókien w spoidle wielkim u mutantu pt.

U innych mutantów z hipomielinizacją ośrodkowego układu nerwowego niektóre obserwacje wskazują na podobne zróżnicowanie nasilenia zmian w zależności od struktury. U myszy Quaking badanych w wieku dorosłym stwierdzono znacznie mniejszy stopień mielinizacji w spoidle przednim i w spoidle wielkim niż w nerwie wzrokowym i rdzeniu kręgowym (Friedrich 1974). U myszy Jimpy obserwowano opóźnienie wzrostu aksonów i gorszą mielinizację małych aksonów w nerwie wzrokowym

(Webster i wsp. 1976) oraz w spoidle wielkim (Robain, Mandel 1974). Wymienieni autorzy zwracają również uwagę na większe nasilenie zmian w później mielinizującym się spoidle wielkim niż w rdzeniu.

Stwierdzona w naszych badaniach zależność pomiędzy zaburzeniami mielinizacji a wielkością aksonów przemawia za udziałem aksonów w patomechanizmie tych zaburzeń u mutantu pt. Wielu autorów jest zgodnych co do tego, że same wymiary aksonu nie są decydującym czynnikiem dla zapoczątkowania procesu tworzenia osłonki mielinowej (Friede 1972; Rehmal, Hildebrand 1982), ale inne czynniki wiążące się ze stanem dojrzałości aksonu i strukturalnymi i chemicznymi właściwościami błony aksonalnej stanowią właściwy sygnał do rozpoczęcia mielinizacji dla komórek oligodendrogleju. Wcześniejsze badania w mikroskopie świetlnym wskazują, że u mutantu pt występują nieswoiste zmiany w neuronach ośrodkowego układu nerwowego, polegające m.in. na zmniejszeniu ilości tigroidu w cytoplazmie komórek nerwowych we wczesnym okresie rozwoju (Taraszewska, Osetowska 1975; Taraszewska, Zelman 1981). Uwzględniając wyniki dotychczasowych badań można przypuszczać, że hipomielinizacja u królików pt jest nie tylko wynikiem niewydolności komórek oligodendrogleju i niedostatecznego wytwarzania przez nie mieliny (Taraszewska 1983), ale wiąże się prawdopodobnie ze zmianami dotyczącymi również aksonów.

Przeprowadzone badania morfometryczne wykazały, że ilość tworzonej mieliny jest u mutantu pt zmniejszona. Wynika to zarówno ze zmniejszenia ogólnej ilości zmielinizowanych włókien, jak i ze zmniejszenia grubości osłonek mielinowych i niewątpliwie świadczy o nieprawidłowej czynności komórek oligodendrogleju. W spoidle wielkim królika pt około 40% osłonek w okresie trwania mielinizacji i około 10% po jej zakończeniu (u dorosłych mutantów) zawiera zaledwie 2—4 blaszki mielinowe. We włóknach z tak cienkimi osłonkami występuje zaburzenie prawidłowej relacji pomiędzy grubością osłonki mielinowej a wielkością aksonu (Hildebrand, Hahn 1978), które może wiązać się z istnieniem nieprawidłowości w samym aksonie jako czynniku kontrolującym grubość osłonki mielinowej. Wyniki dotychczasowych badań nie pozwalają na rozstrzygnięcie, w jakim stopniu za hipomielinizację u mutantu pt jest odpowiedzialne upośledzenie funkcji komórek oligodendrogleju w tworzeniu osłonek mielinowych, a w jakim stopniu zaburzenia ze strony samych aksonów w kontrolowaniu procesu mielinogenezy.

## MORPHOMETRIC STUDIES ON MYELIN DEVELOPMENT IN PT RABBITS II. CORPUS CALLOSUM

### Summary

The studies were performed on the anterior part of the corpus callosum in developing (14-, 28-, and 90-day-old) and adult pt as well as control rabbits. Distribution of fibres according to the axons' diameters, numbers of myelinated



fibres, average numbers of myelin lamellae and numbers of fibres with myelin sheaths containing less than 5 lamellae were counted on electron micrographs.

It was found that in the premyelination stage (14-day-old rabbits) distribution of axons according to the diameter is similar in the corpus callosum of pt and control rabbits. In the myelination period significantly higher percentages of axons with the diameter of  $\leq 0.3 \mu\text{m}$  and slower increase of larger size axons were found in pt rabbit indicating the disturbed axonal growth. Sequence of myelination depending on the axons' size is similar in both animals groups. In pt rabbits progress of myelination is markedly slowed, its duration prolonged and percentages of myelinated fibres are significantly decreased. These abnormalities concern mostly of axons with the diameter less than  $0.5 \mu\text{m}$ , which become myelinating at latest stage. Decreased percentages of myelinated axons in adult pt rabbits indicate an arrest of myelination of small axons, whereas the numbers of myelinated larger axons do not show essential differences between pt and control rabbits. But in pt rabbits, in all groups of axons sizes numbers of fibres with very thin myelin sheaths (2—4 lamellae) were markedly increased.

The obtained results indicate the relationship between disturbed myelin development and the axons size in pt rabbit and the possible participation of axon in the pathomechanism of these disturbances.

## МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОЦЕССА МИЕЛИНИЗАЦИИ В МОЗГУ КРОЛИКА „пт” II. МОЗОЛИСТОЕ ТЕЛО

### Резюме

Электронномикроскопически исследовалась передняя часть мозолистого тела у кроликов „пт” и контрольных в возрасте 14, 28 и 90 дней, а также у взрослых кроликов. У кроликов „пт” и контрольных в том же возрасте сравнивался процентный спектр диаметра волокон и процент миелинизированных волокон, среднее количество миелиновых бляшек и процентный состав волокон с тонкими миелиновыми оболочками (образованными менее чем 5 бляшками). В премиелинизационном периоде у кроликов в возрасте 14 дней нет разницы в величине аксонов мозолистого тела кроликов „пт” и контрольных. В миелинизационном периоде и после его окончания у кроликов „пт” наблюдался значительно высший процент мелких аксонов с диаметром  $< 0,5 \text{ м}$  и меньшее увеличение процента более крупных волокон по сравнению с контрольным материалом. Эти изменения свидетельствуют о нарушении возрастания аксонов у кроликов „пт”. Последовательность миелинизации аксонов в зависимости от их диаметра похожая у мутанта „пт” и в контрольных случаях, но прогресс миелинизации замедленный, её течение продленное, а процент миелинизированных аксонов значительно низший у кроликов „пт”, чем у контрольных кроликов.

Самая большая интенсивность этих изменений найдена в группе мелких аксонов с диаметром  $\leq 0,5 \text{ м}$ , которые миелинизируются позже всего. У взрослых мутантов „пт” удерживалось значительное понижение процента миелинизированных волокон с диаметром  $< 0,5 \text{ м}$ , свидетельствующие о замедлении миелинизации мелких аксонов. Наоборот, количество миелинизированных крупных аксонов у взрослых кроликов „пт” почти правильное. Вместо того, во всех группах величины аксонов у мутанта „пт” наблюдается значительно больше волокон с очень тонкими оболочками (2—4 миелиновые бляшки). Полученные результаты свидетельствуют о зависимости расстройства миелинизации и величины диаметра аксонов и, возможно, роли аксонов в патомеханизме этих нарушений у мутанта „пт”.

### PIŚMIENICTWO

1. Dąbbska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelination of some structures of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 203—209.
2. Friede R. L.: Control of myelin formation by axon caliber (with a model of the control mechanism). *J. Comp. Neurol.*, 1972, 144, 233—252.

3. Friedrich V. L., Jr: The myelin deficit in quaking mice. *Brain Res.*, 1974, 82, 168—172.
4. Hildebrand C., Hahn R.: Relation between myelin sheath thickness and axon size in spinal cord white matter of some vertebrate species. *J. Neurol. Sci.*, 1978, 38, 421—434.
5. Matthews M. A.: An electron microscopic study of the relationship between axon diameter and the initiation of myelin production in the peripheral nervous system. *Anat. Rec.*, 1968, 161, 337—352.
6. Remahl S., Hildebrand C.: Changing relation between onset of myelination and axon diameter range in developing feline white matter. *J. Neurol. Sci.*, 1982, 54, 33—45.
7. Robain O., Mandel P.: Etude quantitative de la myélinisation et de la croissance axonale dans le corps calleux et le cordon postérieur de la moëlle chez la souris Jimpy. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1974, 29, 293—309.
8. Sawicki F.: *Elementy statystyki dla lekarzy*. PZWL, Warszawa 1974.
9. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt na podstawie badań rdzenia kręgowego w mikroskopie elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 327—342.
10. Taraszewska A., Osetowska E.: IV. Zmiany w mózgu królika pt w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 283—290.
11. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka topografii zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441—459.
12. Taraszewska A., Zelman I. B.: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. I. Nerw wzrokowy. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 219—227.
13. Waxman S. G., Swadlow H. A.: Ultrastructure of visual callosal axons in the rabbit. *Exp. Neurol.*, 1976, 53, 115—127.
14. Webster H. de F., Reier P. J., Matthieu J.-M., Quarles R. H.: Axonal abnormalities in optic nerve of Jimpy mice. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1976, 35, 306 (Abst.).
15. Wiggins R. C., Bissell A. C., Durham L., Samorajski T.: The corpus callosum during postnatal undernourishment and recovery: a morphometric analysis of myelin and axon relationship. *Brain Res.*, 1985, 328, 51—57.
16. Zelman I. B., Taraszewska A.: Patologia mielinu u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 205—218.

Adres autorek: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Warszawska 126, 05-300 Mińsk Mazowiecki.

MIECZYŚLAW WENDER, ANDRZEJ GONCERZEWICZ,  
ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ

## CONTRIBUTION TO THE PROBLEM OF DIAGNOSING OF CEREBRAL DIFFUSE SCLEROSIS

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

One of the most controversial question in the field of demyelinating disease involves the entire problem of cerebral diffuse sclerosis. The designation of diffuse sclerosis was confusing just at the beginning of its history owing to the fact, that in the original papers of Schilder (1912, 1913, 1924) three different morbid entities were described under the name of diffuse periaxonal encephalitis. They included: diffuse myelinoclastic sclerosis — true Schilder's cerebral sclerosis, subacute sclerosing panencephalitis of Van Bogaert type and the case of a not strictly classified leukodystrophy. For this reason many authors have continued to use erroneously the designation of diffuse sclerosis and Schilder's disease as synonyms.

The situation has recently become still more complex after description of adrenoleukodystrophy, which cannot be easily differentiated clinically and morphologically from a condition representing Schilder's myelinoclastic diffuse sclerosis (Poser 1985). Thus, according to the latter author, several cases described in the literature as Schilder's disease represent in fact typical cases of adrenoleukodystrophy, with the presence of "needle-like" inclusions within brain macrophages.

An other problem represents what is called transitional sclerosis, being pathologically in intermediate position between typical disseminated multiple sclerosis and myelinoclastic diffuse sclerosis. Discussing therefore the above presented question, we report two different cases of diffuse sclerosis, studied by light and electron microscopy, as well as by chemical methods.

### Description of cases

Case 1. A 8-year-old boy was admitted to the hospital for evaluation of regressive behaviour and epileptic fits. His early development was normal, but after the age of 7 years educational handicap become evident

and generalized motor seizures occurred. Results of tests of visual function showed severe loss of vision. Right-sided motor abnormalities with spasticity and Babiński sign were noted. The total protein level in the cerebrospinal fluid was slightly elevated with IgG level of 12 mg/dl. Measles titre in serum was 1:8. EEG showed diffuse slowing into the theta and delta range. During the next 12 months he developed spastic ataxia, he ceased to speak but cried spontaneously and intermittently. Pneumonia and sepsis developed and the patient died. There was no family history of neurologic or psychiatric disease. Details of clinical and laboratory findings are presented elsewhere (Pruchnik-Grabowska et al. 1984).

Case 2. A 10-year-old boy developed normally until the age of 9 years, despite of mild right hemiparesis, observed from birth. In the last three years he sporadically showed generalized motor seizures. During the last few months some visual impairment and gait disturbances developed. There was no family history of neurologic diseases or developmental disturbances. Physical examination showed severe loss of vision, right-sided spastic hemiplegia, and marked gait disturbances. There were no indications of adrenal involvement. The cerebrospinal fluid showed slight elevation of the total protein level. Measles titer in the serum was 1:16. EEG showed bilateral diffuse slowing into the delta range. In the subsequent 13 months the patient deteriorated progressively into the apallic syndrome and died with symptoms of sepsis.

#### Findings in computer-assisted tomography

Case. 1. Cerebral white matter hypodensity was noted symmetrically in both parietal lobes in paraventricular region. CT-scan repeated after two months revealed development of hypodensic lesions in the occipital lobes.

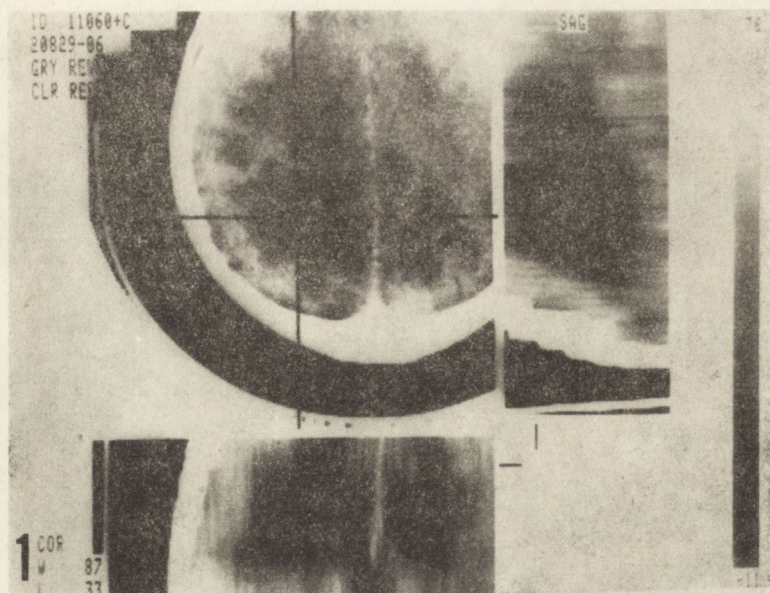
Case 2. In both hemispheres CT-scanning demonstrated hypodensic areas 24-26 H.u. in the white matter of occipital, parietal and temporal lobes (Fig. 1). Focal area of decreased attenuation was evident in the region of the left internal capsula.

#### Pathological findings

Case 1. Important findings at general autopsy included purulent tracheobronchiolitis and purulent inflammation of the urinary tract.

In the brain, marked softening of the white matter was noted in both hemispheres, extending posteriorly from the anterior pole of the caudate nucleus to the occipital lobes. In the occipital pole the white matter was grey and firm.

Case. 2. Autopsy was limited to the brain. Serial coronal sections of the brain showed an immense area of decoloration of the entire white



*Fig. 1.* CT-scan demonstrating hypodense areas in the white matter of both hemispheres in a case of adrenoleukodystrophy

*Ryc. 1.* Badania KT wykazujące ogniska hypodensyjne w istocie białej obu półkul mózgu w przypadku adrenoleukodystrofii

matter, sparing only the narrow subcortical bands, starting from the posterior part of the frontal lobes and extending into parietal, temporal and occipital lobes. In the inferior part of the pons and in the anterior part of the oblongate medulla a tringular greyish area was observed.

#### Light microscopy

The following parts of the brain: parietal, temporal and occipital lobes, cerebellum, pons and oblongate medulla were studied.

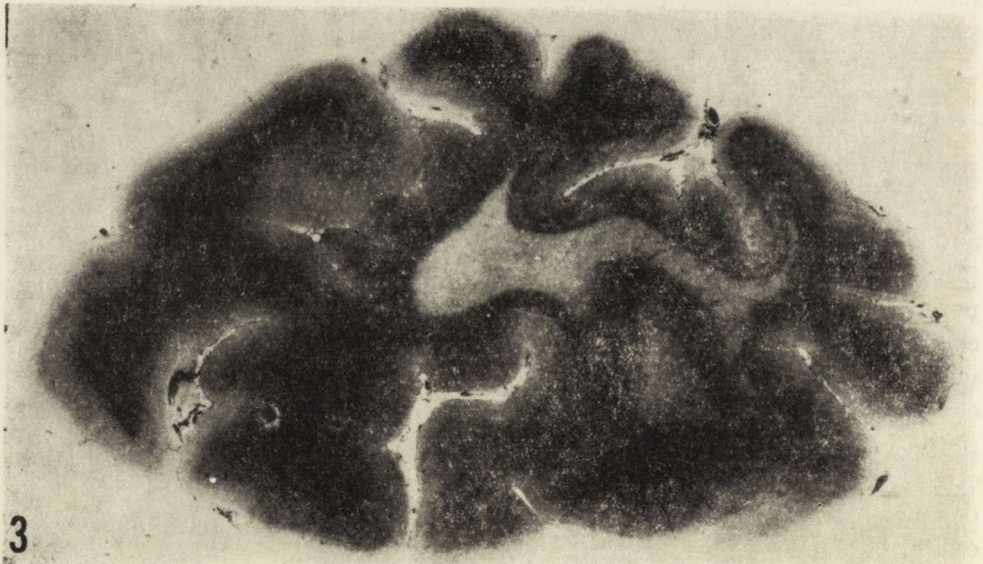
Case 1. Light microscopic examination revealed in parietal, temporal and occipital lobes the progressing demyelination of the white matter (Fig. 2), sparing "U" fibers. The demyelination was associated with dense perivascular lymphocytic infiltrates. Among these cells, some plasma cells and large distended macrophages containing sudan-positive deposits were observed. In areas undergoing demyelination many reactive astrocytes were seen showing nuclear pleomorphism and abundant eosinophilic cytoplasm. The marginal glial wall was only moderately pronounced. In the occipital lobes some fibrillary gliosis was visible. Secondary degeneration of pyramidal tracts was disclosed. Some cortical neurocytes exhibited signs of chronic or ischemic degeneration.

Case 2. Microscopic sections showed extensive progressing demyelination throughout the white matter of the brain (Fig. 3). A separate de-



*Fig. 2.* Diffuse demyelination of cerebral white matter in a case of Schilder's disease.  $\times 3$

*Ryc. 2.* Rozlana demielinizacja mózgowej istoty białej w przypadku choroby Schildera. Pow.  $3 \times$



*Fig. 3.* Extensive demyelination in the cerebral white matter in a case of adrenoleukodystrophy

*Ryc. 3.* Rozległa demielinizacja mózgowej istoty białej w przypadku adrenoleukodystrofii



*Fig. 4.* Demyelination plaque in the pons in a case of adrenoleukodystrophy.  
× 15

*Ryc. 4.* Ognisko demielinizacji w móście w przypadku adrenoleukodystrofii. Pow.  
15 ×

*Fig. 5.* Perivascular infiltrates at the border line of demyelination occurring in  
a case of adrenoleukodystrophy. Nissl

*Ryc. 5.* Nacieki okołonaczyniowe na granicy pola demielinizacji w przypadku adre-  
noleukodystrofii. Nissl

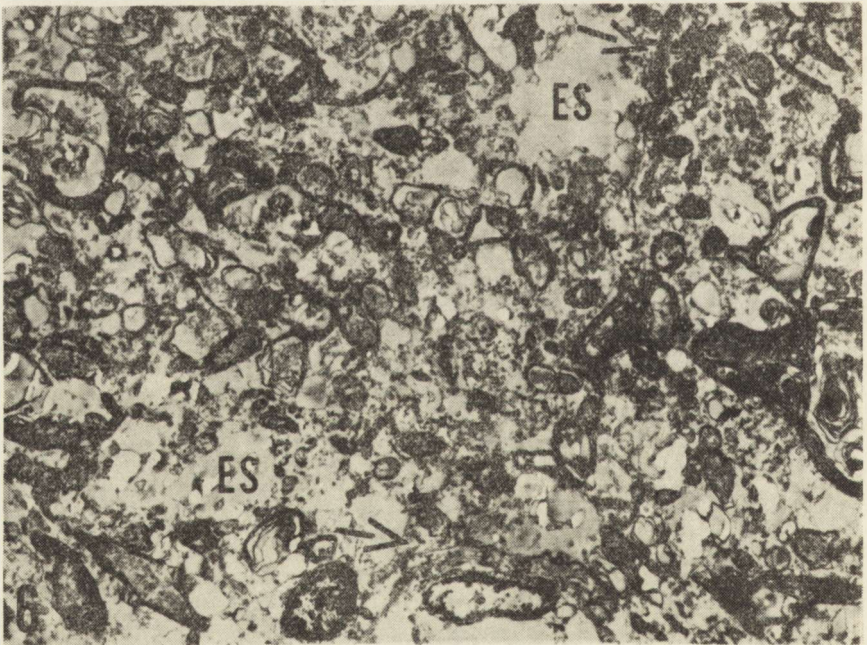
myelination plaque was noticed in the pons (Fig. 4). In regions of active demyelination (Fig. 5), striking perivascular infiltrates of mononuclears were seen as well as abundant macrophages containing sudan-positive material and proliferating astrocytes. Several cortical neurocytes degenerated.

#### Electron microscopy

In both two cases electron microscopy studies were performed on white matter specimens obtained at autopsy from all above mentioned parts of the brains. The death-autopsy interval was 6 hours in both cases; the first two hours the bodies were kept in room temperature, then were transferred into cold storage. The samples obtained at autopsy were immediately immersed into cold paraformaldehyde-glutaraldehyde pH 7.4, Karnovsky fixing solution for 6 hours, and then washed overnight in cold cacodylate buffer at pH 7.4. This was followed by 1 hour fixation in 1% buffered osmium tetroxide, dehydration and embedding in Epon. The ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a 7A JEM electron microscope.

#### Case 1. Schilder's disease:

The white matter taken from the most severely affected areas of the

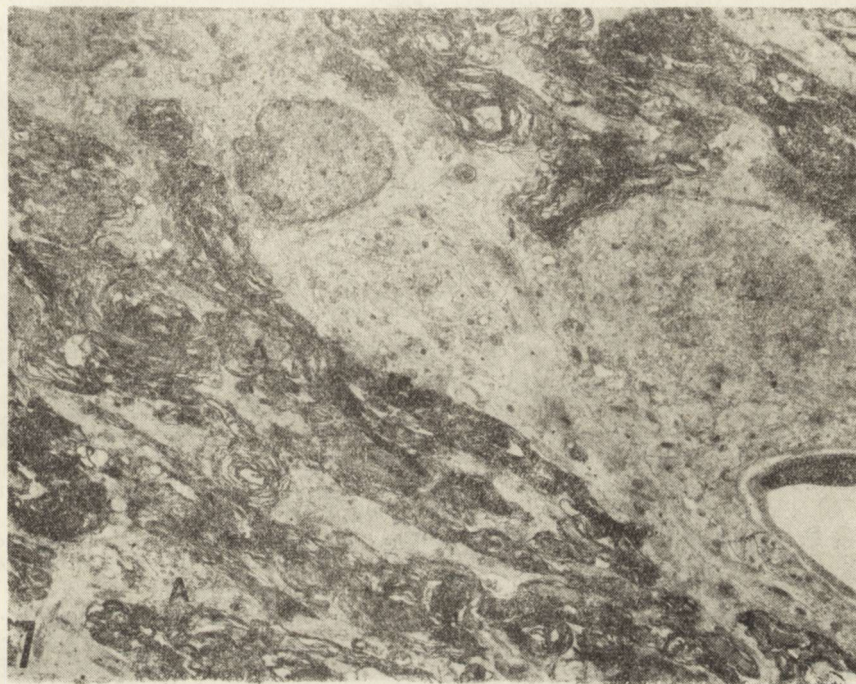


*Fig. 6.* Overview of the border of the demyelination area in a case of Schilder's disease. Variations of myelin thickness are visible. Extracellular spaces are widened in some places (ES).  $\times 2100$

*Ryc. 6.* Obrzeża pola demielinizacji w przypadku choroby Schildera. Widoczna jest różna grubość zachowanych osłonek mielinowych, miejscami powiększenie przestrzeni pozakomórkowych (ES). Pow. 2100  $\times$



brain as almost completely devoid of myelin sheaths, axons and oligodendroglia cells. The remaining myelin sheaths demonstrated vacuolar changes and dissociation of myelin lamellae. The extracellular spaces were widened (Fig. 6). Axonal degeneration consisting of granular disintegration of the axoplasm and some aggregation of mitochondria and electron-dense bodies was also visible (Figs 6, 7, 8). Astrocytes were



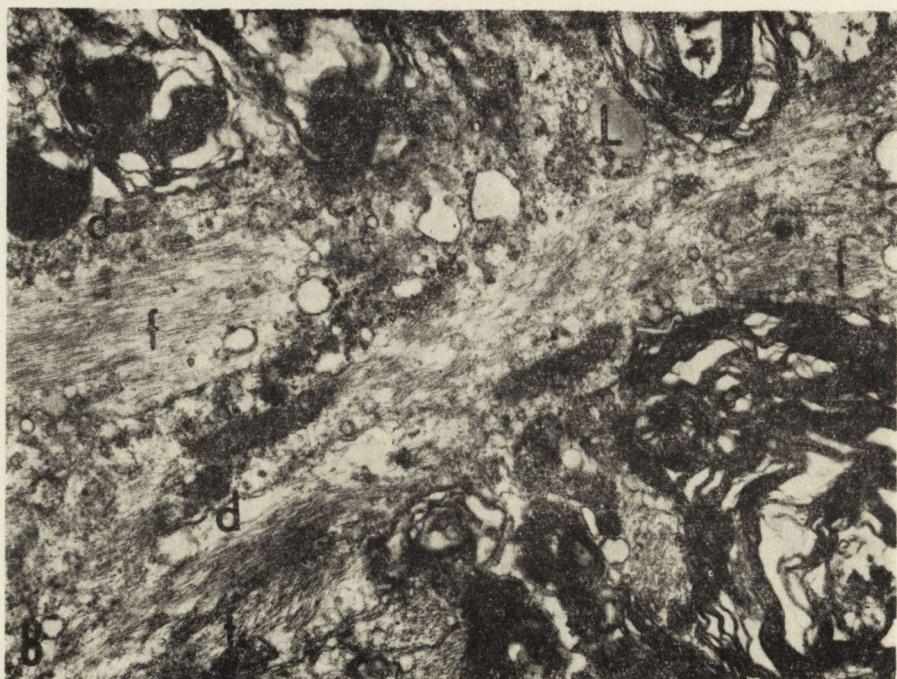
*Fig. 7.* Case of Schilder's disease. Hypertrophied perivascular astrocyte with cytoplasm filled with dense bodies and gliofibrils. Astrocytic processes penetrate masses of degenerating myelin. Naked axons (A) are also visible.  $\times 5700$

*Ryc. 7.* Przypadek choroby Schildera. W cytoplazmie hipertroficznego okołonaczyniowego astrocyta widoczne są liczne gęste ciała i filamenty glejowe. Wypustki astrocytarne widoczne są wśród skupisk rozpadającej się mieliny oraz pojedynczych aksonów pozbawionych osłonki (A). Pow. 5700  $\times$

hypertrophied (Fig. 7) and contained numerous mitochondria and ribosomes in pericarya as well as abundant intermediate filaments in cell processes (Figs 7, 8). Lipid droplets (Fig. 8) and myelin debris (Fig. 9) were often spotted within cytoplasm of these cells. The demyelinated areas were searched for the presence of cytoplasmic needle-like inclusions in macrophages, but such structures were not found.

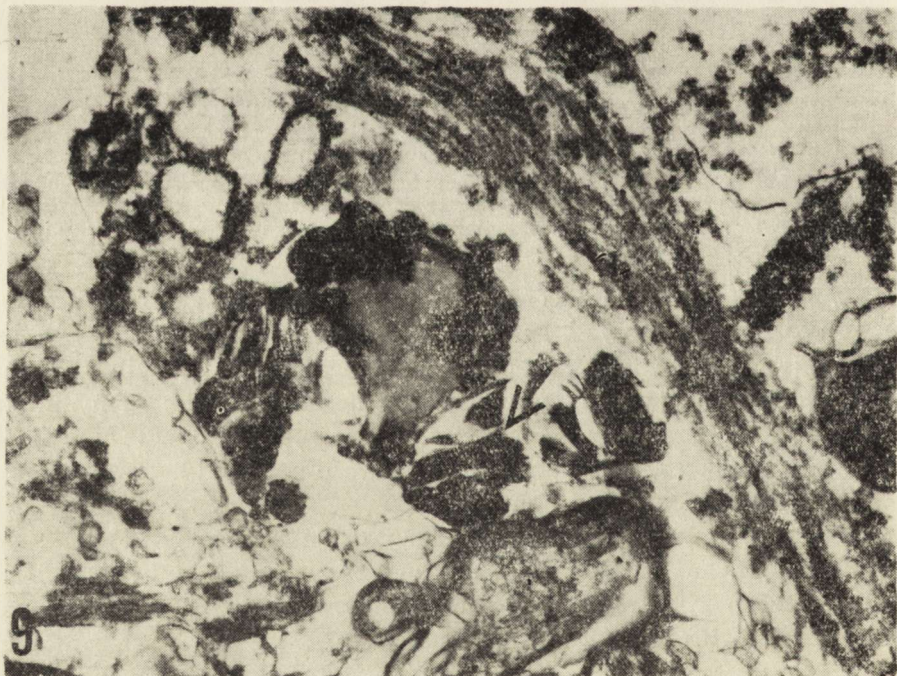
#### Case 2. Adrenoleukodystrophy:

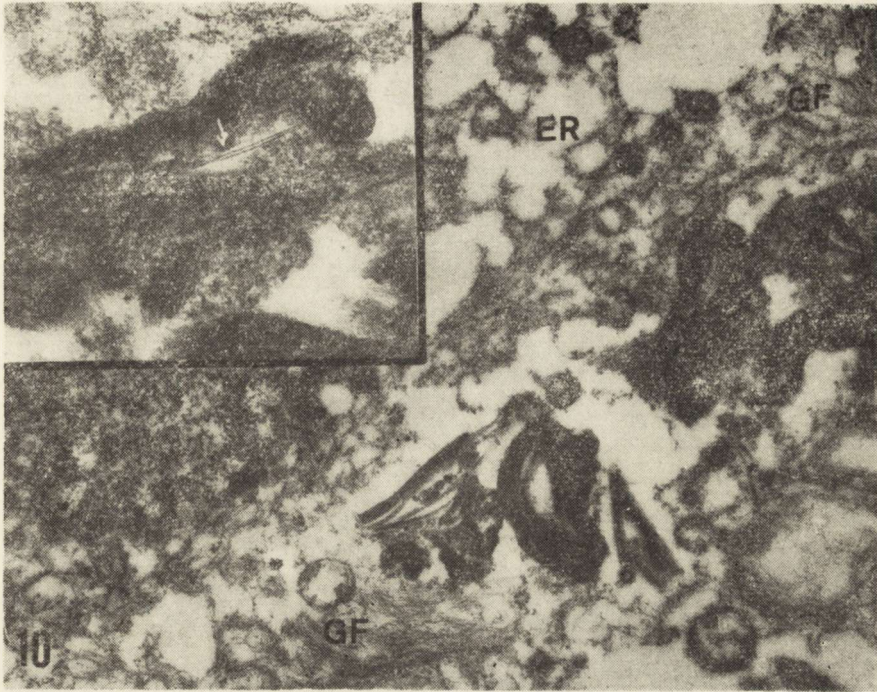
The white matter was almost completely devoid of myelin sheaths and contained abundant myelin debris. The product of myelin breakdown were often seen in astroglial cytoplasm between bundles of intermediate filaments (Fig. 10). Many macrophages were seen (Fig. 12) containing



*Fig. 8.* Case of Schilder's disease. Hypertrophied astrocyte. Cytoplasm contains bundles of intermediate filaments (f), dense bodies (d) and lipid droplet (l). Different stages of myelin degeneration are visible.  $\times 12800$

*Ryc. 8.* Przypadek choroby Schildera. Przerosły astrocyt. W cytoplazmie obecne są wiązki filamentów glejowych (f), ciała gęste (d) i kropla lipidowa (l). Rozpad mielinu o różnym stopniu zaawansowania. Pow.  $\times 12800$





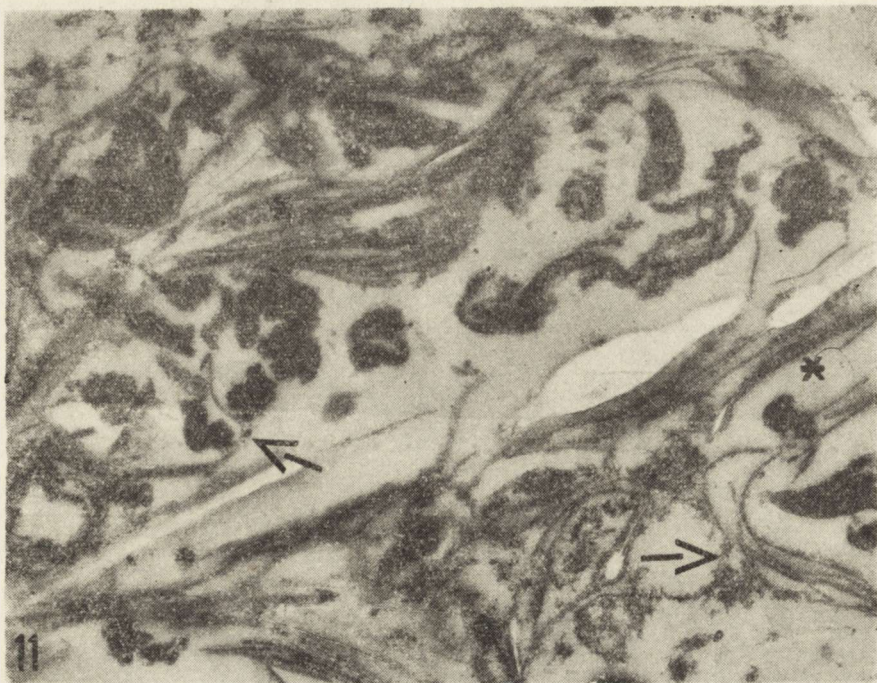
*Fig. 10.* Within astrocytic cytoplasm in between distended endoplasmic reticulum (ER) and numerous bundles of intermediate filaments (GF) osmophilic myelin debris are visible. Inclusion consisting of two leaflets separated by an electron-lucent space is better visible on a magnified inset (arrow). Two similar structures in close neighbourhood marked by asterisk. Case of adrenoleukodystrophy.  $\times 21000$ , inset  $\times 44000$

*Ryc. 10.* W cytoplazmie astrocyta pomiędzy rozdętymi kanałami siateczki śródplazmatycznej (ER) i licznymi włóknami glejowymi (GF) widoczne osmofilne produkty rozpadu mieliny. Powiększony fragment uwidacznia wtęret w postaci parzystych blaszek ograniczających elektronooptycznie jasną przestrzeń (strzałka). Znajdujące się w pobliżu dwie podobne struktury oznaczone gwiazdką. Przypadek adrenoleukodystrofii. Pow.  $\times 21000$ , fragment — pow.  $44000 \times$

osmiophilic fragments of degenerated myelin and variable number of needle-like inclusions composed of paired electron-dense leaflets. These profiles were scattered or occasionally aggregated into sheaves (Figs 11, 12, 13). Some of them were surrounded by an electron-lucent spaces (Fig. 13). Rarely these inclusions were seen in the astrocytic cytoplasm (Fig. 10), but none were found in oligodendroglia cells.

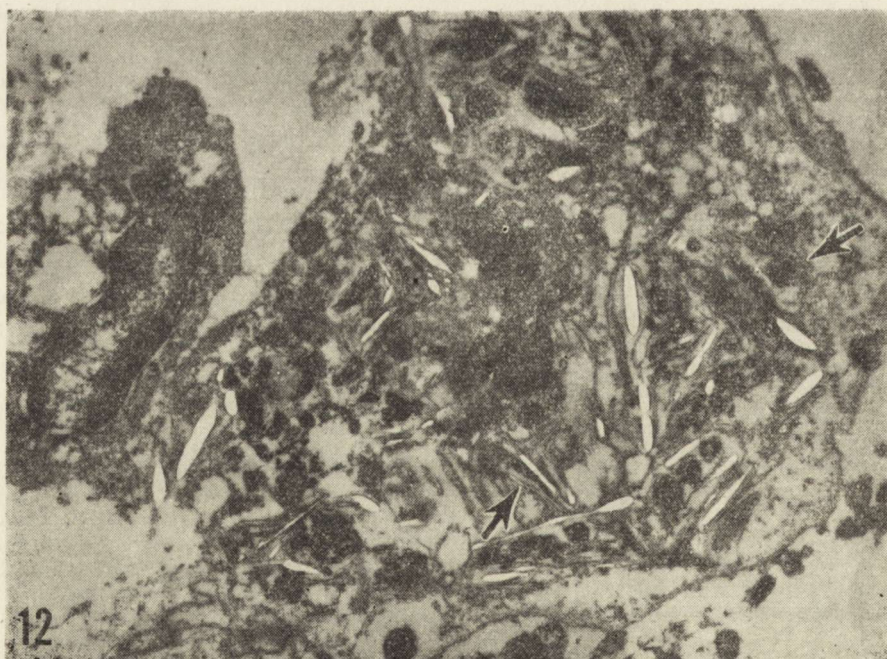
*Fig. 9.* Within cytoplasm containing bundle of intermediate filaments an accumulation of osmiophilic material is visible. Although most of it has an amorphous appearance, the lamellar structure is partly retained (arrow). Case of Schilder's disease.  $\times 27000$

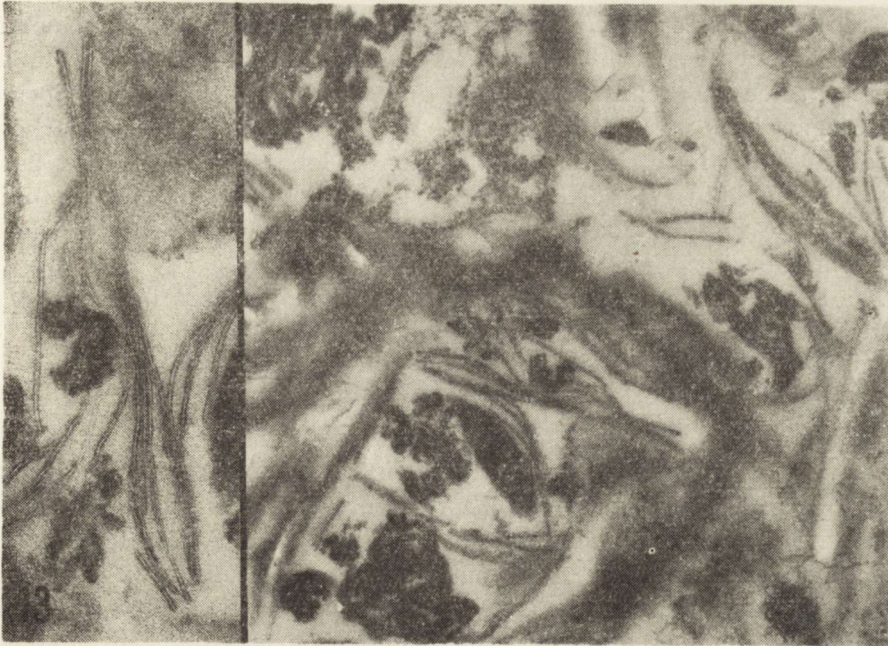
*Ryc. 9.* W cytoplazmie obok wiązki filamentów glejowych zawarte jest skupisko materiału osmofilnego. Jakkolwiek większość materiału ma wygląd bezpostaciowy, jednak jego część zachowała budowę warstwową (strzałka). Przypadek choroby Schildera. Pow.  $2700 \times$



*Fig. 11.* Case of adrenoleukodystrophy. Cytoplasm of macrophage. The sheaves of lamellae run parallelly (asterisks), or exhibit curvilinear profiles (arrows). Artifactual lipid clefts.  $\times 21000$

*Ryc. 11.* Przypadek adrenoleukodystrofii. Wiązki parzystych blaszek w cytoplazmie makrofaga ułożone równolegle (gwiazdki), bądź tworzące struktury o profilu skrętnolinijnym (strzałki). Pow. 21000  $\times$





*Fig. 13.* Case of adrenoleukodystrophy. Needle-like inclusions within cytoplasm of macrophage are randomly dispersed among osmophilic myelin debris. Detailed structure of the inclusion is visible on inset — each profile is composed of electron-lucent space bordered by two parallel dense leaflets.  $\times 18000$ , inset  $\times 36000$

*Ryc. 13.* Przypadek adrenoleukodystrofii. W cytoplazmie makrofaga widoczne iglaste wtręty rozproszone między osmofilnymi złogami. Powiększony fragment po stronie lewej obrazuje ich budowę — elektronooptycznie jasna przestrzeń jest ograniczona przez dwie równoległe elektronowo gęste blaszki. Pow. 18000  $\times$ . Fragment — pow. 36000  $\times$

### Biochemistry

Lipids of the white matter were separated and quantitated as described in our previous paper (Wender et al. 1983).

Case 1. Cholesterol content was markedly decreased as compared to the control case, whereas cholesterol esters content was normal. The contents of cerebroside and sulfatides were normal. Among individual phospholipid fractions of the white matter, most severely effected was plasmalogen. The contents of phosphatidylcholine, phosphatidylserine plus phosphatidylinositide and phosphatidylethanolamine were very low. No increase of lysophosphatidylcholine level was detected.

*Fig. 12.* Ballooned macrophage in the brain of adrenoleukodystrophy case. Its cytoplasm is filled with osmophilic myelin debris and numerous curvilinear inclusions (arrows).  $\times 9000$

*Ryc. 12.* Makrofag w mózgu w przypadku adrenoleukodystrofii z balonowato rozдутą cytoplazmą wypełnioną osmofilnymi produktami rozpadu mieliny oraz znaczną ilością liniowych wtrętów o mniej lub bardziej zaokrąglonych profilach (strzałki). Pow. 9000  $\times$

Case 2. Cholesterol content varied in the studied lobes from normal to decreased values. The content of cholesterol esters was low in the severely affected occipital lobe and intensively augmented in parietal and temporal lobes. Cerebroside and sulfatide contents were markedly decreased with the exception of the frontal lobe. The content of particular phospholipid fractions was decreased only in some of the studied samples. The lysophosphatidylcholine level was enhanced only in one of the studied brain lobes.

The detailed results of chemical studies are presented in Table 1.

#### DISCUSSION

Despite the great progress in paraclinical methods of investigation, many cases of cerebral diffuse sclerosis are still incorrectly diagnosed during the patient's life. The associated pathology, including light microscopic and histochemical studies, may also be very confusing. Therefore, in both our cases electron microscopy has for the first time given the possibility of distinguishing between Schilder's disease and adrenoleukodystrophy.

According to Poser (1985) the following definition of Schilder's disease is offered. The disease is a subacute or chronic myelinoclastic disorder resulting in the formation of one or more, commonly two, roughly symmetrical plaques measuring at least  $2 \times 3$  cm in two of the three dimensions, involving the centrum semiovale of the cerebral hemispheres. The lack of involvement of the peripheral nervous system and adrenal function as well as the absence of cytoplasmic needle-like inclusions in macrophages allow to exclude the very similar in many aspects metabolic disease — adrenoleukodystrophy (Powell et al. 1975; Palmucci et al. 1982). For some authors the latter disease resembled myelinoclastic diffuse sclerosis so closely that they called adrenoleukodystrophy erroneously a sex-linked Schilder's disease (Schaumburg et al. 1974).

The value of computer-assisted tomography in differential diagnosis of cerebral diffuse sclerosis is limited by the fact, that diffuse, large hypodensic lesions are found in Schilder's disease and in metabolic variants of diffuse sclerosis as well. In both our cases CT-scan was very similar, despite of the distinct cause of cerebral lesions. Additionally, it should be noted that in our case of Schilder's disease the first changes in CT-scan were visible in the parietal lobe and appeared only later in the occipital lobe. In pathological studies on autoptic brain, more pronounced changes were visible in the occipital lobe, where the myelin of the white matter was almost completely lost, whereas in the parietal lobe the changes were not so pronounced and seemed more fresh from the morphological point of view. This might mean that myelin destruc-

Table 1. Lipids of white matter in cases of cerebral diffuse sclerosis in mM/100 g of fresh tissue  
 Tabela 1. Lipidy istoty białej mózgu w przypadkach mózgowego stwardnienia rozlanego w mM/100 g świeżej tkanki

Lipids Lipidy	Case 1. Schilder disease (8 years old) Przyp. 1. Choroba Schildera (8 lat)			Case 2. Adrenoleukodystrophy (10 years old) Przyp. 2. Adrenoleukodystrofia (10 lat)			Control case (10 years old) Renal insufficiency Przypadek kontrolny (10 lat) niewydolność nerek
	parietal lobe płat ciemieniowy	occipital lobe płat potyliczny	frontal lobe płat czołowy	parietal lobe płat ciemieniowy	temporal lobe płat skroniowy	occipital lobe płat potyliczny	
	Cholesterol	1.8	1.1	9.7	2.1	7.9	5.3
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.1	0.2	0,1	1.4	1.0	0.1	0.1
Cerebrosides Cerebrozydy	2.9	2.7	4.5	0.7	0.8	1.0	2,4
Sulfatides Sulfatydy	1.1	0.3	0.6	0.2	0.2	0,2	0.8
Total galactolipids Całkowite galaktolipidy	4.0	2.9	5.1	0.9	1.0	1.2	3.1
Sphingomyelins Sfingomieliiny	0.2	0.2	0.6	1.0	0.4	0.6	0.7
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	0.4	0.5	1.1	3.1	1.1	1.2	1.5
Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina	0.05	0.1	0.1	1.0	0.3	0,2	0.2
Phosphatidylserine + phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + fosfatydyloinozytol	0.1	0.1	0	1.3	0.1	0.02	0.7
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	0.1	0.1	1.2	1.4	0.4	0.4	0.4
Plasmalogens Plazmalogeny	0.2	0.1	0.6	1.1	0,7	0.6	1.6
Total phospholipids Całkowite fosfolipidy	1.1	1.2	3.7	8.9	3.0	3.0	5.1

tion in Schilder's disease may proceed at variable rates in different parts of the brain and may even stop temporarily.

The presented electron-microscopic and chemical findings in the case of Schilder's disease are identical to those described in the disseminated form of multiple sclerosis. It should be emphasized that, despite the rapid progress of myelin destruction, as determined by the clinical course and changes in CT-scan, only minute amounts of cholesterol esters and lysophosphatidylcholine have been noticed. The former may be perhaps explained by the rapid mobile transport of all catabolic products of myelin by the very numerous macrophages, visible in all microscopical fields of the cerebral white matter.

Returning to the problem of the position of Schilder's disease in the whole group of demyelinating diseases, backed by our own observations and by the vast literature of the subject (Poser, Van Bogaert 1956; Iwanowski et al. 1972; Ferrer et al. 1981 and others) we have to emphasize some points. First of all, it should be stressed that the pathology of the diffuse or diffuse-disseminated sclerosis does not differ substantially in its light and electronmicroscopic aspects from the typical disseminated form of multiple sclerosis. The only difference involves dimensions of the demyelinating lesions and rapid progression of the process, only seldom observed in the disseminated form of sclerosis en plaque. Therefore, we should be inclined to stress once more that multiple sclerosis (sclerosis en plaque) has two main subtypes: the typical disseminated form and the more rarely occurring diffuse one (Schilder's disease). The reason why in some cases the cerebral changes are disseminated and in others, mainly in children, diffuse has not yet been clarified, and the solution should be searched for in immunological studies.

Adrenoleukodystrophy is a known for several years hereditary cerebral disorder, occurring most often in children. However, the disease was not precisely defined since the findings of cytoplasmic inclusions (Powers, Schaumburg 1974) and biochemical abnormalities (Igarashi et al. 1976) have been published. The chemical changes are specific, being characterized by the presence of unusually long-chain fatty acids in cholesterol esters of the brain and adrenal tissue. However, up till now the underlying enzymatic defect has not been pin-pointed. In typical cases the disease is characterized by progressive cerebral diffuse sclerosis, adrenocortical failure with melanoderma and involvement of the peripheral nervous system. Adrenocortical insufficiency and symptoms indicating lesions of the peripheral nervous system may be clinically undetectable, as they have been in our case of adrenoleukodystrophy. For this reason several cases once described as representing Schilder's disease should be properly reclassified as adrenoleukodystrophy (Poser 1985). Therefore, it should be stressed that the only possibility to distinguish the two morbid entities from each other is provided by electron



microscopy of the brain and/or adrenal cortex, or by demonstration of unusually long-chain fatty acids in cholesterol esters in chemical studies of the fresh brain.

The peculiar finding in our case of adrenoleukodystrophy involved the presence of a separate demyelination plaque in the pons, often visible in transitional forms of multiple sclerosis (diffuse-disseminated variant). Thus, even a metabolic disease of the central nervous system may occasionally present such pathomorphologically observed lesions.

#### PRZYZYNEK DO ZAGADNIENIŃ DIAGNOSTYCZNYCH W STWARDNIENIU ROZLANYM MÓZGU

##### Streszczenie

Opisano dwa przypadki stwardnienia rozlanego mózgu, w których badanie mikroskopowo-elektronowe wykazało, iż jeden z nich odpowiada klasycznej chorobie Schildera, drugi natomiast adrenoleukodystrofii. Przypadki te wskazują, że wobec zbliżonego obrazu klinicznego i histopatologicznego dopiero badanie ultrastrukturalne, wykazujące w przypadkach adrenoleukodystrofii obecność charakterystycznych wtrętów w makrofagach w zdmielinizowanej istocie białej mózgu, umożliwia prawidłowe rozpoznanie.

#### К ВОПРОСУ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ТРУДНОСТЕЙ В ДИФФУЗНОМ СКЛЕРОЗЕ МОЗГА

##### Резюме

Описаны 2 случая диффузного склероза мозга, в которых электронномикроскопическое исследование обнаружило, что один из этих случаев соответствует классической болезни Шильдера, а второй — аденолейкодистрофии. Эти случаи показывают, что при сходной клинической и гистопатологической картине, только ультраструктурное обследование, обнаруживающее в аденолейкодистрофии характерные включения в макрофагах, делает возможным правильный диагноз.

##### REFERENCES

1. Ferrer L., Fabregues L., Alvarez E., Vila J.: Schilder's disease. *Child Brain*, 1981, 8, 294—298.
2. Igarashi M., Schaumburg H., Powers J., Kishimoto Y., Kolodny E., Suzuki K.: Fatty acid abnormality in adrenoleukodystrophy. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 851—860.
3. Iwanowski L., Jędrzejewska A., Dydyk L.: Obraz postaci przejściowej stwardnienia rozsianego do rozlanego w okresie zaostrzenia. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 79—85.
4. Polmucci L., Anzil A., Schiffer D.: A case of adrenoleukodystrophy in a girl. Genetic considerations. *J. Neurol. Sc.*, 1982, 53, 233—240.
5. Poser Ch.: Myelinoclastic diffuse sclerosis. In: *Handbook of Clinical Neurology*. Ed. P. Vinken, G. Bruyn, H. Klavans, Elsevier Science Publ., Amsterdam 1985, v. 3, 419—428.

6. Poser C., Van Bogaert L.: Natural history and evolution of the concept of Schilder's diffuse sclerosis. *Acta Neurol. Scand.*, 1956, 31, 285—331.
7. Powell H., Tindal R., Schultz P.: Adrenoleukodystrophy Electron microscopic findings. *Arch. Neurol.*, 1975, 32, 250—260.
8. Powers J., Schaumburg H.: Adrenoleukodystrophy (sex-linked Schilder's disease) — A pathogenic hypothesis based on ultrastructural lesions in adrenal cortex, peripheral nerve and testis. *Amer. J. Path.*, 1974, 76, 481—492.
9. Pruchnik-Grabowska D., Wender M., Zgorzalewicz B.: przyczynek do współczesnej diagnostyki choroby Schildera. *Neur. Neurochir. Pol.*, 1984, 18, 473—475.
10. Schaumburg H., Powers J., Suzuki K., Raine C.: Adrenoleukodystrophy (sex-linked Schilder disease). Ultrastructural demonstration of specific cytoplasmic inclusions in the central nervous system. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 210—213.
11. Schilder P.: Zur Kenntnis der sogenannten diffusen Sklerose. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.*, 1912, 10, 1—60.
12. Schilder P.: Zur Frage der Encephalitis periaxialis diffuse. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.*, 1913, 15, 359—376.
13. Schilder P.: Encephalitis periaxialis diffusa. *Arch. Psychiatr.*, 1924, 71, 327—356.
14. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acid deficient diet on myelin lipids of the rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 35—43.

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

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, WOJCIECH HILGIER,  
SŁAWOMIR JANUSZEWSKI

OCENA ZMIAN MORFOLOGICZNYCH  
W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM  
W DOŚWIADCZALNYM ZESPOLE POREANIMACYJNYM  
DONIESIENIE WSTĘPNE

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Większość badań doświadczalnych nad patomorfologią ośrodkowego układu nerwowego w przypadkach jego pełnego niedokrwienia dotyczy wczesnych okresów procesu patologicznego, co wiąże się z trudnością uzyskania odpowiedniego modelu doświadczalnego pozwalającego na dowolnie długotrwałe przeżycie zwierząt po incydencie niedokrwicznym. Współcześnie stosowane modele zwierzęce wymagają bądź wykonania rozległego zabiegu operacyjnego, związanego z otwarciem klatki piersiowej dla podwiązania domózgowych pni tętniczych (Hossmann i wsp. 1973; Hossmann, Zimmermann 1974) i uszkodzenia układu naczyniowego w celu wykrwawienia zwierząt (Pluta, Kapuściński 1980), bądź też drastycznego wkroczenia do przestrzeni płynowych mózgu w przypadku doświadczeń ze wzmożonym ciśnieniem wewnątrzczaszkowym (Pluta i wsp. 1980). We wszystkich typach doświadczeń niezbędne jest również wykonanie tracheostomii do prowadzenia kontrolowanej wentylacji płuc u farmakologicznie zwiotczonych zwierząt. Wszystkie te czynniki ograniczają możliwość przeżycia zwierząt, a tym samym śledzenie dynamiki rozwoju zmian poniedokrwicznych.

Z badań na zróżnicowanych modelach niedokrwienia mózgu wiadomo, iż wyzwała ono głębokie nieprawidłowości metaboliczne oraz zaburzenia mikrokrążenia mózgu, utrzymujące się przez szereg godzin po przebytym incydencie niedokrwicznym, które same przez się odgrywają rolę istotnego czynnika uszkadzającego tkankę nerwową (Klatzo 1975, 1985). Dodatkowym czynnikiem jest zjawisko dojrzewania procesu patologicznego, prowadzące do ujawniania się nieprawidłowości tkankowych w różnym czasie po niedokrwieniu, odwrotnie proporcjonalnym do czasu za-

trzymania mózgowego krążenia krwi (Klatzo 1975). Uchwycenie całości kształtu zmian patomorfologicznych, ich charakteru, topografii, a przede wszystkim dynamiki wymaga przedłużonego okresu obserwacji. Nie gwarantuje go w warunkach całkowitego niedokrwienia mózgu stosowanie osłony farmakologicznej, która zresztą sama przez się komplikuje obraz zmian patomorfologicznych (Kapuściński, Mossakowski 1985).

W poszukiwaniu modelu odpowiedniego dla oceny dynamiki poniedokrwiennej encefalopatii, zapewniającego standaryzację warunków doświadczalnych, uniknięcie rozległej ingerencji chirurgicznej i stosowania środków farmakologicznych z jednej strony, a dowolnie długą przeżywalność zwierząt z drugiej, sięgnięto do modelu opisanego w 1982 r. przez Korpaczewa i współautorów. Polega on na pełnym zatrzymaniu krążenia krwi u szczurów, uzyskiwanym przez zaciśnięcie pęczka naczyniowego serca za pomocą specjalnie skonstruowanego urządzenia wprowadzanego do klatki piersiowej drogą wkłucia bez konieczności jej otwierania i prowadzenia kontrolowanej wentylacji płuc. Uwolnienie ucisku pęczka naczyniowego oraz zastosowanie zewnętrznego masażu serca pozwala na przywrócenie czynności układu krążenia w okresie 1—3 min. Jego długość zależy od czasu zatrzymania akcji serca. W okresie reanimacji stosuje się ponadto sztuczną wentylację płuc przy użyciu cienkiej rurki polietylenowej wprowadzonej dotchawiczo w końcowym okresie niedokrwienia i respiratora dla małych zwierząt doświadczalnych, prowadzoną aż do powrotu pełnosprawnej spontanicznej czynności oddechowej. Kontrola przepływu krwi w mózgu i w innych narządach wskazuje na jego pełne zatrzymanie w okresie ucisku pęczka naczyniowego. Ograniczoność ingerencji chirurgicznej i łatwość reanimacji pozwala na dowolnie długie przeżycie zwierząt po doświadczeniu.

Ograniczoność przedstawionego modelu doświadczalnego w porównaniu z omówionymi powyżej typami całkowitego niedokrwienia mózgu polega na tym, iż mamy tu do czynienia z zatrzymaniem krążenia krwi w całym organizmie, a zatrzymaniu akcji serca towarzyszy ustanie czynności oddechowej. Jest on więc w większym stopniu doświadczalnym modelem śmierci klinicznej niż pełnego niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, któremu wprawdzie towarzyszy zatrzymanie czynności układu oddechowego, jest ono jednak kompensowane przez cały czas sztuczną wentylacją płuc. Parametry gazometryczne krwi podawane przez autorów modelu nie przekraczają jednak wartości spotykanych w innych typach całkowitego niedokrwienia mózgu (Pluta 1982).

Przedstawiony model doświadczalny został szczegółowo scharakteryzowany pod względem fizjopatologicznym i stał się podstawą rozległych badań neurofizjologicznych, dotyczących w pierwszej kolejności upośledzenia wyższych czynności nerwowych (Korpaczew i wsp. 1982). Nie spotkaliśmy natomiast jego analizy patomorfologicznej. Skłoniło to, przed

jego ewentualnym wykorzystaniem do dalszych badań nad patomechanizmem encefalopatii poresuscytacyjnej, do przeprowadzenia patomorfologicznej charakterystyki zmian w ośrodkowym układzie nerwowym i ich dynamiki.

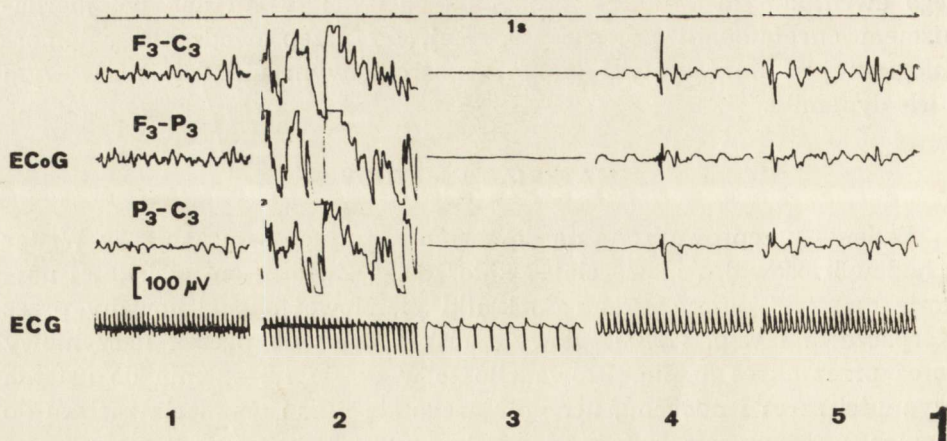
#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dorosłych szczurach samcach rasy Wistar z hodowli losowej o masie ciała około 180 g. Zwierzętom w lekkiej narkozie eterowej wprowadzano do klatki piersiowej skonstruowany przez Korpaczewa i wsp. (1982) igłowy zacisk i uciskano pęczek naczyniowy serca przez okres 3 min. Prowadziło to w czasie 1,5—2 min do ustania czynności serca i oddechu, utrzymującego się mimo usunięcia zacisku do momentu rozpoczęcia czynności reanimacyjnych, które podejmowano po upływie 10 min. Zewnętrzny masaż serca stosowano do przywrócenia jego spontanicznej czynności. Kontrolowaną wentylację płuc powietrzem o normalnym składzie gazowym prowadzono przy użyciu respiratora dla małych zwierząt laboratoryjnych poprzez cienką rurkę polietylenową, wprowadzoną do tchawicy w końcowym okresie zatrzymania akcji serca. Przerwywano ją przy uzyskaniu pełnosprawnej własnej czynności oddechowej.

Ze względu na dokładną fizjopatologiczną charakterystykę modelu opisaną przez jego autorów, ocenę stanu zwierząt ograniczono do obserwacji czasu powrotu czynności serca i oddechu i pojawiania się odruchu rogówkowego, a także zachowania się zwierząt i ich reakcji na bodźce bólowe, dźwiękowe i świetlne. W małej wydzielonej grupie zwierząt wykonano zapis czynności bioelektrycznej mózgu i serca.

Zatrzymanie akcji serca i oddechu prowadziło w okresie 10—15 sek do ustania czynności bioelektrycznej mózgu, przyjmującej w zapisie elektrokortykograficznym postać linii izoelektrycznej utrzymującej się przez cały okres niedokrwienia oraz około 32—35 min po reanimacji. Pod koniec tego okresu pojawiały się wykładniki nieciągłej czynności bioelektrycznej, porozielane okresami ciszy bioelektrycznej. Ciągły zapis czynności bioelektrycznej powracał po około 45—50 min po przywróceniu krążenia (ryc. 1). Zwraca uwagę fakt, iż mimo ustania mechanicznej czynności serca w zapisie elektrokardiograficznym obserwowano jego bardzo zwolnioną czynność bioelektryczną (ryc. 1). Zjawisko to stwierdzili również Korpaczew i wsp. (1982) u zwierząt, u których okres śmierci klinicznej nie przekraczał 10 min.

Zastosowanie czynności reanimacyjnych przywracało czynność serca w okresie 1—3 min. Średni czas u 23 zwierząt użytych do badań morfologicznych wynosił 1 min 30 s. Spontaniczna czynność oddechowa wracała między 1,5 min a 17 min (średnia 6 min 36s), z tym, że tylko



Ryc. 1. Zapis czynności bioelektrycznej mózgu i serca w czasie niedokrwienia i po reanimacji. 1 — Okres przed uciśnięciem pęczka naczyniowego serca, 2 — Okres bezpośrednio po uciśnięciu pęczka naczyniowego serca, 3 — 50 sekunda ucisku, 4 — 35 min po reanimacji, 5 — 45 min po reanimacji.

F<sub>3</sub>-C<sub>3</sub> }  
 F<sub>3</sub>-P<sub>3</sub> } Odprowadzenia zapisu elektrokortykograficznego  
 P<sub>3</sub>-C<sub>3</sub> }

Fig. 1. Record of bioelectric activity of the brain and hearth during ischemia and after reanimation. 1 — Period before compression of, 2 — Period directly after compression of, 3 — 50th second of compression, 4 — 35 min of postreanimation period, 5 — 45 min of postreanimation period.

F<sub>3</sub>-C<sub>3</sub> }  
 F<sub>3</sub>-P<sub>3</sub> } Leads of ECoG recording  
 P<sub>3</sub>-C<sub>3</sub> }

u 3 szczurów pojawiała się ona w czasie dłuższym niż 10 min. Powrót odruchu rogówkowego stwierdzano w przedziale czasowym 17—54 min (średnia — 29 min 30 s).

Po reanimacji zwierzęta wykazywały prężenie kończyn oraz znacznie wzmożone napięcie mięśniowe. Leżały z wyprostowanymi kończynami wysuniętymi poza tułów. Nie reagowały na bodźce bólowe i dźwiękowe. W ciągu pierwszych 6 godz. zaczynały wykonywać spontaniczne ruchy i przybierać prawidłową postawę. Powracały reakcje na bodźce zewnętrzne. Po 12 godz. ich zachowanie się było identyczne jak szczurów niepoddanych żadnym zabiegom doświadczalnym.

Zabieg charakteryzował się wysoką śmiertelnością zwierząt. Około 40% ich ginęło w okresie zatrzymania czynności serca i oddechu. Po reanimacji padały jedynie pojedyncze szczury.

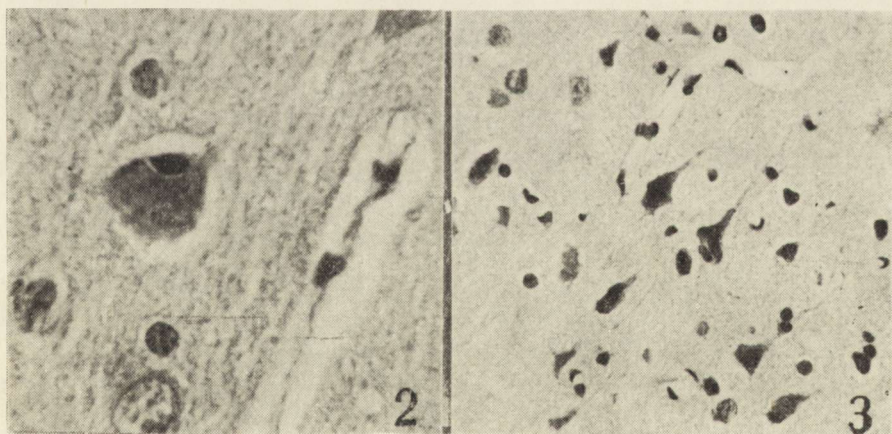
Zwierzęta zabijano w grupach po 3 do 5 po upływie 24 i 72 godz. oraz 7, 14, 21 i 24 dni po doświadczeniu, wykonując przezsercową perfuzję 10% zbuforowaną formaliną. Mózgowie wraz z krótkim fragmentem szyjnego odcinka rdzenia przetrzymywano następnie w płynie perfuzyjnym przez okres 4 tygodni. Wycinki tkankowe pobierane z dwóch poziomów półkul mózgu, śródmózgowia, mózdzku z mostem, rdzenia przedłużonego oraz szyjnego odcinka rdzenia kręgowego przeprowadza-

no w sposób rutynowy do parafiny. Skrawki parafinowe o grubości 10  $\mu\text{m}$  barwiono hematoksyliną i eozyną oraz według metody Klüvera—Barrery.

#### WYNIKI

Nieprawidłowości strukturalne ośrodkowego układu nerwowego stwierdzono we wszystkich przypadkach. Miały one zróżnicowany charakter w zależności od czasu przeżycia po incydencie niedokrwiennym. Występowały w postaci zmian rozsianych o różnej intensywności w poszczególnych formacjach mózgowia, jakkolwiek żadna z nich nie była całkowicie zaoszczędzona. W żadnym też przypadku nie stwierdzono pełnego ogniskowego rozpadu tkanki. Cechą znamioną całego materiału było znaczne zróżnicowanie intensywności uszkodzeń u poszczególnych zwierząt.

W najwcześniejszym okresie, to jest po 24 godz. przeżycia, nieprawidłowości tkankowe miały charakter rozsianych, nieswoistych zmian zwyrodnieniowych komórek nerwowych. Przeważały wśród nich uszkodzenia typu ostrego obrzmienia neuronów (ryc. 2), zmian niedokrwiennych (ryc. 3), homogenizacyjnych (ryc. 4) oraz obwodowej lub centralnej tigrolizy (ryc. 5). Występowały również komórki z cechami zwyrodnienia wodniczkowego, dwójakiego typu. Pierwszy z nich charakteryzował się obecnością pojedynczych, większych na ogół wodniczek, położonych w przyjądrowej części cytoplazmy, drugi — zagęszczeniem wodniczek skupionych wianuszkowato na obwodzie ciała komórkowego. Zmiany zwyrodnieniowe dotyczyły zazwyczaj pojedynczych neuronów lub ich

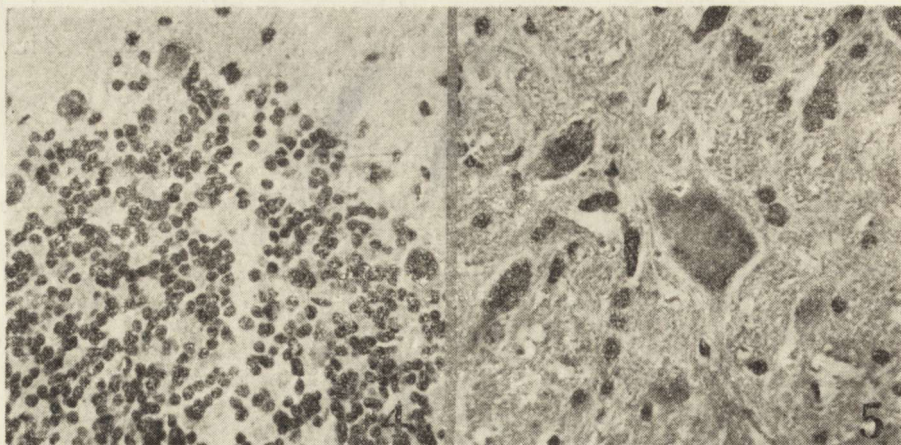


Ryc. 2. Ostre obrzmienie neuronu kory mózgu. 24 godz. po reanimacji H—E. Pow. 1000  $\times$

Fig. 2. Acute swelling of a cortical neuron. 24-h after reanimation. H—E.  $\times$  1000

Ryc. 3. Zmiany niedokrwienne neuronów kory mózgu. 24 godz. po reanimacji H—E. Pow. 400  $\times$

Fig. 3. Ischemic changes of cortical neurons. 24-h postreanimation period. H—E.  $\times$  400

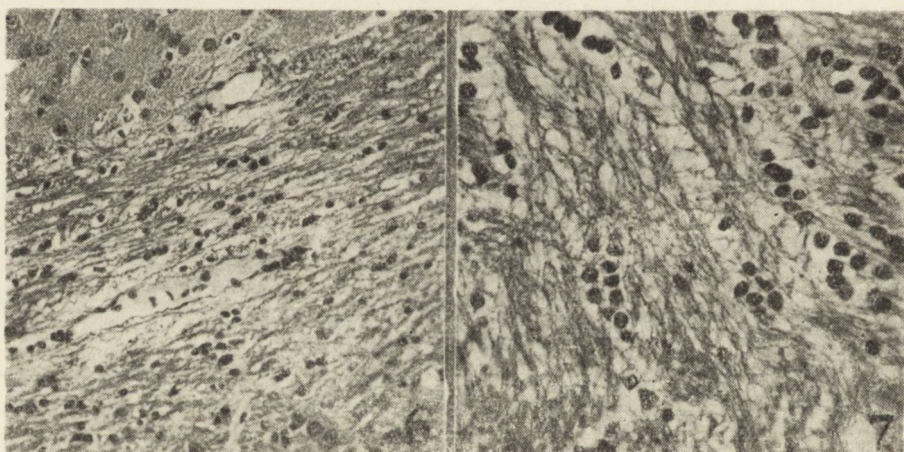


Ryc. 4. Zmiany homogenizacyjne komórek Purkiniego na szczycie zakrętu kory mózdzku. 24 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 4. Homogenization of Purkinje cells. 24-h postreanimation period. H—E. × 400

Ryc. 5. Tigroliza komórki nerwowej jądra olbrzymiokomórkowego mostu. 24 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 5. Tigrolysis of neuron from gigantocellular nucleus of the pons. 24-h postreanimation period. H—E. × 400



Ryc. 6. Rozrzedzenie utkania podkorowej istoty białej półkul mózgu. 24 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 6. Rarefaction of subcortical white matter from the cerebral hemisphere. 24-h postreanimation period. H—E. × 200

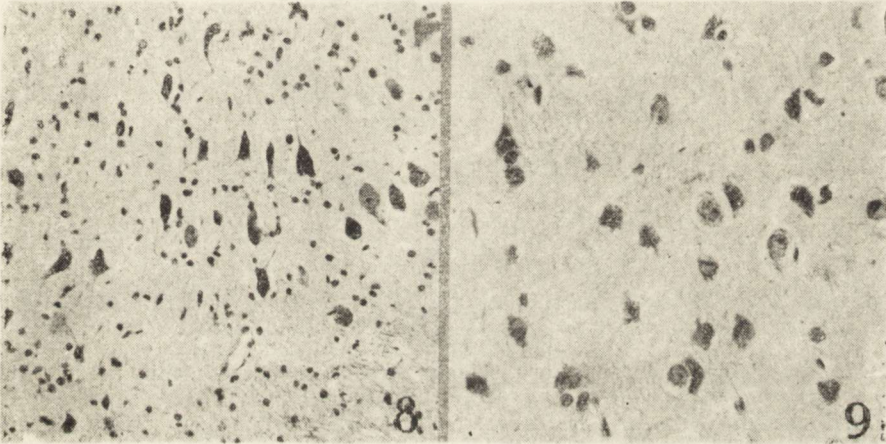
Ryc. 7. Rozluźnienie istoty białej oraz oligodendrocyty wykazujące cechy ostrego obrzmienia. 72 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 7. Rarefaction of subcortical white matter with oligodendrocytes showing features of acute swelling. 72-h postreanimation period. H—E. × 400

niewielkich ugrupowań położonych wśród całkowicie niezmiętej populacji komórek nerwowych. Występowały one prawie we wszystkich formacjach szarych ośrodkowego układu nerwowego, jednakże już w tym okresie zaznaczała się predylekcja do niektórych spośród nich. Była ona



znacznie wyraźniejsza przy dłuższym przeżyciu po reanimacji. Zmiany patologiczne najpospoliciej występowały w korze mózgu, przede wszystkim w jej II i III warstwie komórkowej, w skorupie, gdzie częściej dotyczyły neuronów dużych niż małych, w istocie czarnej, zajmując głównie jej odcinek przyśrodkowy, w korze mózdzku, niemal wyłącznie na szczycie zakrętów, w jądrach tworzących siatkowatego pnia mózgu, zwłaszcza w jądrze olbrzymiomórkowym mostu, w oliwkach dolnych i jądrze grzbietowym nerwu błędnego. W okresie tym zwracało uwagę bardzo dobre zachowanie struktur rogu Amona, gałki bladej i wzgórza, znanych z wybiórczej wrażliwości na niedokrwienie. Drugim elementem obrazu neuropatologicznego tej fazy okresu poresuscytacyjnego było uogólnione rozrzedzenie tkanki istoty białej półkul mózgu związane z poruszaniem pasm zmielinizowanych włókien nerwowych i ostrym obrzmieniem komórek gleju skąpowypustkowego (ryc. 6). Formacje białe mózdzku, pnia mózgu i rdzenia kręgowego były niezmiennione.



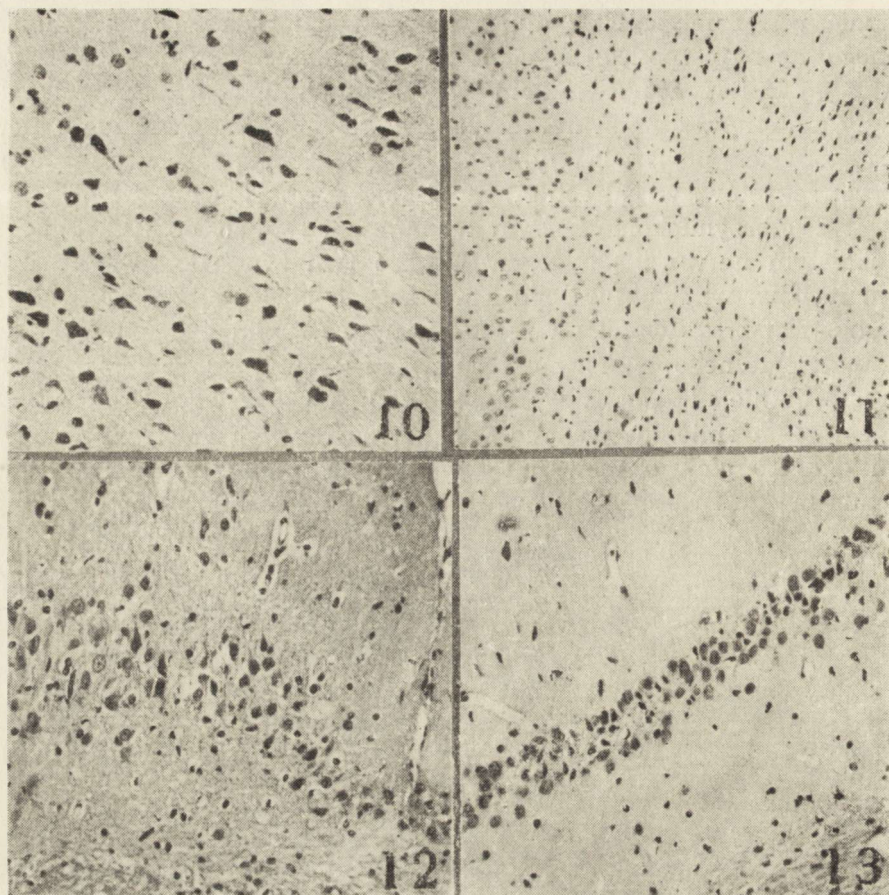
Ryc. 8. Grupa komórek z cechami zmian niedokrwiennych w jądrze zębatym mózdzku. 72 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 8. Group of ischemic neurons in dentate nucleus. 72-h postreanimation period. H—E. × 200

Ryc. 9. Obkurczone neurony warstwy ziarnistej kory mózgu. 72 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 9. Shrunken neurons of external granular cortical layer. 72-h postreanimation period. H—E × 400

Zmiany patologiczne w istocie białej były jeszcze bardziej nasilone w 3 dniu po reanimacji (ryc. 7). W tym czasie w istocie białej mózdzku stwierdzono pojawienie się drobnych jamek, które przy znacznym zagęszczeniu prowadziły do obrazu zgąbczenia tkanki. Zmiany komórkowe w formacjach szarych miały podobny charakter jak w poprzednim okresie, były tylko bardziej nasilone i obejmowały dodatkowe struktury, takie jak: jądro zębate mózdzku (ryc. 8), wzgórza, w tym przede wszystkim



Ryc. 10. Piramidowe neurony kory mózgu z cechami zwyrodnienia niedokrwienego. 72 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 10. Ischemic pyramidal neurons from cerebral cortex. 72-h postreanimation period. H—E. × 200

Ryc. 11. Warstwowe uszkodzenie kory mózgu (III warstwy). Widoczne zwyrodniałe neurony oraz ubytki komórkowe. 72 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 11. Diffuse lesion of third cortical layer. Damaged neurons and neuronal loss. 72-h postreanimation period. H—E. × 100

Ryc. 12. Ubytki neuronów sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona ograniczone do jego przyśrodkowej części. 72 godz. po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 12. Neuronal loss in the CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn, limited to its medial part. 72-h postreanimation period. H—E. × 200

Ryc. 13. Ubytek i zwyrodnienie neuronów sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona w 7 dni po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

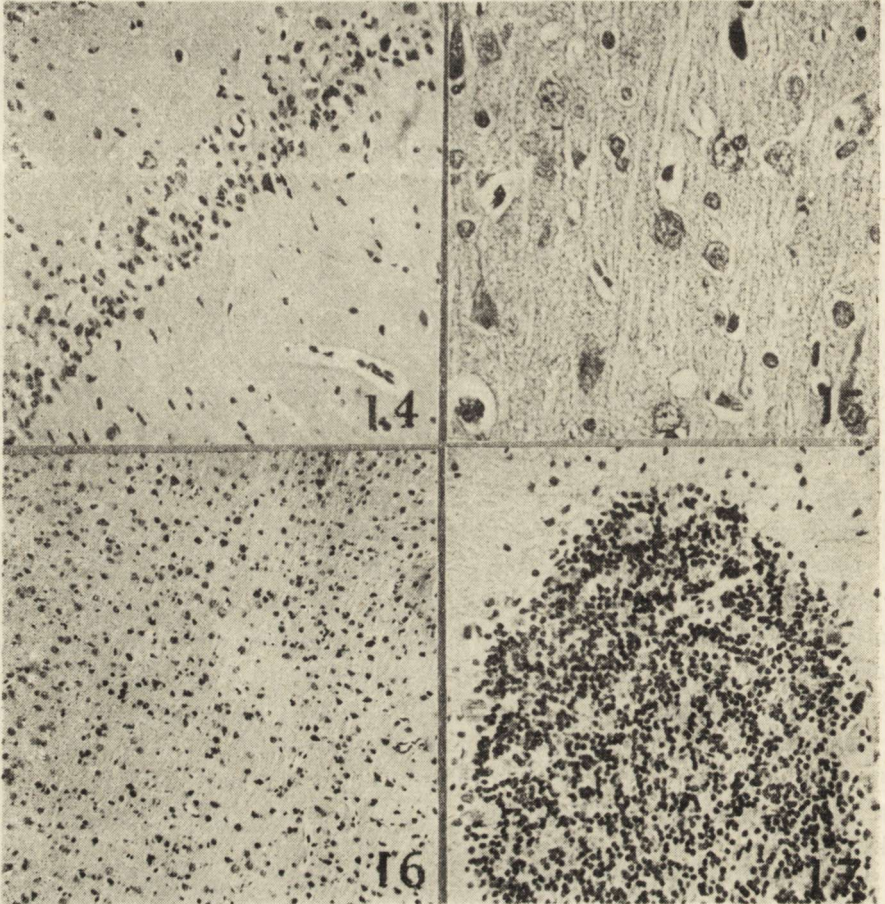
Fig. 13. Neuronal loss and degeneration in CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn. 7 days after reanimation. H—E. × 200

kim jego jądra siatkowate, gałkę błądą, a nawet rogi przednie rdzenia kręgowego. Wyraźniej zaznaczała się predylekcja uszkodzeń do powierzchniowych warstw kory mózgu (ryc. 9) i jej warstwy III, w której najbardziej zmienione były duże komórki piramidowe (ryc. 10). Zjawiskiem

nowym, pojawiającym się w tym okresie, były cechy rozpadu komórek nerwowych oraz ich ubytki, występujące przede wszystkim w III warstwie kory (ryc. 11), a w mniejszym stopniu w formacjach rogu Amona (ryc. 12). W tym ostatnim miały one bardzo niewielkie nasilenie i ograniczone były do najbardziej przyśrodkowej części sektora CA<sub>1</sub>. Cechą zmienną ubytków komórkowych w tym czasie był całkowity brak towarzyszącego odczynu gwałtownego.

Późniejsze okresy obserwacji, obejmujące 7 i 14 dni po reanimacji, charakteryzowały się zmienioną formułą zmian patologicznych, wyrażającą się przewagą ubytków komórkowych nad zmianami zwyrodnieniowymi. Wśród tych ostatnich dominowały nadal cechy tzw. schorzenia niedokrwiennego. Pojawiały się cienie komórkowe oraz obkurczone neurony, klasyfikowane zazwyczaj jako tzw. schorzenie przewlekłe. Nie spotykano natomiast komórek nerwowych z cechami zwyrodnienia wodniczki i ostrego obrzmienia. Elementem dominującym obrazu neuropatologicznego były ciężkie uszkodzenia komórek piramidowych rogu Amona, obejmujące w sposób wybiórczy cały jego sektor CA<sub>1</sub>. Obok znacznej redukcji populacji komórek nerwowych stwierdzano tu liczne komórki z cechami zwyrodnienia kwasochłonnego oraz wykładniki wczesnej reakcji gwałtownego (ryc. 13, 14). Ubytki komórkowe w korze mózgu były szczególnie zaakcentowane w warstwie III (ryc. 15) oraz w obszarach pogranicza unaczynienia przez duże pnie tętnicze, przede wszystkim tętnicę przednią i środkową mózgu (ryc. 16). I tu podobnie jak w rogu Amona ubytkom komórkowym towarzyszył rozplem komórek gwałtownego; niektóre spośród nich przypominały komórki Alzheimera typu II (ryc. 15). Odczyn ze strony gwałtownego Bergmanna towarzyszył również ubytkom komórek Purkiniego, występującym wyłącznie na szczycie zakrętów kory mózdzku, przy całkowicie niezmiętej ich populacji w głębi rowków (ryc. 17). Zwracał uwagę prawidłowy obraz istoty białej we wszystkich częściach mózgowia.

W 3 i 4 tygodniu po reanimacji obraz komórkowy struktur szarych nie odbiegał istotnie od stwierdzonego w 2 tygodniu. Zdecydowanie mniej było komórek z cechami nieswoistego zwyrodnienia, wśród których przeważały obkurczone neurony oraz nadal utrzymujące się zmiany niedokrwienne. Obok zwierząt z wyraźnymi ubytkami neuronów występowały i takie, u których nieprawidłowości strukturalne miały bardzo małe nasilenie. Zjawiskiem zasługującym na odnotowanie była obecność wyraźnego odczynu gwałtownego, przyjmującego postać bądź rozplemu rozlanego, towarzyszącego zwyrodnieniom i ubytkom komórek nerwowych (ryc. 18), bądź grudkowego (ryc. 19). W jednym i drugim przypadku astrocytom towarzyszyły pobudzone komórki mikrogleju. Innym elementem obrazu neuropatologicznego tej fazy okresu poreanimacyjnego były drobne, ograniczone ogniska rozluźnienia tkanki i zblednięcia osłonek mie-



*Ryc. 14.* Róg Amona w 14 dniu po reanimacji. Zmiany zwyrodnieniowe i ubytki komórkowe sektora CA<sub>1</sub> są bardziej nasilone i towarzyszy im rozplem komórek glejowych. H—E. Pow. 100 ×

*Fig. 14.* Ammon's horn on 14<sup>th</sup> day after reanimation. Neuronal loss and degeneration are more advanced and accompanied by glial proliferation. H—E. × 100

*Ryc. 15.* Ubytek neuronów w warstwie III kory mózgu z towarzyszącym namnożeniem gleju. Niektóre komórki glejowe przypominają nagie jądra. 14 dni po reanimacji. H—E. Pow. 400 ×

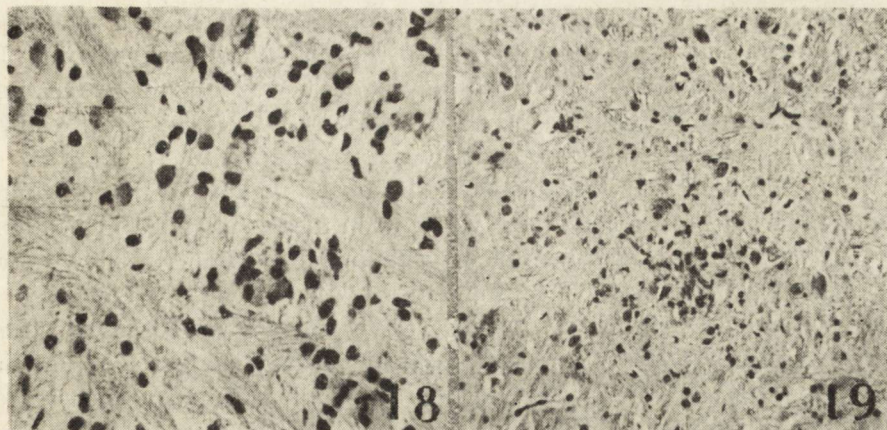
*Fig. 15.* Neuronal loss in 3rd cortical layer accompanied by increased number of glial cells, some of them resemble naked nuclei. 14 days of postreanimation period. H—E. × 400

*Ryc. 16.* Zwyrodnienie i ubytki komórek nerwowych w obszarze pogranicza unaczynienia tętnicy przedniej i środkowej mózgu. 14 dni po reanimacji. H—E. Pow. 100 ×

*Fig. 16.* Degeneration and neuronal loss in the borderline zone of vascularization by anterior and middle cerebral arteries. 14 days of postreanimation period. H—E. × 100

*Ryc. 17.* Ubytek komórek Purkinjego na szczycie zakrętu mózdzku. 14 dni po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

*Fig. 17.* Loss of Purkinje cells at the top of cerebellar gyrus. 14 days of postreanimation period. H—E. × 200



Ryc. 18. Rozlany rozplem astrocytów i mikrogleju towarzyszący zwyrodnieniu komórek nerwowych w bocznej części wzgórza. 21 dni po reanimacji. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 18. Diffuse astrocytic and microglial proliferation accompanying neuronal degeneration on 21st day of postreanimation period. H—E. × 400

Ryc. 19. Grudkowy rozplem gleju w śródmózgowiu w 28 dniu po reanimacji. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 19. Nodular glial proliferation in the substantia nigra. 28 days of postreanimation period. H—E. × 200

linowych, występujące na tle nie zmienionej skądinąd istoty białej półkul mózgu.

W żadnym okresie obserwacji nie stwierdzono nacieków złożonych z komórek krwiopochodnych.

#### OMÓWIENIE

Przedstawiony obraz strukturalnych uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego jest ubogi w stosunku do 10-minutowego pełnego zatrzymania akcji serca i oddechu w warunkach normotermicznych, wydłużonego zresztą o okres reanimacji, który obejmował średnio 1,5 min, a w pojedynczych przypadkach 3 min do pełnosprawnego powrotu krążenia krwi. Wydaje się, że późniejszy na ogół powrót czynności oddechowej odgrywał w tym przypadku rolę drugorzędą, ze względu na stosowanie w tym czasie kontrolowanej wentylacji płuc. Zastosowane warunki doświadczalnej śmierci klinicznej prowadziły przy tym do głębokiego upośledzenia funkcji ośrodkowego układu nerwowego, wyrażającego się ustaniem czynności bioelektrycznej mózgu, do restytucji, której niezbędny był okres około 45 min, oraz zaburzeniami zachowania i motoryki zwierząt, porównywalnymi co do czasu trwania z obserwacjami innych autorów w pełnym niedokrwieniu mózgowia (Hossmann i wsp. 1973; Hossmann, Zimmermann 1974; Pluta, Kapuściński 1980; Pluta i wsp. 1980; Kapuściński, Mossakowski 1983, 1985). Nieporównywalne są natomiast

charakter, rozległość i topografia uszkodzeń tkankowych ze względu na czas, zarówno niedokrwienia, jak i przeżycia po niedokrwieniu. Jak wspomniano uprzednio, większość doświadczeń z pełnym niedokrwieniem ośrodkowego układu nerwowego ma charakter doświadczeń ostrych ze względu na trudność utrzymania zwierząt przy życiu.

Wysoki próg nieodwracalności uszkodzeń tkankowych ośrodkowego układu nerwowego u szczurów w warunkach niedotlenienia i niedokrwienia jest zjawiskiem znanym. Dla uzyskania ich Levine (1960) wprowadził model skojarzonego niedotlenienia i niedokrwienia. Oporność tę Kapuściński (1983) tłumaczy wysoką czynnościową wydolnością tętniczego pierścienia podstawy mózgu. Koncepcja ta wydaje się o tyle niepełna, iż w warunkach obustronnego podwiązania tętnic szyjnych wspólnych, a na takim modelu prowadził on swoje badania, przy braku uchwytanych zaburzeń przepływu krwi i uszkodzeń strukturalnych tkanki występują głębokie nieprawidłowości metaboliczne (Mossakowski i wsp. 1973; Smiałek i wsp. 1971; Sikorska 1978). Wydaje się więc, że istotnym czynnikiem, wymagającym zresztą wyjaśnienia, są gatunkowe odrębności metaboliczne podwyższające próg wrażliwości na niedokrwienie (Ames, Nesbett 1983; Hass 1981). Przemawiają za tym obok obecnych spostrzeżeń, obserwacje przeprowadzone na szczurach z odciętym dopływem krwi do mózgu przez obie tętnice szyjne wewnętrzne i obie tętnice kręgowe (Kapuściński, Mossakowski — dane niepublikowane). Dodatkowo zwraca uwagę fakt osobniczego zróżnicowania wrażliwości na niedokrwienie, wyrażającego się różnicami stopnia uszkodzeń tkankowych u poszczególnych zwierząt, stwierdzonymi w naszym materiale. Próba ich skorelowania ze skutecznością zabiegów reanimacyjnych, wyrażającą się czasem powrotu czynności serca i oddechu, dała wynik ujemny.

Zastosowane warunki doświadczalne pozwoliły na prześledzenie ewolucji zmian patologicznych, postępujących w czasie pomimo normalizacji wykładników czynności bioelektrycznej mózgu oraz powrotu do normy podstawowych funkcji ustroju, umożliwiającego dowolnie długie przeżycie zwierząt bez stosowania jakichkolwiek środków leczniczych. To ostatnie spostrzeżenie potwierdza nasze poprzednie obserwacje w innych typach niedokrwienia mózgu (Kapuściński, Mossakowski 1983, 1985). Jednakże w poprzednich doświadczeniach, przy znacznie dłuższym okresie niedokrwienia i stale pogłębiających się uszkodzeniach mózgu dochodziło do wtórnego załamania się jego czynności i śmierci zwierząt. Obecny model pozwala na uzyskanie uszkodzeń strukturalnych w ośrodkowym układzie nerwowym przy równoczesnym utrzymaniu zwierząt przy życiu.

Nieprawidłowości tkankowe w mózgu, przypominające w swoim ogólnym wzorcu zmiany towarzyszące cardiac arrest (Brierley i wsp. 1971), wykazywały charakterystyczne sekwencje czasowe rozwoju i topografię. Ich pierwszą, wcześniejszą fazą były nieswoiste zwyrodnienia komórek nerwowych, a następną ich rozpad i zanik z towarzyszącym, umiarko-

wanym zresztą odczynem glejowym. Zmiany zwyrodnieniowe neuronów występowały również w drugiej „zanikowej” fazie uszkodzeń, zmieniała się jednak ich profil. Na ile bowiem we wczesnym okresie dominowały nieprawidłowości typu niedokrwiennego i homogenizacyjnego (te ostatnie stanowią zresztą jedynie lokalną odmianę zmian niedokrwiennych) oraz różnego typu tigroliza i zwyrodnienie wodniczkowe, na tyle w późnym utrzymywały się jedynie zmiany niedokrwienne i pojawiały się neurony z cechami tzw. schorzenia przewlekłego, zwanego również stwardnieniem komórek nerwowych. Taka kolejność zmian jest zjawiskiem znanym i potwierdzonym w licznych doświadczeniach prowadzonych na różnych modelach niedokrwienia mózgu u różnych zwierząt (Brown, Brierley 1966, 1973; Brierley i wsp. 1969).

Na podkreślenie zasługuje natomiast szereg odrębności naszego materiału.

Uszkodzenie niedokrwienne neuronów, zwane również zwyrodnieniem niedokrwiennym, uważane jest powszechnie za wczesne zjawisko patologiczne, pojawiające się już po upływie kilku godzin od zatrzymania lub ograniczenia mózgowego przepływu krwi. Są one poprzedzone drobnowodniczkowymi zmianami cytoplazmy komórek nerwowych, odpowiadającymi w obrazie mikroskopowo-elektronowym obrznięciu mitochondriów (Brierley i wsp. 1971; Brown, Brierley 1973). Obserwacje nasze, potwierdzając wczesny charakter zwyrodnienia ischemicznego, wskazują równocześnie na możliwość jego opóźnionego wystąpienia w zależności od zajętej struktury ośrodkowego układu nerwowego. W rogu Amona, formacji uznanej za szczególnie wrażliwą na niedokrwienie, pojawiały się one dopiero w 3—7 dnia po reanimacji. Nie obserwowano natomiast w ogóle mikrowakuolizacji cytoplazmy o typie opisanym przez Browna i Brierleya 1966, co może wiązać się ze stosunkowo późnym okresem najwcześniejszego pobierania materiału. Występowało natomiast, zresztą jako zjawisko przejściowe tylko i krótkotrwałe, wodniczkowe zwyrodnienie cytoplazmy neuronów uznane przez Agardha i wsp. (1980), i Kalimo i wsp. (1980) za typowe wyłącznie dla stanu hipoglikemii, odmienne od występujących jako następstwo niedokrwienia i niedotlenienia. W świetle naszych spostrzeżeń swoistość tej grupy uszkodzeń komórkowych wydaje się wątpliwa.

Topografia zmian patologicznych była na ogół typowa dla niedotlenienia i niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego. Dotyczyło to przede wszystkim rozkładu uszkodzeń w korze mózgu i mózdzku. Warto jednakże podkreślić, że typowość ta kształtowała się dopiero w miarę ewolucji procesu patologicznego. W najwcześniejszym okresie nieprawidłowości komórkowe, umiarkowane w swoim nasileniu, były uogólnione i z trudem udawało się uchwycić ich topograficzną predylekcję. Uszkodzenia neuronów w niektórych strukturach mózgowia, uznanych za selektywnie wrażliwe na niedokrwienie, wykazywały bardzo nieznacz-

ne nasilenie lub pojawiały się z kilkudniowym opóźnieniem, przeciwnie niż w okolicach traktowanych jako mniej wrażliwe. Gałka biała była rzadko i jedynie nieznacznie zajęta, w prążkowie zmiany dotyczyły bardziej dużych niż małych neuronów, we wzgórzu występowały one sporadycznie i ograniczone były wyłącznie do jego bocznych obszarów. Powtarzalne i częste uszkodzenia komórkowe obecne były natomiast w istocie czarnej, tworze siatkowatym pnia mózgu, przede wszystkim w jądrze olbrzymiokomórkowym i jądrach szwu oraz w jądrze grzbietowym nerwu błędnego. Ten rozkład zmian patologicznych może mieć oczywiście następstwa czynnościowe, nie dostrzeżone zresztą w naszych obserwacjach klinicznych.

W rozkładzie topograficznym nieprawidłowości strukturalnych, obok zróżnicowanej wrażliwości poszczególnych ugrupowań komórkowych, znajdowała swoje odzwierciedlenie patogenetyczna rola czynnika naczyniowego. Wyrażało się to przede wszystkim w częstym i powtarzalnym uszkodzeniu neuronów położonych w obszarze pogranicza unaczynienia dużych pni tętniczych mózgu, przede wszystkim tętnicy przedniej i środkowej. Okolice te zwane od czasu klasycznych opisów Zülcha (1953) obszarami ostatniej łąki charakteryzują się głębokimi zaburzeniami hemodynamicznymi w okresie restytucji krążenia krwi w mózgu (Mossakowski 1978; Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983).

Odrębnego komentarza wymagają uszkodzenia struktur rogu Amona. Były one obok nieprawidłowości w II i III warstwie kory nowej i w korze mózdzku najpospolitszym zjawiskiem patologicznym i dotyczyły wybiórczo komórek piramidowych sektora CA<sub>1</sub>, przy całkowicie niezmienionych jego pozostałych odcinkach. Na specjalną uwagę zasługuje ich opóźnione pojawianie się w stosunku do zmian w innych obszarach mózgowia, reprezentujące tzw. zjawisko dojrzewania procesu patologicznego, opisane w niedokrwieniu mózgu u chomików mongolskich (Klatzo 1975; Suzuki i wsp. 1983a; Mossakowski, Gadamski 1985). Według koncepcji Klatzo (1985) wybiórcza wrażliwość neuronów sektora CA<sub>1</sub> związana może być w mniejszym stopniu z wpływem samego niedokrwienia, a w większym z ich hiperaktywnością w okresie poniedokrwieniowym, zaobserwowaną przez Suzuki i wsp. (1983b). Prawdziwość tego poglądu w stosunku do zastosowanego przez nas modelu u szczurów wymaga oddzielnego potwierdzenia doświadczalnego, jakkolwiek sugerować ją może opóźnienie uszkodzeń komórkowych w sektorze CA<sub>1</sub> rogu Amona w stosunku do innych okolic mózgu.

Morfologiczne wykładniki obrzęku mózgu występowały jedynie we wczesnym okresie obserwacji. Ich lokalizacja ograniczona do istoty białej oraz charakter morfologiczny sugerują naczyniopochodny mechanizm patogenetyczny obrzęku (Klatzo 1967). Nie stwierdzono natomiast histopatologicznych znamion obrzęku cytotoksycznego, stanowiącego typowe następstwo niedokrwienia mózgu, występujące bądź jako faza wstępna, bądź



jako jedyna postać obrzęku (Klatzo 1975). Brak jego wykładników wyrażających się przede wszystkim drobnowodniczkowym zwyrodnieniem neuropilu może być znów związany ze stosunkowo późnym okresem naszych obserwacji i wymaga odrębnego wyjaśnienia. Na podkreślenie zasługuje natomiast zwieszność objawów obrzękowych, utrzymujących się zazwyczaj znacznie dłużej, zwłaszcza przy nie stosowaniu leczenia przeciwobrzękowego. Być może następstwem obrzęku były późne ogniska rozrzedzenia istoty białej i zblednięcia osłonek mielinowych wykazujące związek z większymi naczyniami żyłnymi. Umiarkowana reakcja glejowa stanowiła zjawisko późne towarzyszące wyraźnym już ubytkom neuronów. Na podkreślenie zasługuje jej mieszany astrocytarno-mikroglejowy charakter oraz kierunek ewolucji astrogleju do komórek Alzheimerera typu II. Możliwość tego charakteru przeobrażeń gleju gwiaździstego w warunkach głębokiego niedokrwienia mózgu podnoszona była między innymi przez Maślińską i Oniszczuk (1970). Wydaje się to zrozumiałe w świetle obrazu mikroskopowo-elektronowego nagich jąder i faktu, iż niedokrwieniu mózgu towarzyszy znaczne obrzmienie astrocytów (Mosakowski, Gajkowska 1984).

Umiarkowane nasilenie uszkodzeń tkankowych mózgowia oraz możliwość długotrwałego przeżycia zwierząt sprawiają, iż model doświadczalny opracowany przez Korpaczewa i wsp. (1982) jest dogodny nie tylko do badań neurofizjologicznych, lecz również do analizy mechanizmów i dynamiki encefalopatii niedokrwiennej.

#### MORPHOLOGICAL ABNORMALITIES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF RATS IN EXPERIMENTAL POSTRESUSCITATION PERIOD

##### Summary

The paper presents morphological analysis of the central nervous system of rats in which 10 min. clinical death was experimentally induced according to the method described by Korpaczew et al. (1982). Cardiac arrest resulting from compressing the cardiac vessels bundle lead in the course of 10—15 sec. to total cessation of the cerebral bioelectric activity. Its return was observed in  $\pm 32$  min after cardiac function was restored by external thoracic massage. Brain ischemia was followed by stop of spontaneous respiration. Animals were artificially ventilated but only after cardiac function recovery. Spontaneous respiration appeared in average 6 min. after the end of cardiac arrest. Resuscitated animals were kept in laboratory conditions for the period ranging from 24 h to 28 days and then they were sacrificed in groups by transcardiac perfusion with buffered 10% formaldehyde.

Light microscope studies revealed structural abnormalities of the central nervous system in all examined animals. They were moderate in their severity and showed great individual variability. Typical evolution of the pathological process was the most characteristic feature. In the earliest period of observations morphological tissue alterations were generalized and did not show topographic predilection. Nonspecific neuronal degeneration prevailed, among which cytoplasmic

microvacuolization and ischemic and homogeneous changes of neurons were most common. White matter structures showed slight rarefaction. In the later stage, including 3rd and 7th days following resuscitation neuronal changes showed some regional prevalency albeit to areas considered to be less vulnerable to cerebral ischemia. Neuronal degeneration prevailed, however, loss of nerve cells was also present. The latter was mostly limited to the cerebral neocortex, CA<sub>1</sub> sector of Ammon's horn, cerebellar cortex, striatum, substantia nigra and reticular formation of the brain stem, first of all its gigantocellular nuclei. Severe tissue alteration in the cortical borderline zones was very typical. General pattern of tissue impairment was changing after 7 days of survival. The number of neurons with degenerative features was remarkably reduced, neuronal loss in above mentioned localization was more accentuated, this being accompanied by glial proliferation. In the final period of observation foci of tissue breakdown in the white matter were present.

The observations revealed typical evolution of pathological process in various stages of postresuscitation period, pointing to the features of maturation phenomenon and the role of circulatory disturbances in the development of brain pathology. These observations indicate the applied experimental model to be well suited for further studies on the mechanism of postresuscitation encephalopathy.

ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ  
В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ  
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТРЕАНИМАЦИОННОМ СИНДРОМЕ.  
ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ.

Резюме

Провелась оценка морфологических изменений центральной нервной системы крыс, у которых по методу Корпачева и сошр. (1982), был вызван в эксперименте на 10 минут синдром клинической смерти. Задержка сердечной деятельности после компрессии сосудистого пучка вела к полному приостановлению биоэлектрической активности коры мозга в течение 10—15 сек. Возвращение биоэлектрической деятельности коры наблюдалась с 32 минуты после возвращения сердечной деятельности. Артифициальное дыхание проводилось до возвращения спонтанного дыхания, которое появлялось в среднем после 6 минут и 36 секунд. После ресусцитации животные были задержаны в вивариуме с 24 часов по 28 дней.

Патоморфологическое исследование показало структурные нарушения в центральной нервной системе всех исследованных животных. В общем эти нарушения были умеренно насильные и характеризовались отчетливой индивидуальной изменчивостью. Типическим феноменом была характеристическая эволюция патологического процесса. В ранний период патологические изменения были обобщенные, без отчетливой топографической склонности. Они характеризовались неспецифической дегенерацией нейронов, в которой преобладала микровакуолизация цитоплазма и ишемические и гомогенизационные изменения. В это время наблюдалось легкое разрежение белого вещества. В более поздний период, охватывающий 3 и 7 день после ресусцитации топографическая склонность структурных нарушений была более выразительная, хотя эти нарушения были найдены также в структурах признанных стойкими по отношению к ишемии. Все ещё преобладали дегенерационные изменения нейронов, хотя появлялось также уменьшение количества нервных клеток, локализованное, прежде всего, в новой коре мозга, в секторе CA<sub>1</sub> аммониева рога, в коре мозжечка, в полосатом теле, черном веществе и сетевидном образовании, прежде всего в гигантоцеллюлярном ядре.

Наблюдалась характерные значительные тканевые нарушения в смежных зонах кровоснабжения, связанных с большими артериальными стволами. Картина структурных нарушений изменялась с 7-ого дня после ресусцитации. Количество нервных клеток с признака-

ми дегенерации уменьшалось, увеличивались тканевые убытки в в/у локализации и появились показатели прогрессивной глиозной реакции. Эти изменения появились во время очередных недель наблюдения. В его конечном периоде обнаружались очаги распада в белом веществе.

Проведенные исследования показали характерную эволюцию патологического процесса в послересuscitaционном периоде, а также его созревание. Эти наблюдения показывают, что примененная экспериментальная модель пригодна для наблюдения послересuscitaционной энцефалопатии.

## PIŚMIENNICTWO

1. Aghardh C. D., Kalimo H., Olsson Y., Siesjö B. K.: Hypoglycemic brain injury. Metabolic and light microscopic findings in rat cerebral cortex during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1980, 50, 31—41.
2. Ames A., III, Nesbett F. B.: Pathophysiology of ischemic cell death: I. Time of onset of irreversible damage, importance of the different components of the ischemic insult. *Stroke*, 1983, 14, 219—226.
3. Brierley J. B., Adams J. H., Graham D. J., Simpson J. A.: Neocortical death after cardiac arrest. *Lancet*, 1971, 2, 560—565.
4. Brierley J. B., Brown A. W., Excell B. J., Meldrum B. S.: Brain damage in the rhesus monkey resulting from profound arterial hypotension. I. Its nature, distribution and general physiological correlates. *Brain Res.*, 1969, 13, 68—75.
5. Brierley J. B., Brown A. W., Meldrum B. S.: The nature and time course of neuronal alterations resulting from oligemia and hypoglycemia in the brain of *Macaca mulata*. *Brain Res.*, 1971, 25, 483—499.
6. Brown A. W., Brierley J. B.: Evidence for early anoxic-ischemic cell damage in the rat brain. *Experientia*, 1966, 22, 546—547.
7. Brown A. W., Brierley J. B.: The earliest alterations in the rat neurons after anoxia-ischemia. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1973, 23, 9—22.
8. Hass W. K.: Beyond cerebral blood flow metabolism and ischemic threshold. Examination of the role of calcium in the initiation of cerebral infarction. W: *Cerebral Vascular Disease*. Vol. 3. Red. J. S. Meyer, H. Lechner, M. Reivich, E. D. Ott, A. Aranibar. *Excerpta Med.* Amsterdam, 1981, 3—17.
9. Hossmann K.-A., Kobayashi K., Hossmann H., Kleihues O.: Recovery of cerebral energy metabolism after complete ischemia of one hour's duration. *Naturwissenschaften*, 1973, 60, 53—54.
10. Hossmann K.-A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
11. Kalimo H., Aghardh C. D., Olsson Y., Siesjö B. K.: Hypoglycemic brain injury. II. Electron microscopic findings in the rat cerebral cortical neurons during profound insulin-induced hypoglycemia and in the recovery period following glucose administration. *Acta Neuropath.*, Berl., 1980, 50, 43—52.
12. Kapuściński A.: Ocena wpływu okluzji tętnic szyjnych wspólnych i zmian ciśnienia tętniczego na czynność bioelektryczną mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 417—425.
13. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observations after 30 min bilateral ligation of the common carotid artery. *Advances in the Biosciences*. 43, *Stroke: Animal Models*. Red.: V. Stefanovich. Pergamon Press. Oxford, New York, Toronto, Sydney, Paris, Frankfurt, 1983, pp. 63—82.

14. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Próby farmakologicznego przeciwdziałania zmianom niedokrwinnym w mózgu królików po jego całkowitym niedokrwieniu. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 97—118.
15. Klatzo I.: Brain Edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—3.
16. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. W: *Nervous System. Vol. 1. The basic neuroscience*. Red. D. B. Tower. Raven Press, New York, 1975, 313—322.
17. Klatzo I.: Some of the pathophysiological aspects of cerebral ischemia. XVIII Danube Symposium for Neurological Sciences. Innsbruck, 17—19 October 1985. Abstr. p. 16.
18. Korpaczew W. G., Łysenkow S. P., Tiel Ł. Z.: Modelirowanie klinicznej śmierci i postreanimatornej choroby u krys. *Patolog. Fizjol. i Eksper. Terapia*, 1982, 3, 78—80.
19. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Amer. J. Path.* 1960, 36, 1—17.
20. Maślińska D., Oniszczyk J.: Uszkodzenie układu nerwowego płodu donoszonego w przypadku nagłej śmierci matki. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 417—422.
21. Mossakowski M. J.: Cerebral circulatory disturbances in various types of hypoxic conditions. W: *Advances in Neurology*. Red. J. Cervos-Navarro. Raven Press. New York 1978, 20, 161—171.
22. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia sektora CA<sub>1</sub> rogu Amona u chomików mongolskich. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 493—506.
23. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in Mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347—365.
24. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287—301.
25. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 53—66.
26. Pluta R.: Badanie możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. Praca doktorska. CMDiK PAN 1982.
27. Pluta R., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgu a czynność bioelektryczna. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 41—52.
28. Pluta R., Tołowa S., Kapuściński A.: Całkowite niedokrwienie mózgowia w wyniku ostrego nadciśnienia wewnątrzczaszkowego. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 365—384.
29. Sikorska M.: Metabolizm cyklicznego adenozy-3',5'-monofosforanu w mózgu szczura w warunkach niedokrwienia. Praca doktorska. CMDiK PAN, 1978.
30. Suzuki R., Yamaguchi T., Kirino T., Orzi F., Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. I. Blood-brain barrier, cerebral blood flow and local cerebral glucose utilization changes. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1983a, 60, 217—222.
31. Suzuki R., Yamaguchi T., Chou-Luh Li, Klatzo I.: The effect of 5-minute ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in spontaneous activity in cerebral cortex and CA<sub>1</sub> sector of hippocampus. *Acta Neuropath.*, (Berl.) 1983b, 60, 217—222.

32. Smiałek M., Sikorska M., Bicz W., Mossakowski M. J.: UDP glucose: glycogen- $\alpha$ -4-glucosyltransferase and  $\alpha$ -1,4-glucan: orthophosphateglucosyl-transferase activity in rat brain in experimental ischemia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1971, 19, 242—248.
33. Zülch K. J.: Neue Befunde und Deutungen aus der Gefäßpathologie des Hirns und Rückenmarks. *Zbl. Allg. Path.*, 1953, 90, 402.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii CMDiK PAN, ul. Dworkowa 3, 00-784 Warszawa.

MICHAŁ KRASZPULSKI, TERESA WRZOŁKOWA

MORPHOMETRIC EVALUATION  
OF BRAIN TERMINAL VESSELS.  
METHODOLOGICAL STUDIES \*

Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, Gdańsk

Terminal vessel morphometry is one of the methods of investigation which can be used for the indirect evaluation of exchange between blood and tissue surrounding blood vessels. The variety of morphometric methods applied and the increasing use of a wide range of automatic equipment has given rise to a number of methodological studies concerned with this subject (Weibel, Bolender 1973; Schmid-Schoenbein et al. 1977; Williams 1977; Bär 1980; Chen, Diana 1984; Pradal et al. 1984).

The use of automatic and semi-automatic methods has not completely eliminated the use of traditional methods. The studies of Schmid-Schoenbein et al. (1977) show that the coherent square lattice is used for morphometric measurements in spite of the present development of technology. An advantage of this method is the low cost and easy availability without the need for extra equipment. However, a more work and time input are required of the operators.

In our studies we evaluated morphometrically the terminal vessels of the motor, limbic and visual cortex of the cat and rat (Wrzołkowska et al. 1984) as well as the terminal vessels of particular nuclei of the cat amygdaloid body (Kraszpuski et al. 1985). In the former the coherent square lattice was used to collect data, with concentration mainly on vascularization density. The latter study was based on semiautomatic analysis using a computer. Here three other parameters were measured in addition to vascularization density; the ratio of vessel cross-sectional area to tissue cross-sectional area — representing the area of perfusion, the ratio of vessel circumference to tissue area — representing the area of exchange, and the mean cross-sectional area of a single terminal vessel of a section.

---

\* Supported by Polish Academy of Sciences, Grant 10.4.05.1.4.

In the present study we wanted to compare the results obtained with the use of both methods. Hence, the same samples of particular nuclei were used in both methods of study estimating the area of perfusion, the area of exchange, the vascularization density, the mean cross-sectional area of a single terminal vessel. Comparison of the results obtained by both methods should answer the question: can the two methods give comparable results?

#### MATERIAL AND METHODS

Studies were performed on material from 23 adult cats. The object of the studies were 96 specimens taken from 5 nuclei of the cat amygdaloid body (the lateral, basal, cortical, central and medial nuclei). From each individual 1—10 specimens were examined.

In both methods the projection microscope PICTOVAL (CARL ZEISS JENA) was used, analysing the image on the screen magnified  $700\times$ . Each time work was commenced, the magnification was controlled by measuring vertical and horizontal sections of the image of the Thomm chamber lattice placed in the microscope. The position of the screen or the microscope was altered if required. Each of the sections was in the same position for both methods of study. If a section was larger than the field of vision of the microscope the same fragment of the section was studied. All data were collected by the same operator.

The first method made use a square coherent lattice the parametres of which were as follows:  $d = 7 \text{ mm}$ ,  $P = 1225$ ,  $L = P \times d = 8575 \text{ mm}$ ,  $A = P \times d^2 = 60025 \text{ mm}^2$  ( $d$  — distance between two neighbouring lines on the lattice,  $P$  — number of points on the lattice,  $L$  — total length of the horizontal lines on the lattice,  $A$  — total surface area of the lattice). Taking into account the magnification of the microscope, the actual values of the lattice parametres for the sections studied were as follows:  $d = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $P = 1225$ ,  $L = 24500 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $A = 122500 \text{ }\mu\text{m}^2$ . The parametres and formulae used were selected according to Weibel, Bolender (1973) allowing a 5% risk of error.

The area of perfusion was calculated using the formula:  $n/P$  ( $n$  — number of points on the lattice within the circumference of the particular terminal vessels).

The area of exchange was calculated according to the formula:  $\pi \times I / 2 \times L$  ( $I$  — number of intersections of the test lines with the terminal vessel circumferences).

Vascularization density was calculated using the formula:  $Q/A$  ( $Q$  — number of terminal vessel sections in the area of the lattice).

The mean cross-sectional area of a single terminal vessel was calculated using the formula: 
$$\frac{\text{area of perfusion}}{\text{vascularization density}}$$

In the second method the WANG 2200 VP computer equipped with digitizer, graphic monitor and printer was used to analyse the microscope image. The microscopic image of the section was projected onto the digitizer (screen) connected to the computer. Outlining the image of the section on the screen resulted in its image being registered in the computer memory. On this basis the computer calculated cross-sectional areas and circumferences of the vessels and of the entire sections, the vascularization density and the relations between areas and circumferences.

The results obtained using both methods were compared by the paired Student's *t* test, assuming a significance level of  $p \leq 0,01$ . A comparison was made of the values obtained for parameters in particular nuclei and in all the analysed sections taken collectively.

## RESULTS

The obtained results are presented in Table 1 and Fig. 1. From these it can be seen that the calculated values of vascularization density and the area of perfusion do not vary significantly in the two methods used either for the particular nuclei or for the entire amygdaloid body. The values for the mean cross-sectional areas of single terminal vessels vary significantly only in the entire amygdaloid body. Values for the perfusion area reveal a significant difference depending on the method used in the medial nucleus and in the entire amygdaloid body.

In all cases where significant differences were found depending on the method used, higher values were obtained when using the coherent square lattice and lower ones when using the semi-automatic method.

For all the results standard deviations were lower in the semi-automatic method and higher when the coherent square lattice was used.

## DISCUSSION

The influence of various factors on the results obtained in morphometric studies is a subject often discussed in the literature. Publications stress the importance of: sampling (Weibel, Bolender 1973; Bär 1980), section preparation (Williams 1977; Pradal et al. 1984), microscopic magnification and photographic enlargement (Williams 1977; Pradal et al.

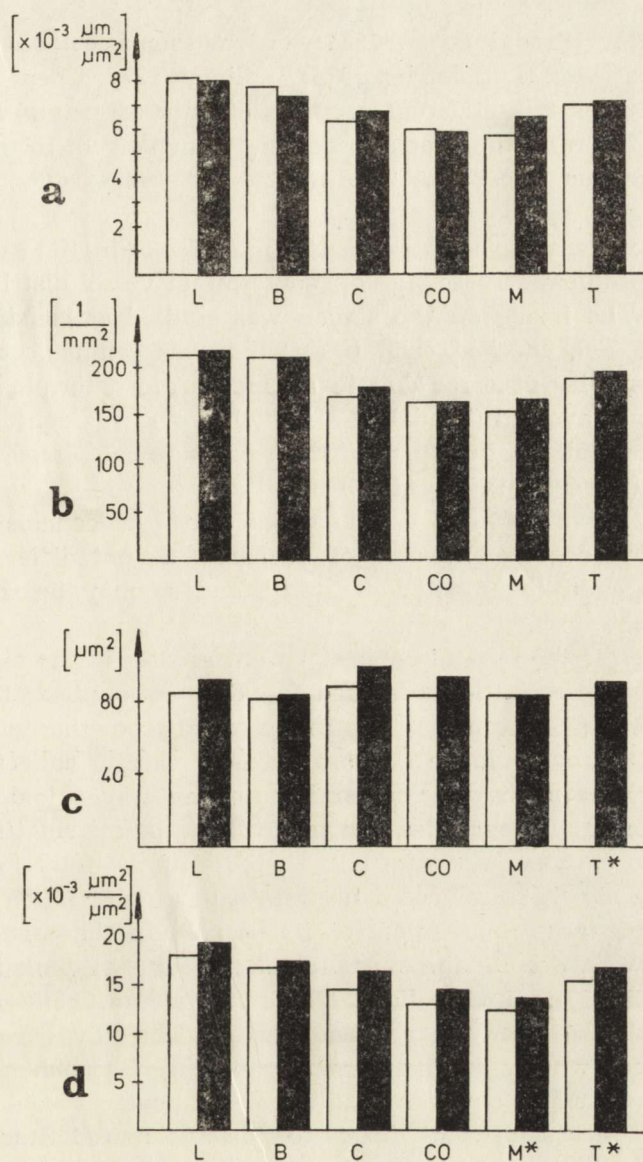


Table 1. Morphological measures of blood brain exchange in the cat amygdaloid body. Comparison of methods  
 Tabela 1. Morfologiczne wykładniki wymiany krew-mózg w ciele migdałowatym kota. Porównanie metod

Nucul Jadro	n	Area of exchange Powierzchnia wymiany $\bar{x} \pm SD [\times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2]$			Vascularization density Gęstość unaczynienia $\bar{x} \pm SD [1/\text{mm}^2]$			Mean area of a single vessel Średnia powierzchnia jednego naczynia $\bar{x} \pm SD [\mu\text{m}^2]$			Area of perfusion Powierzchnia przepływu $\bar{x} \pm SD [\times 10^{-3} \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2]$		
		computer	square lattice	t	computer	square lattice	t	computer	square lattice	t	computer	square lattice	t
		komputer	siatka kwadratowa		komputer	siatka kwadratowa		komputer	siatka kwadratowa		komputer	siatka kwadratowa	
Lateral Boczne	24	8.07±1.81	8.04±2.21	0.10	213±42	215±49	0.27	85±12	91±22	1.77	18.26±4.53	19.52±5.63	1.69
Basal Podstawne	28	7.70±1.55	7.34±1,75	1.75	210±42	210±47	0.08	81±15	84±16	1.01	17.01±3.90	17.65±4.40	1.13
Central Centralne	20	6.33±1.10	6.75±1.89	1.34	168±35	177±51	1.22	89±23	98±30	2.39	14.56±3.15	16.64±4.78	2.62
Cortical Korowe	12	6.05±0.85	5.92±1.28	0.40	163±32	163±47	0.14	83±23	94±32	1.69	13.19±2.87	14.58±4.00	1.61
Medial Przyśrodkowe	12	5.70±1.00	6.51±1.84	2.28	153±28	167±40	2.84	83±21	84±23	0.62	12.45±2.80	13.71±3.28	5.09*
Total Łącznie	96	7.05±1.66	7.11±1.96	0.48	189±45	193±51	1.36	84±18	90±24	3.50*	15.76±4.21	17.03±4.97	3.99*

a statistically significant difference in the paired Student's *t* test ( $p < 0,01$ )

\* — statystycznie istotna różnica w sparowanym teście *t* Studenta ( $p < 0,01$ )



*Fig. 1.* Graphic comparison of results obtained by two morphometric methods: a — area of exchange, b — vascularization density, c — mean area of a single vessel, d — area of perfusion. White diagrams — computer, black — square lattice. Nuclei of amygdaloid body: L — lateral, B — basal, C — central, CO — cortical, M — medial, T — total. \* — statistically significant difference in the paired Student's *t* test ( $p \leq 0.01$ )

*Ryc. 1.* Graficzne zestawienie wyników uzyskanych przy zastosowaniu dwóch różnych metod morfometrycznych: a — powierzchnia wymiany, b — gęstość unaczynienia, c — średnia powierzchnia jednego naczynia, d — powierzchnia przepływu. Białe diagramy — komputer, czarne — siatka kwadratowa. Jądra ciała migdałowatego: L — boczne, B — podstawne, C — centralne, CO — korowe, M — przyśrodkowe, T — łącznie. \* — różnica statystycznie znamiennej w sparowanym teście *t*-Studenta ( $p \leq 0,01$ )

1984), operator (Pradal et al. 1984) and mathematical analysis of the obtained data (Weibel, Bolender 1973; Williams 1977; Chen, Diana 1984).

In our studies two different methods of data collecting were compared. Hence, the remaining factors were left unchanged. In both methods the same sections were used to eliminate differences due to sectioning and sampling.

Sections were always placed in the microscope in the same position, so that the problem of possible uneven terminal vessel distribution could be ignored. The image on the screen was studied at constant magnification of  $\times 700$ , checked each time work was commenced, hence the greatest possibility of error due to an inaccurate determination of magnification was avoided (Pradal et al. 1984). Work was done by the same operator. The mathematical part of the work was calculated by the computer with the use of the formulae listed above.

The results we obtained enable us to draw the conclusion that the vascularization density and area of exchange do not differ statistically in dependence on the method of study, and so may be considered as comparable.

The values of the area of perfusion were greater in the method where the coherent square lattice was used for all cases studied. This suggests a systemic error — counting too many points on the vessel circumference. This error could be avoided by more careful collection of data. In two cases (the medial nucleus and the entire amygdaloid body) differences in the results exceeded the level of statistical significance when using the paired Student's *t* test. In the case of the total for the entire amygdaloid body the error could be the result of summation of systematic error for a large number of specimens (96). In the particular nuclei taken separately, despite the existence of the same systematic error, the small number of specimens did not result in a significant difference in the values obtained for the perfusion areas. The only exception is the medial nucleus where, despite a small number of specimens (12), large individual differences between results for particular specimens brought about statistically significant differences in the paired Student's *t* test.

A similar situation exists for the mean cross-sectional area of a single terminal vessel. The values of this parametre were calculated using the formula: 
$$\frac{\text{area of perfusion}}{\text{vascularization density}}$$
 and hence are greatly dependent on the values of the numerator. Consequently these results are also higher where the coherent square lattice was used. The differences are however, slightly smaller than before, with statistical significance existing only in the case of the entire amygdaloid body. The reason for this is probably again the small number of studied specimens in the particular nuclei.

Hence, we may conclude that the results of the studies made with

the use of both methods are comparable taking into account the possibility of a systemic error for the area of perfusion and the mean cross-sectional area of a single terminal vessel. As our studies using the coherent square lattice (Wrzołkowska et al. 1984) dealt with vascularization density, they may be considered as comparable with those performed by the semi-automatic method (Kraszpulski et al. 1985).

Lower values of the standard deviation in the semi-automatic method imply its greater precision. This is confirmed by other investigators (Weibel, Bolender 1973; Williams 1977). Weibel and Bolender consider the semi-automatic methods to be more precise than totally automatic ones, where in the case of poor contrast a machine can cause errors, whereas in the semi-automatic method a human operator can make the decisions. It does seem, however, that a sufficient quality of specimen preparation, combined with a new generation of equipment for automatic image analysis, should make possible avoidance of such errors, and open (Jordan et al. 1985) new possibilities for collecting and analysing data.

*ACKNOWLEDGEMENT:* The authors wish to thank Dr. Piotr Mierzewski for his advice concerning the statistics.

#### MORFOMETRYCZNA OCENA NACZYŃ TERMINALNYCH MÓZGU. BADANIA METODOLOGICZNE

##### Streszczenie

Porównano wyniki badań morfometrycznych naczyń terminalnych centralnego układu nerwowego, uzyskanych dwiema stosowanymi przez nas wcześniej metodami; w odniesieniu do 4 parametrów: powierzchni wymiany, gęstości unaczynienia, średniej powierzchni jednego naczynia i powierzchni przepływu. Celem pracy było stwierdzenie, czy wyniki prac prowadzonych tymi metodami są ze sobą porównywalne? Badania przeprowadzono na 96 wycinkach z 5 jąder ciała migdałowatego mózgu 23 kotów. Preparaty badano za pomocą: 1) siatki kwadratowej, 2) komputera WANG 2200 VP. Wyniki oceniano statystycznie sparowanym testem t Studenta.

Stwierdzono, że wyniki prac prowadzonych badanymi dwiema metodami analizy morfometrycznej są ze sobą porównywalne, przy uwzględnieniu poprawki na ewentualny błąd systematyczny. Odchylenie standardowe we wszystkich przypadkach było niższe przy użyciu komputera, wykazując nieco większą precyzję tej metody.

#### МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ТЕРМИНАЛЬНЫХ СОСУДОВ МОЗГА

##### Резюме

Были сравнены результаты морфометрических исследований терминальных сосудов центральной нервной системы, проведенных двумя методами употребляемыми раньше авторами. Авторы рассматривали 4 параметра: поверхность обмена, плотность васкуля-

ризации, среднюю поверхность одного сосуда и поверхность кровотока. Задачей исследований было подтверждение, сравниваемые ли результаты исследований, проведенных этими двумя методами. Исследования были проведены на 96 срезах из 5 ядер миндалевидного тела мозга 23 кошек. Препараты были исследованы при помощи: 1) квадратной сетки 2) компьютера WANG 2200VP. Результаты оценивались статистически парным тестом *t*-Studenta.

Проведенные исследования показали, что результаты проведенного двумя методами анализа, сравниваемые между собой, учитывая поправку возможной систематической ошибки. Стандартное отклонение было во всех случаях ниже при употреблении компьютера, указывая на немного большую точность этого метода.

#### REFERENCES

1. Bär T.: The vascular system of the cerebral cortex. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 1980, 59, 1—62.
2. Chen I. I. H., Diana J. N.: Mathematical modeling of capillary density. *J. Theor. Biol.*, 1984, 108, 221—225.
3. Jordan M. M., Perkins W. I., Young M. R., D'Arcy Hart P.: Computer graphics and numerical techniques in the measurement of movements within cells. *Med. Biol. Eng. Comput.*, 1985, 23, 48—54.
4. Kraszpułski M., Wrzołkowa T., Mierzewski P.: Blood-brain exchange in the cat amygdaloid body (morphometric studies). *Neuropat. Pol.*, 1985, 2, 255—263.
5. Pradal G., Lefranc G., Mollat F., Vo H., Riet A.: Quantitative Assessment of the Glandular Activity of Endocrine Cells of Gastrointestinal Mucosae by Computer-Assisted Analysis of Ultrastructural Images: Methodology. *Biol. Cell*, 1984, 50, 147—156.
6. Schmid-Schoenbein G. W., Zweifach B. W., Kovalcheck S.: The Application of Stereological Principles to Morphometry of the Microcirculation in Different Tissues. *Microvasc. Res.*, 1977, 14, 303—317.
7. Weibel E. R., Bolender R. P.: Stereological techniques for electron microscopic morphometry. In: *Principles and Techniques of Electron Microscopy*. Ed. M. A. Hayat. Van Nostrand Reinhold Company, New York, Cincinnati, Toronto, London, Melbourne 1973, 239—296.
8. Williams M. A.: Quantitative methods in biology. In: *Practical methods in electron microscopy*. Ed. A. M. Glauert. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford 1977, vol. 6, part 2.
9. Wrzołkowa T., Cofta T., Łukaszuk I.: Capillary blood vessels of the brain. I. Vascularization density of various parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 77—83.

Authors' address: Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, Dębinki 1 Str., 80-210 Gdańsk-Wrzeszcz.

TERESA WRZOŁKOWA, IRENA ŁUKASZYK

CAPILLARY VESSELS AND PERICAPILLARY AXON  
TERMINALS OF THE SUBFORNICAL ORGAN \*

Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, Gdańsk

Our previous studies of the relation between axon terminals and capillary vessels in the central nervous system were performed on areas with a blood-brain barrier (Łukaszyk et al. 1984; Łukaszyk 1985). The results of these studies may suggest the existence of some mutual functional dependence between the axon terminal and the terminal vessel wall.

In the brain there are a number of areas without a blood-brain barrier. Terminal vessels devoid of the barrier are often separated from the surrounding nervous tissue by a perivascular space. This space may contain various elements of connective tissue or nervous endings. The presence of this space may enable an easier examination of the relation between the nerve ending and the terminal vessel wall in the central nervous system.

The aim of the presented work was the study of the relation between the nerve endings and the terminal vessel wall in the subfornical organ, the capillary vessels of which are separated from the nervous tissue by a perivascular space. A number of studies were undertaken concerning aspects of the structure and function of this organ (Rohr 1966; Rohr 1966a; Czewżyk 1970; George, Penrose 1975; Simpson, Ronttenberg 1975; Tsuneki et al. 1978; Miselis 1981; Willoughby 1981).

MATERIAL AND METHODS

The subfornical organ of 4 cats and 6 rats, fixed by perfusion and prepared for study according to the previously published method was investigated (Łukaszyk et al. 1984). In two rats the subfornical organ was fixed by diffusion. The correct selection of a particular sample of the subfornical organ was verified in Epon semithin sections, after toluidine blue staining.

\* Supported by Polish Academy of Sciences, Grant 10.4.05.1.4.

## RESULTS

Electron microscopic studies revealed that the ultrastructure of the subfornical organ and in particular the capillary vessels are identical in the cat and rat and hence the results are presented jointly.

There exist two types of endothelium in the capillary vessels of the subfornical organ — endothelium forming a continuous layer (Figs 1, 4) and endothelium with fenestrations (Figs 2, 5). Both types of endothelium



*Fig. 1.* Part of capillary vessel lumen lined with continuous endothelium. A pericyte process (p) melts into the basement membrane adhering to the endothelium. The narrow perivascular space is filled with collagen fibres (c) and is limited by a continuous basement membrane (bm) that adheres to the glial processes.  $\times 39\ 000$

*Ryc. 1.* Fragment światła naczynia włosowatego wysłany śródbłonkiem o przebiegu ciągłym. W przylegającą do śródbłonka błonę podstawną wtopiona jest wypustka pericyta (p). Wąska przestrzeń okołonaczyniowa wypełniona jest włóknami kolagenowymi (c) i ograniczona linijsie ciągłą błoną podstawną (bm) przylegającą do wypustek komórek glejowych. Pow. 39 000  $\times$



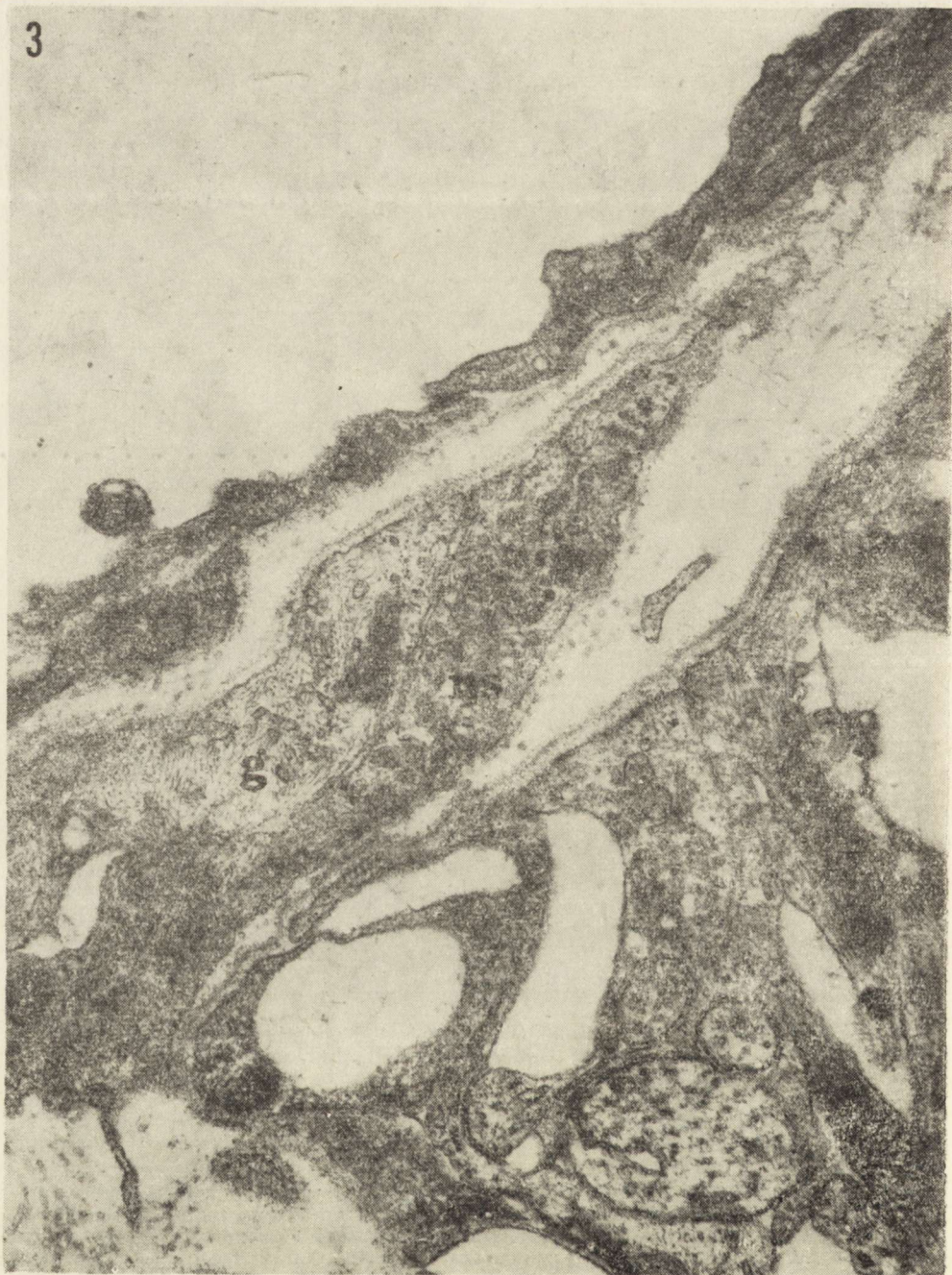
*Fig. 2.* Capillary vessel lumen lined with fenestrated endothelium. The fenestrations are sectioned at varying angles. Under the endothelium and parallel to it a glial cell process (g) surrounded by 3 basement membrane laminae. The perivascular space contains a connective tissue cell process and a few fibrils. Amongst the glial barrier processes there are two fibres containing neurosecretory granulations (ns) partly separated from the glia, covered by the external basement membrane.  
 × 39 000

*Ryc. 2.* Światło naczynia włosowatego wysłane śródbłonkiem z fenestracjami przeciętymi w różnych płaszczyznach. Pod śródbłonkiem równolegle przebiegająca, ograniczona trzema blaszkami błony podstawnej wypustka komórki glejowej (g). W przestrzeni okołonaczyniowej wypustka komórki tkanki łącznej i pojedyncze włókienka. Pomiędzy wypustkami bariery glejowej dwa włókna z ziarnistościami neurosekrecyjnymi (ns), częściowo odsunięte od gleju, pokryte błoną podstawną zewnętrzną. Pow. 39 000 ×

may be present within the same capillary vessel (Fig. 5), but terminal vessels with only a single type of endothelium predominate.

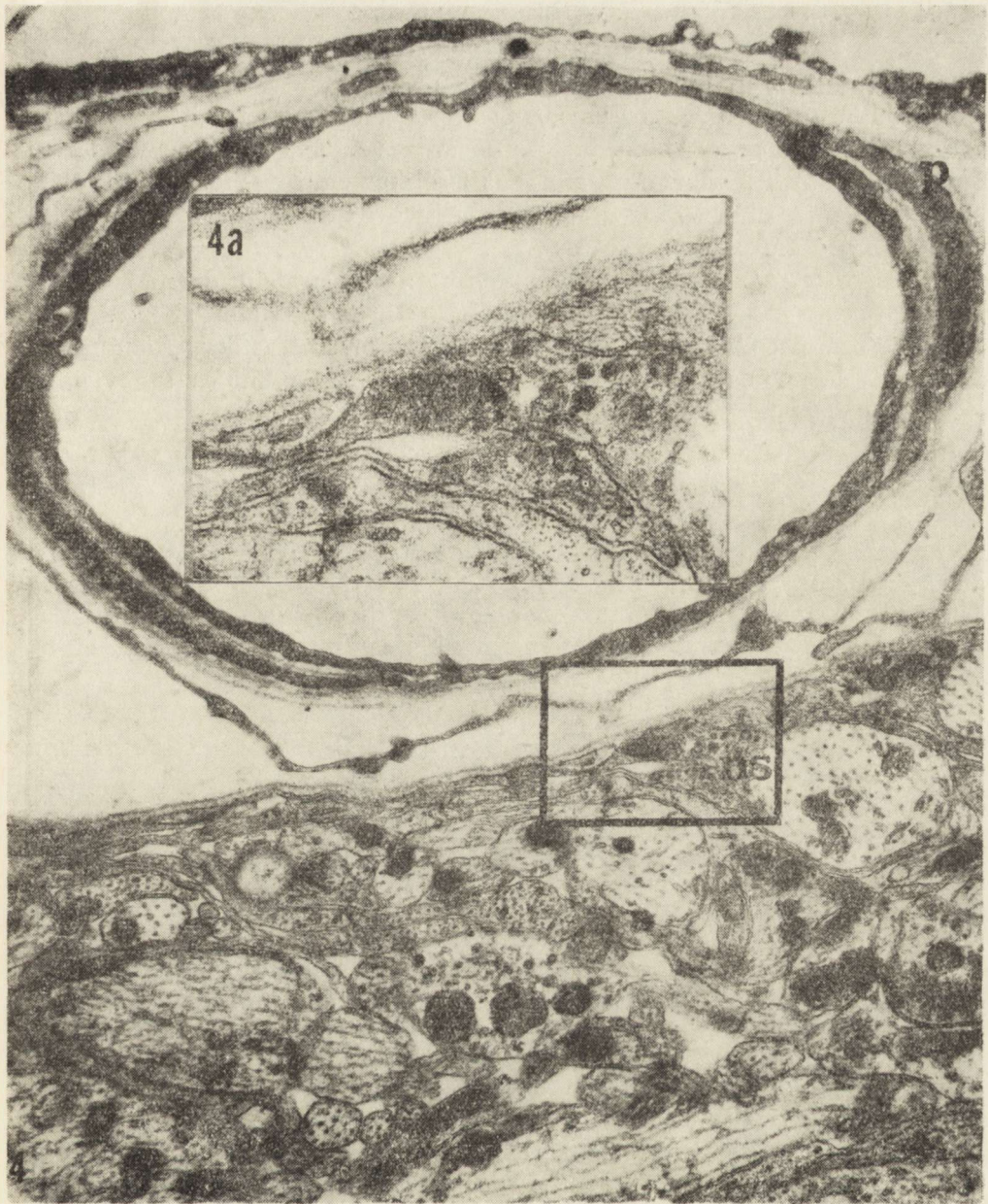
The basement membrane adhering closely to the endothelium and





*Fig. 3.* Process containing neurosecretory granules (ns) invaginates into the perivascular space together with an astroglial process (g). Both processes are surrounded by a common basement membrane.  $\times 38\ 000$

*Ryc. 3.* W przestrzeń okolonaczyniową wpuklają się wypustka z ziarnistościami neurosekrecyjnymi (ns) i przylegająca do niej wypustka astrogleju (g). Obie wypustki otoczone są wspólną błoną podstawną. Pow. 38 000  $\times$



*Fig. 4.* Capillary vessel made up of continuous endothelium and a wide pericyte process (p). The perivascular space is electron-transparent. The external basement membrane covers the closely packed adhering glial processes. Amongst them is a small process containing neurosecretory granulations (ns).  $\times 25\ 000$

*Ryc. 4.* Naczynie włosowate utworzone przez śródbłonek o przebiegu ciągłym i przez szeroką wypustkę pericyta (p). Przestrzeń okołonaczyniowa jest elektronowo przezroczysta. Błona podstawna zewnętrzna pokrywa ciasno ułożone, ściśle do siebie przylegające wypustki gleju. Wśród nich jest mała wypustka z ziarnistościami neurosekrecyjnymi (ns). Pow. 25 000  $\times$

*Fig. 4a.* Higher magnification of the process containing neurosecretory granules seen in Fig. 4.  $\times 56\ 000$

*Ryc. 4a.* Większe powiększenie wypustki z ziarnistościami neurosekrecyjnymi z Ryc. 4. Pow. 56 000  $\times$

pericyte separates the vessel from the perivascular space which varies in width. An external basement membrane, resting on glial processes separates this space from the nervous tissue. The perivascular space limited by two basement membranes is either empty (Fig. 4) or it contains collagen fibres (Figs 1, 3, 5), connective tissue cell processes (Fig. 2) and nerve terminals (Figs 3, 5, 6, 6a).

The external basement membrane forms a straight or meandering layer over the glial processes (Figs 1, 3). Below the external membrane nerve processes and terminals containing neurosecretory granules as well as terminals containing spherical or mixed granules are visible.



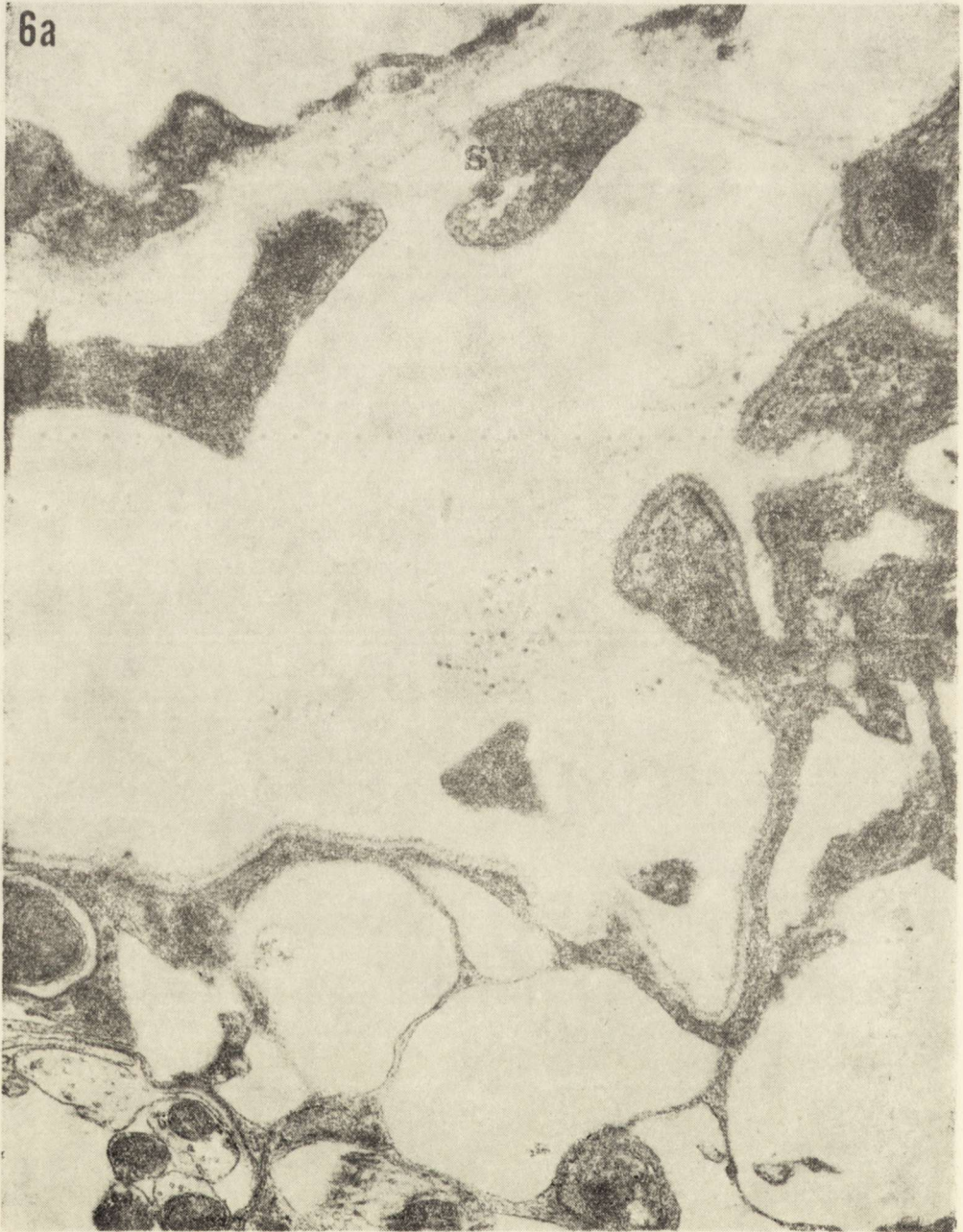
*Fig. 5.* In the perivascular space close to a capillary vessel a cell process with dense lamellar bodies and neurosecretory granules (ns).  $\times 55\,000$

*Ryc. 5.* W przestrzeni okołonaczyniowej skupienie gęstych ciał błoniastych i ziarnistości neurosekrecyjnych (ns). Pow. 55 000  $\times$



*Fig. 6.* Terminal vessel with continuous endothelium and a pericyte process (p) between the basement membrane lamellae. In the perivascular space between the internal and external basement membrane are accumulations of fibres and boutons with neurosecretory vesicles (ns), nerve terminals with spherical vesicles (sv) and collagen fibres (c).  $\times 39\ 000$

*Ryc. 6.* Naczynie terminalne o śródbłonku ciągłym z wypustką pericytu (p) pomiędzy blaszkami błony podstawnej. W szerokiej przestrzeni okołonaczyniowej, pomiędzy błoną podstawną wewnętrzną i zewnętrzną skupienie włókien i kolbek z pęcherzykami neurosekrecyjnymi (ns), zakończenie nerwowe z pęcherzykami kulistymi (sv) oraz włókna kolagenowe (c). Pow.  $39\ 000 \times$



*Fig. 6a.* Axon terminal with spherical vesicles (sv) in the perivascular space close to the capillary vessel wall.  $\times 34\,000$

*Ryc. 6a.* Zakończenie nerwowe z pęcherzykami kulistymi (sv) w przestrzeni okołonaczyniowej, tuż przy ścianie naczynia. Pow.  $34\,000 \times$

Squeezing in between the glial cells, limiting the perivascular space there are nerve processes and terminals containing large vesicles with a core of a varying degree of electronoptical density (Fig. 4) and few nerve terminals with spherical or flattened vesicles.

Occasionally the processes containing neurosecretory granules appear in between the glial cell processes, forming together a palisade barrier limiting the perivascular space (Figs 2, 4). Both in the cat and rat neurosecretory cell processes in the perivascular space occasionally appear in close contact with the capillary vessel wall (Figs 3, 5, 6). These processes are usually surrounded by the basement membrane. This gives the impression that the neurosecretory processes bulging from in between the glial cells towards the vessel wall carry the basement membrane with them. The phases of this gradual bulging are visible in Figs 2—5.

On few occasions the perivascular space was seen to contain synaptic boutons with spherical (Fig. 6, 6a) or mixed vesicles. These nerve terminals were without a basement membrane or only partly surrounded by it.

We did not observe any differences in the nerve terminals and elements of connective tissue in the perivascular space surrounding capillary vessels with a varying type of endothelium.

#### DISCUSSION

The results of electron microscope studies presented here confirm the observations of other authors that the subfornical organs of the cat and rat contain capillary vessels with a fenestrated endothelium as in an endocrine organ and with a continuous endothelium as in areas with a blood-brain barrier (Rohr 1966).

The perivascular space of the subfornical organ contains many functional nerve processes with neurosecretory granules. Their invagination from the neuropil into the perivascular space may be considered to be a phase of secretion. Moreover, nerve terminals with spherical and mixed vesicles can be found in the vicinity of capillary vessels in this organ. The two types of terminals in the perivascular space of the subfornical organ differ not only in their type, but also in their relation to the external basement membrane. The neurosecretory processes are always surrounded by the basement membrane, but the terminals with spherical and flattened vesicles have no membrane at all or the dense lamina of the basement membrane adheres to them only along a small length.

Nerve fibres innervating large vessels of the brain down to the precapillaries have their neurons in the superior cervical ganglion from which they enter the brain along the perivascular spaces (Itakura et al.

1977; Kobayashi et al. 1981; Madison et al. 1981). Nerve fibres deriving from the central nervous system functionally connected with vessels have their neurons e.g. in the locus coeruleus and reach the vessel wall through the neuropil (Rennels, Nelson 1975; Edvinsson et al. 1979).

The absence of a basement membrane surrounding the nerve terminals (Fig. 6) could suggest that the terminals in the perivascular space of the subfornical organ enter from the subarachnoid space, the same way as nerve processes innervating arterial vessels down to precapillaries. On the other hand, the possibility that the terminals enter from the neuropil, breaking the external basement membrane must be taken into account. This could be suggested by the fact, that a fragment of the basement membrane adheres to the nerve terminal (Fig. 6a).

The studies we performed previously on the relation between the axon terminals and the terminal vessel in the CNS were based on areas with a blood-brain barrier (Łukaszyk et al. 1984; Łukaszyk 1985). The results of these studies on the basis of morphometric evaluation suggested a possible functional relation between the nerve terminal and the terminal vessel. The present studies performed on an area of the CNS without a blood-brain barrier, possessing a distinct perivascular space seem to confirm this expectation concerning the innervation of the terminal vessels of the brain, regardless of where the terminals visible in the perivascular space are derived from.

#### NACZYNNIA WŁOSOWATE I ZAKOŃCZENIA NERWOWE OKOŁONACZYNIOWE NARZĄDU PODSKLEPIENIOWEGO

##### Streszczenie

W narządzie podsklepieniowym szczura i kota zbadano w mikroskopie elektronowym naczynia terminalne oraz zakończenia nerwowe okołonaczyniowe. Stwierdzono, że w przestrzeni okołonaczyniowej istnieją liczne wypustki z ziarnistościami neurosekrecyjnymi oraz pojedyncze zakończenia nerwowe z pęcherzykami synaptycznymi. Obecność tych ostatnich może sugerować relację czynnościową między zakończeniem nerwowym a ścianą naczynia terminalnego w narządzie podsklepieniowym szczura i kota.

#### КАПИЛЯРНЫЕ СОСУДЫ И ОКОЛОСОСУДИСТЫЕ НЕРВНЫЕ ОКОНЧАНИЯ ПОДСВОДНОГО ОРГАНА

##### Резюме

В электронной микроскопии были исследованы концевые сосуды и околососудистые нервные окончания подсводного органа крысы и кошки. Оказалось, что в околососудистом пространстве существуют многочисленные отростки с невросекреционными гранулами и отдельные нервные окончания с синаптическими пузырьками. Присутствие этих последних может внушать функциональную связь между нервным окончанием а стенкой терминального концевого сосуда в подсводном органе крысы и кошки.

## REFERENCES

1. Czewzyk T.: Zachowanie się niektórych odczynów histochemicznych w różnicującym się narządzie podsklepieniowym białego szczura. *Folia Morphol.*, 1970, 29, 527—537.
2. Edvinsson L., Hakansson C.-H., Högestätt E., Larsson B., Skärby T., von Mecklenburg C.: Possible innervation of cerebral capillaries in the rat? In: *Circulation Cerebrale*. Ed. A. Bés, G. Géraud. Toulouse 1979, 71—73.
3. George J. M., Penrose M.: Increased incorporation of (<sup>3</sup>H) uridine into RNA in the brain subfornical organ of ovariectomized mice. *Brain Res.*, 1975, 97, 167—170.
4. Itakura T., Yamamoto K., Tohyama M., Shimizu N.: Central dual innervation of arterioles and capillaries in the brain. *Stroke*, 1977, 8(3), 360—365.
5. Kobayashi S., Tsukahara S., Sugita K., Nagata T.: Adrenergic and Cholinergic Innervation of Rat Cerebral Arteries. *Histochemistry*, 1981, 70, 129—138.
6. Łukaszyk I., Wrzołkowa T., Cofta T.: Capillary blood vessels of the brain. II. Axon terminals of capillary vessels in different parts of the cat and rat cerebral cortex. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 85—96.
7. Łukaszyk I.: Capillary blood vessels of the brain. III. Terminal vessel ultra-structure in the nuclei of the cat amygdaloid body. *Morphometric studies*. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 265—272.
8. Madison R., Crutcher K. A., Davis J. N.: Sympathohippocampal neurons are inside the blood-brain barrier. *Brain Res.*, 1981, 213, 183—189.
9. Miselis R. R.: The efferent projections of the subfornical organ of the rat. *Brain Res.*, 1981, 230, 1—24.
10. Rennels M. L., Nelson F.: Capillary innervation in the mammalian central nervous system: an electron microscopic demonstration (1). *Am. J. Anat.*, 1975, 144(2), 233—241.
11. Rohr V. K.: Zum Feinbau des Subfornikal Organs der Katze. I. *Z. Zellforsch.*, 1966, 73, 246—271.
12. Rohr V. K.: Zum Feinbau des Subfornikal Organs der Katze. II. *Z. Zellforsch.*, 1966a, 75, 11—34.
13. Simpson J. B., Ronttenberg A.: Subfornical organ lesions reduce intravenous angiotensin-induced drinking. *Brain Res.*, 1975, 88, 154—161.
14. Tsuneki K., Takei Y., Kobayashi H.: Parenchymal fine structure of the subfornical organ in the Japanese Quail. *Cell Tiss. Res.*, 1978, 191, 405—419.
15. Willoughby J. O.: The pathophysiology of vegetative symptoms in migraine. *Lancet*, 1981, 29, 445—446.

Authors' address: Laboratory of Electron Microscopy, School of Medicine, 1, Dębinki Str., 80-210 Gdańsk-Wrzeszcz, Poland

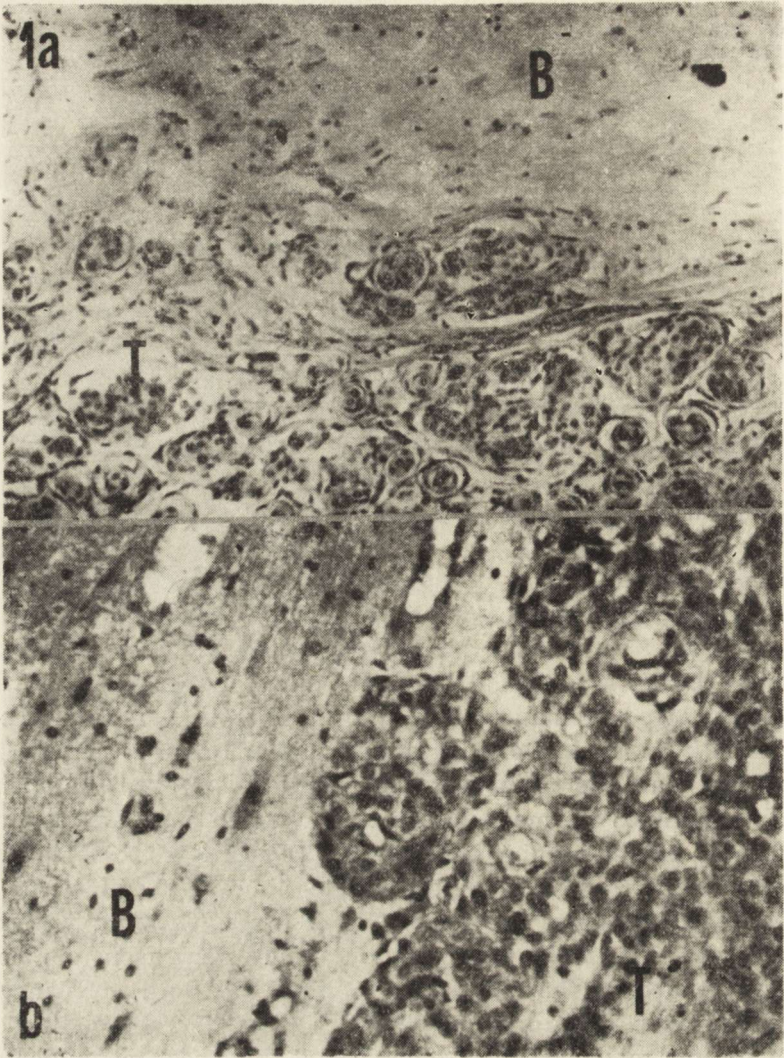


ADAM KUNICKI

RELATION OF MENINGIOMAS  
TO THEIR NEAREST ENVIRONMENT AND  
ITS SIGNIFICANCE FOR RECURRENCE OF THE TUMOR

Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa

From the surgical point of view it is very important to know the relation of the tumor surface to its nearest environment. Most meningiomas are well circumscribed tumors, respecting the anatomical borders of the brain, but it is not at all unusual, even for meningiomas without morphological signs of malignancy, to grow into and through the dura mater, partially or completely fill a venous sinus of the dura, infiltrate the overlying bone, the temporal muscle and seldom even the aponevrotic galea. Sometimes we meet with a tumor which after having broken the pia mater infiltrates the brain in the form of microscopic clusters of neoplastic cells (Fig. 1a,b). According to Simpson's estimation (1957), infiltration of brain takes place in 3.7% of cases. The relationship between meningioma and the overlying dura may vary from simple contiguity strengthened by the vessels coming from the dura and penetrating the tumor, to deep infiltration of the dura (Fig. 2). The relation of the tumor to the pia mater results from the fact that most meningiomas are situated between the dura mater and the arachnoidea, that is subarachnoidally, giving in consequence immediate contact of the surface of the tumor with the pia mater. From case to case this surface relation differs in many respects. In some cases a thin mesenchymal layer of the pia mater is the only structure separating the surface of the brain from the tumor (Fig. 3a,b). In other cases there exists between the tumor and the brain a mesenchymal lamellar structure of different thickness (Figs 4—8). The pia mater incorporated in this structure has lost appearance of a separate unit. It is only the pia mater or the pia-arachnoidea which can be responsible for the origin of this structure composed of reticulin, collagenised fibers, blood vessels and occasionally infiltrated with plasma cells and lymphocyte (Fig. 9). Owing to the increased tissue pressure in the vicinity of the tumor some degree of ischemia takes place, sti-



*Fig. 1a.* Microscopic clusters of neoplastic cells infiltrating the brain B. T — tumor. H—E.  $\times 200$ . *Fig. 1b.* Microscopic clusters of neoplastic cells invaginated into the brain (infiltration?) T — tumor, B — brain. H—E.  $\times 400$

*Ryc. 1a.* Mikroskopowe gniazda komórek nowotworowych naciekające mózg (B). T — guz. H—E. Pow. 200  $\times$ . *Ryc. 1b.* Domózgowe wgłobienie komórek nowotworowych (infiltracja?). B — mózg, T — guz. H—E. Pow. 400  $\times$

mulating proliferation of the connective tissue. In some places firm connections of the lamellar structure with the tumor form bridges, which enable penetration of the blood vessels from the pia to the tumor (Fig. 10). In this way the tumor provided with blood mainly through the system of the external carotid artery receives a supplementary blood supply from branches of the internal carotid artery. In some places the



Fig. 2. Attachment of the tumor. Infiltration of the dura. H—E.  $\times 100$   
 Ryc. 2. Przyczep guza, naciek opony twardej. H—E. Pow. 100  $\times$

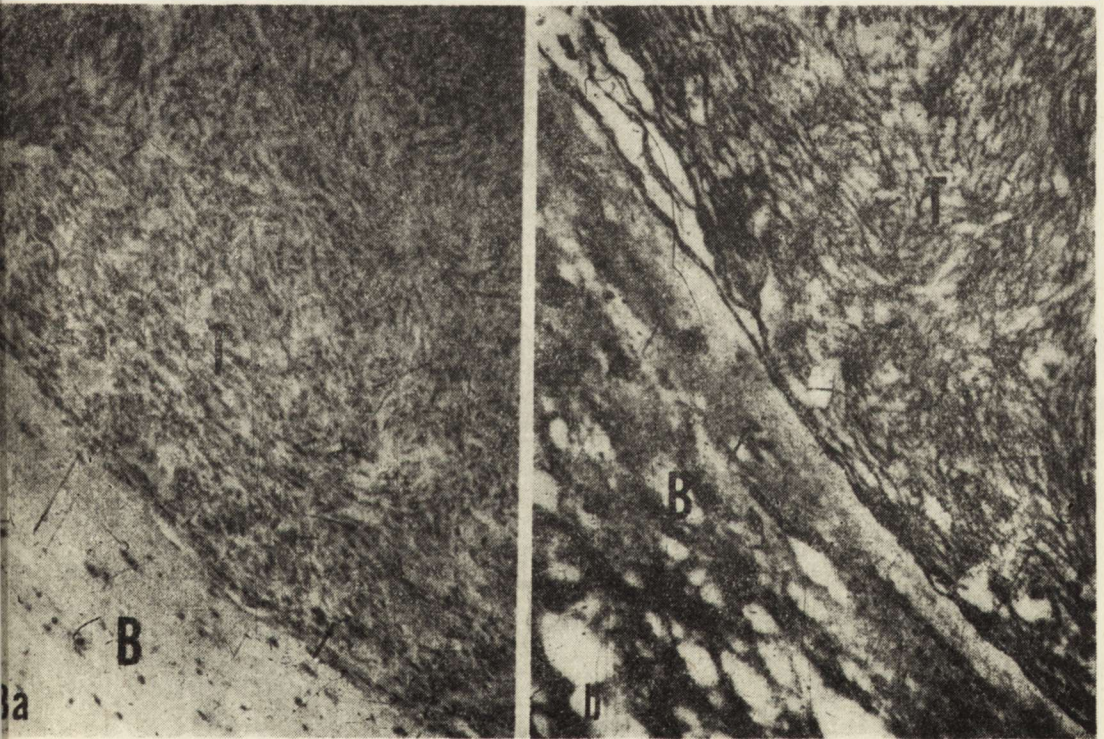


Fig. 3. The tumor (T) is separated from the brain (B) by the pia mater only.  
 Fig. 3a. H—E.  $\times 200$ . Fig. 3b. Perdrau.  $\times 200$

Ryc. 3. Tylko opona miękka odgradza guza (T) od mózgu (B). Ryc. 3a. H—E. Pow. 200  $\times$ . Ryc. 3b. Impregnacja met. Perdraua. Pow. 200  $\times$



*Fig. 4.* Mesenchymal lamellar structure between the tumor (T) and the brain (B).  
Perdrau.  $\times 200$

*Ryc. 4.* Przegroda łącznotkankowa pomiędzy guzem (T) a mózgiem (B). Perdrau.  
Pow.  $200 \times$

*Fig. 5.* Mesenchymal structure separating the brain (B) from the tumor (T). Per-  
drau.  $\times 200$

*Ryc. 5.* Przegroda łącznotkankowa odgradza mózg (B) od guza (T) Perdrau. Pow.  
 $200 \times$

surface of the tumor is so tightly connected with the above described lamellar structure that during removal of the tumor microscopical particles of the brain may be torn away and can be found on the surface of the removed tumor (Figs 4—8). It is easy to imagine that also tumor



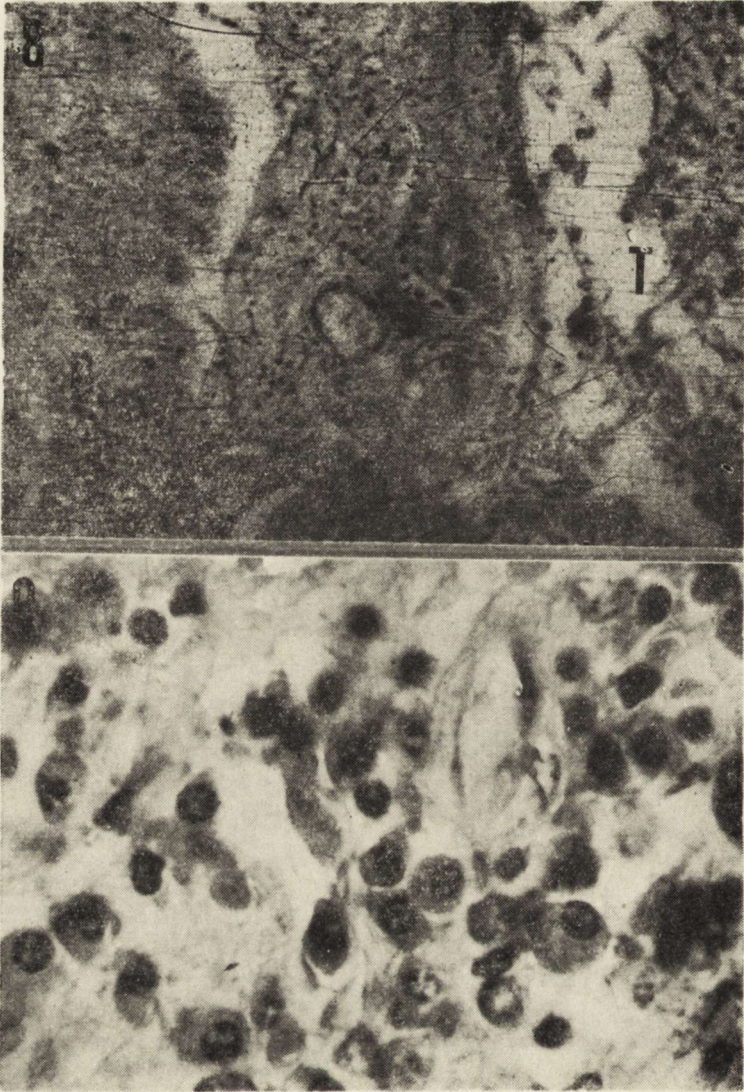
*Fig. 6.* Mesenchymal structure separating the brain (B) from tumor (T) is infiltrated with lymphatic cells. H—E.  $\times 200$

*Ryc. 6.* Drobnokomórkowy naciek przegrody łącznotkankowej oddzielającej guz (T) od mózgu (B). H—E. Pow. 200  $\times$

*Fig. 7.* Broad structure separating the brain (B) from the tumor (T) infiltrated profusely with small cells. H—E.  $\times 200$

*Ryc. 7.* Szerokie pasmo łącznotkankowe pomiędzy guzem (T) a mózgiem (B) obficie nacieczone drobnymi komórkami. H—E. Pow. 200  $\times$

particles can be detached from the tumor mass and remain in connection with the brain representing a potential source of recurrence. The mesenchymal structure separating the brain from the tumor is usually regarded as the capsule of the tumor and the tumor itself is considered to be encapsulated. In connection with the problem of encapsulation the



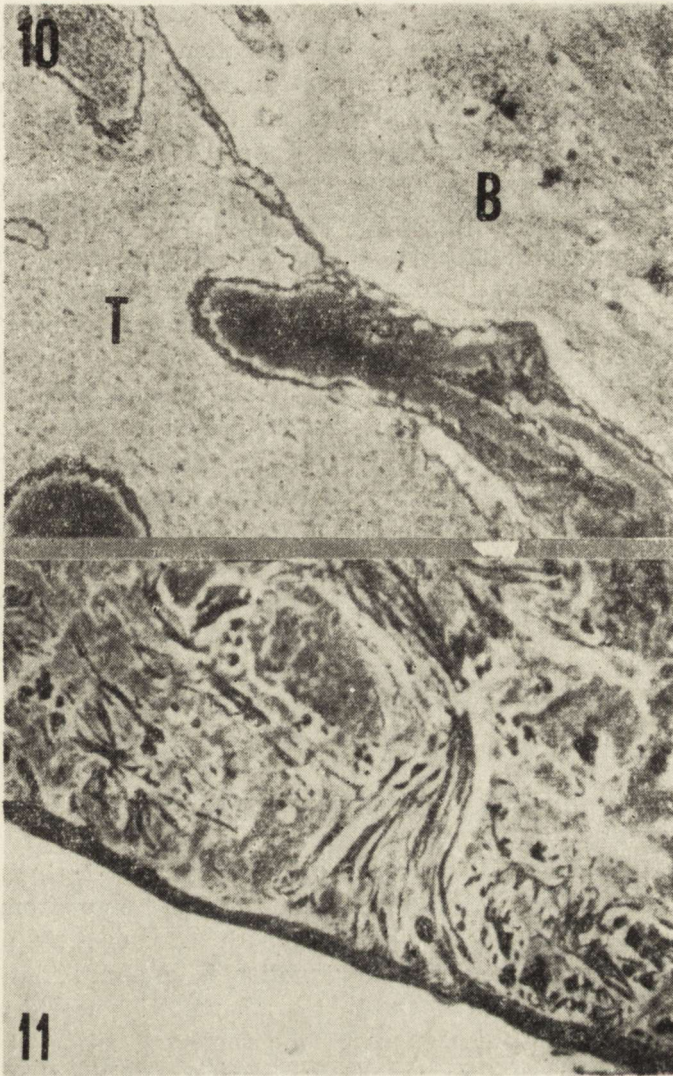
*Fig. 8.* Broad brain-tumor gate abounding in blood vessels and infiltrated with small cells. T — tumor, B — brain. H—E.  $\times 200$

*Ryc. 8.* Szeroka przegroda między guzem (T) a mózgiem (B) zawiera liczne naczynia i naciek drobnokomórkowy. H—E. Pow.  $200 \times$

*Fig. 9.* Infiltration of the brain-tumor gate with lymphoid and plasma cells. H—E.  $\times 600$

*Ryc. 9.* Przegroda między guzem a mózgiem nacieczona komórkami limfatycznymi i plazmatycznymi. H—E. Pow.  $600 \times$

question of origin and biological significance of this “capsule” arises. Is it the product of the tumor itself or does it represent a defense reaction of the brain against the tumor? In the literature of the subject I was able to find two opinions concerning this question. Zülch (1967) deals with the question in the following statement: “Die Meningiomen haben



*Fig. 10.* Blood vessels coming from the pia mater penetrate the tumor (T). B — brain. Perdrau.  $\times 200$

*Ryc. 10.* Naczynia krwionośne z opony miękkiej wnikają do nowotworu (T). B — mózg. H—E. Pow. 200  $\times$

*Fig. 11.* Capsule of meningioma, which after all probability had developed between the external and internal lamina of the dura. Perdrau.  $\times 200$

*Ryc. 11.* Torebka oponiaka, który prawdopodobnie rozwinął się pomiędzy zewnętrzną i wewnętrzną blaszką opony twardej. Perdrau. Pow. 200  $\times$

ein verdrängendes Wachstum gegen neuroektodermale Gewebe. Das verdrängende Wachstum ist auf die Bildung einer mehr oder minder dicken Kapsel zurückzuführen. Sie ist verschieden dick, kann in der Dicke und Bau der Dura ähneln während sie bei gelapten Tumoren nicht viel mehr als die Dicke der Pia-arachnoidea zeigt und oft von dieser nicht zu unter-

scheiden ist". (Meningiomas are tumors growing expansively against neuroectodermal structures. It is the formation of a capsule of various thickness which is responsible for the expansive growth. The capsule is of various thickness and is similar to the dura mater. The thickness of the capsule of lobulated tumors can be more or less like that of the pia-arachnoidea and very often cannot be distinguished from it) — nothing about the origin and biological significance of this structure. Noetzel (1951) distinguishes tumors which had developed intradurally, that is between the internal and external lamina of the dura. This rare kind of tumor is actually encapsulated and its surface is completely smooth (Fig. 11). In the second group of tumors presented by Notzel (1951) this kind of capsule is absent. "Die weichen Häute sind hierbei mehr oder minder stark ausgeprägt in die Randzone des Tumors einbezogen" (Pia-arachnoidea is in these cases more or less strongly developed and incorporated in the superficial part of the tumor). Both quoted authors do not touch the problem of origin and biological significance of the mesenchymal structure separating the tumor from the brain. I am inclined to regard this structure as the result of a defense reaction provided by proliferation of mesenchymal tissue of the pia mater or pia-arachnoidea. As all defense reactions of the body this reaction is also variable in intensity, this being reflected in a different thickness of the mesenchymal structure separating the tumor from the brain. The occasionally observed infiltration of this brain-tumor gate by plasma and lymphoidal cells is in favor of regarding the capsule as part of the defense reaction and expression of the tumor-host relation (Fig. 9).

What is the clinical significance of morphological features presented here? The mesenchymal septum separating the tumor from the brain forms an anatomical junction between both structures. It was already mentioned that in some places the junction is so tight, that during the removal of the tumor it happens that brain particles are torn away and can be discovered on the surface of the removed tumor. It is possible that in a similar way tumor particles may remain in the bed of the tumor and become a potential source of recurrence. This is made easier by the roughness, numerous fissures and grooves present on the surface of the tumor. Small tumor remnants in the attachment or in the bed of the tumor after s.c. radical operation represent a microscopical collection of neoplastic cells unrecognisable with the unaided eye. The fate of these cells depends very much on their number and quality. Indispensable for regrowth of the tumor is the presence of cyclic cells capable of dividing and local conditions favourable for their proliferation (blood supply). There is also a general conjecture on the importance of the defense reaction against tumors, which can be responsible for the fate of these cells. The antigenicity of brain tumors is weak and can be effective against a small number of cells only. Because of insufficiency



of the immune response to destroy a greater tumor mass, the first step in the treatment of the tumor should be diminution of the number of neoplastic cells as much as possible. If the tumor infiltrates the nervous tissue like all gliomas do, this can be achieved by extensive resection of the infiltrated tissue. In these cases eventual remnants of neoplastic cells remain in the tissue of the involved organ. The situation is different with paracerebral tumors, presenting expansive growth. In these cases even, if in the operators opinion, the tumor was completely removed, we ought to take into consideration the possibility of existence of microscopical remnants of neoplastic cells in the attachment or in the bed of the tumor. These cells can be killed by immunological forces or can be lost because of local unfavourable life conditions (blood supply). In these cases recurrence does not occur. If the immune reaction is insufficient for killing the microscopical cell clusters, the cells have the ability of dividing and the local conditions are favourable for their development, the possibility of recurrence is very high. Keeping this in mind it could be logical for safety reasons to stimulate the immune response in all cases in which, according to clinical experiences and follow-up studies, recurrence can be expected even if the surgeon expresses the opinion that the tumor has been completely removed. Stimulation of immunity can be done with BCG or other means recommended by oncology, without doing any harm to the patient, but with the prospect of preventing recurrence of the tumor.

#### STOSUNEK OPONIAKÓW DO NAJBLIŻSZEGO OTOCZENIA ORAZ JEGO ZNACZENIE DLA POWSTAWANIA ODROSTÓW GUZA

##### Streszczenie

Większość oponiaków, rozwijając się podpajęczynówkowo na dużej przestrzeni, styka się z oponą naczyniową. Powierzchnia guza bywa odgraniczona od mózgu cienką blaszką opony naczyniowej lub wielowarstwową błoną składającą się z włókien retikuliny, skolegenizowanych oraz z naczyń. Błona ta tworzy zespolenie powierzchni guza z powierzchnią mózgu, a wnikające z niej naczynia krwionośne do guza dostarczają mu dodatkowego ukrwienia z tętnicy szyjnej wewnętrznej. Miejscami silne zespolenie guza z błoną odgraniczającą go od mózgu sprawia, że w czasie usuwania guza mikroskopowe cząstki guza odrywają się i mogą być odnalezione na powierzchni usuniętego guza. Jest możliwe, że w podobny sposób mogą się odrywać mikroskopowe cząstki guza i pozostając w łączności z mózgiem stają się przyczyną nawrotu. Mikroskopowych rozmiarów pozostałości doszczętnie usuniętego guza w ścianie zatoki żyłnej, w łożysku guza, w przyczepie lub w tkance narządu dają początek nawrotowi, jeśli wśród pozostałych komórek jest dostateczna liczba komórek zdolnych do rozplemu, jeśli warunki miejscowe (ukrwienie) są dla rozplemu dostateczne i jeżeli odporność przeciwnowotworowa jest słaba. Mając to na uwadze proponuje się, aby tzw. doszczętnie usunięcie guza uzupełnić wzmacnianiem odporności za pomocą BCG lub innych środków zalecanych przez onkologię celem zniszczenia mikroskopowych gniazd komórek nowotworowych, które umknęły działalności operatora.

## ОТНОШЕНИЕ МЕНИНГИОМ К БЛИЖАЙШЕЙ СРЕДЕ И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ В ВОЗНИКНОВЕНИИ РЕЦИДИВА ОПУХОЛИ

### Резюме

Большинство менингиом, развиваясь в подпаутинном пространстве, на большой поверхности контактируется с сосудистой оболочкой. Поверхность опухоли отделена от мозга тонким слоем сосудистой оболочки или многослойной пленкой, составленной из ретикулиновых и коллагеновых волокон, а также сосудов. Эта пленка соединяет поверхность опухоли с поверхностью мозга, а благодаря её кровеносным сосудам пенетрирующим в опухоль, опухоль получает добавочное кровоснабжение из системы внутренней сонной артерии. В некоторых местах крепкое соединение опухоли с пленкой отделяющей её от мозга, причиняется к тому, что во время удаления опухоли, микроскопические части опухоли отрываются. Можно их найти на поверхности удаленной опухоли. Возможно, что подобным образом могут оторваться микроскопические части менингиомы, которые, соединенные с мозгом, являются причиной рецидива опухоли. Микроскопические остатки удаленной опухоли в стенке венозного синуса, в ложе опухоли, в прикреплении или в ткани органа являются источником рецидива, если среди оставшихся клеток достаточное количество способных к размножению клеток, если местные условия (кровоснабжение) для размножения достаточные и если иммунитет против опухоли слабый. Принимая это во внимание, рекомендуется, чтобы после радикального удаления опухоли укреплять иммунитет при употреблении BCG или других средств указанных онкологией, чтобы разрушить микроскопические группы клеток, которые не были подвергнуты действию оператора.

### REFERENCES

1. Noetzel H.: Über Meningiome und ihre unterschiedlichen Auswirkungen am Gehirn. Beitr. Path. Anat. 1951, 111, 391.
2. Zülch K. J.: Handbuch der Neurochirurgie. Band 3, Springer Verl., Berlin, 1967.

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

ELŻBIETA KIDA<sup>1</sup>, KRYSZYNA RENKAWEK<sup>1</sup>, EWA JOACHIMOWICZ<sup>2</sup>

## VASCULAR ABNORMALITIES IN THE CENTRAL FORM OF NEUROFIBROMATOSIS

<sup>1</sup> Medical Research Center Polish Academy of Sciences, Warszawa, <sup>2</sup> II Neurological Clinic, School of Medicine, Warszawa

Neurofibromatosis (NF) von Recklinghausen's disease is a disorder involving the central and peripheral nervous system in a wide variety of ways. Neuropathological manifestations of the disease generally result from proliferative changes of neural supporting structures representing neoplasia, hyperplasia and dysplasia. In most cases in the nervous system there were tumors like acoustic schwannoma, meningioma and optic glioma as well as hamartomatous lesions and developmental anomalies (Rubinstein et al. 1981).

In the broad spectrum of pathological changes described in NF, vascular lesions have been also included. However, the involvement of systemic vasculature has been well documented (Reubi 1945; Feyrter 1949; Salyer, Salyer 1974), vascular abnormalities in the nervous system were sporadically described (Głuszczyński 1956; Pearce 1967; Tomsick et al. 1976).

The presented case of NF showed widespread structural alterations of the blood vessels which predominated in the neuropathological picture reflecting the clinical course of the disease.

### CASE REPORT

A 72-year-old man was admitted to the Neurological Clinic (Head: prof. H. Jędrzejowska) because of slowly progressing weakness of the lower extremities and urinary dysfunction. First symptoms of the disease appeared about one year before hospitalization. He had no other noticeable disease except transient hyperglycemia regulated by oral drugs, and chronic bronchitis. The family history was negative.

On general examination multiple, small, sometimes fused hyperpigmented nodules and café-au-lait spots on the skin of the trunk and all extremities were found.

Neurological examination revealed spastic paresis of the lower extremities. The upper extremities, cranial nerves and all types of sensation were intact. Blood pressure was normal, routine laboratory tests showed no abnormalities. Cerebro-spinal fluid (CSF) revealed protein content elevated to 85 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> without cytosis. X-ray examination of the vertebral column showed advanced spondyloarthrosis and spina bifida of S<sub>1</sub>.

The clinical picture and CSF examination suggested a tumor in the spinal cord of the patient suffering from von Recklinghausen's disease, although myelography did not reveal any pathological structure.

One year later transient motor aphasia, retention of urine and severe progress of disorders in the neurological state appeared. The right lower extremity became plegic and left deeply paretic. Right knee jerk, both ankle and right plantar reflexes were absent. Touch, pain and position sensation were diminished in the right foot. CSF examination revealed 93 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> of protein, cytosis 5. EEG showed moderate generalized abnormalities, slightly accentuated in the left hemisphere. During the next 5 months severe cardiac insufficiency and massive swelling of the lower extremities developed. Neurological examination disclosed paraplegy of the lower extremities, loss of abdominal reflexes, absence of both ankle and plantar reflexes and decrease of all types of sensation below the umbilical level. In the CSF there was 121 mg<sup>0</sup>/<sub>0</sub> of protein and cytosis 2.

In the final period of the disease pneumonia and deep bedsores appeared. The patient died 3 years from the onset of the disease, clinically diagnosed as paraplegy in the course of Recklinghausen's disease.

General autopsy revealed generalized, advanced arteriosclerosis and typical changes of neurofibromatosis.

#### NEUROPATHOLOGICAL EXAMINATION

The brain weight after formalin fixation was 1410 g. The meninges were unchanged except for focal thickenings. There were advanced atheromatic changes of the arteries of the base of the brain.

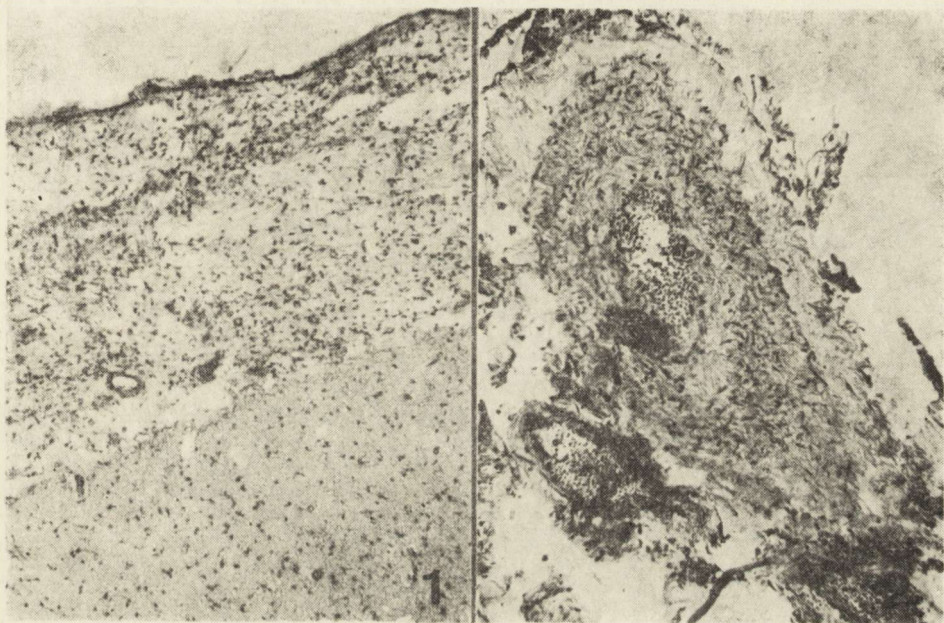
Coronal sections of the brain were commonplace. Examination of the spinal cord revealed conglomerates of thin, tortuous vessels situated in the subarachnoid space of the thoracic level. On transversal sections mid-thoracic segments exhibited obliteration of the normal architecture and tissue softening.

Paraffin sections of the frontal, temporal, and parietal cortex, basal ganglia, midbrain, pons, medulla, cerebellum and from the cervical, thoracic and lumbar regions of the spinal cord were stained with hematoxylin and eosin (H-E), cresyl violet and by the van Gieson, PAS, Holzer and Klüver-Barrera methods.

Microscopical findings. The leptomeninges showed in some areas pro-

minent, multilayer structure of proliferating collagen fibres and fibroblasts (Fig. 1). All the meningeal vessels were patent, although some of them exhibited distinct fibrosis and intensive proliferation of spindle cells throughout the vessel wall (Fig. 2).

Slide examination of the brain hemisphere, cerebellum, and brain stem did not reveal any major pathological changes. Some of the vessels showed hyalinization or proliferation of the endothelium occluding their lumen. Perivascular spaces were often enlarged containing single glial or mononuclear cells. Around the vessels and in the adjacent tissue numerous amyloids bodies and fibrillar gliosis were seen.



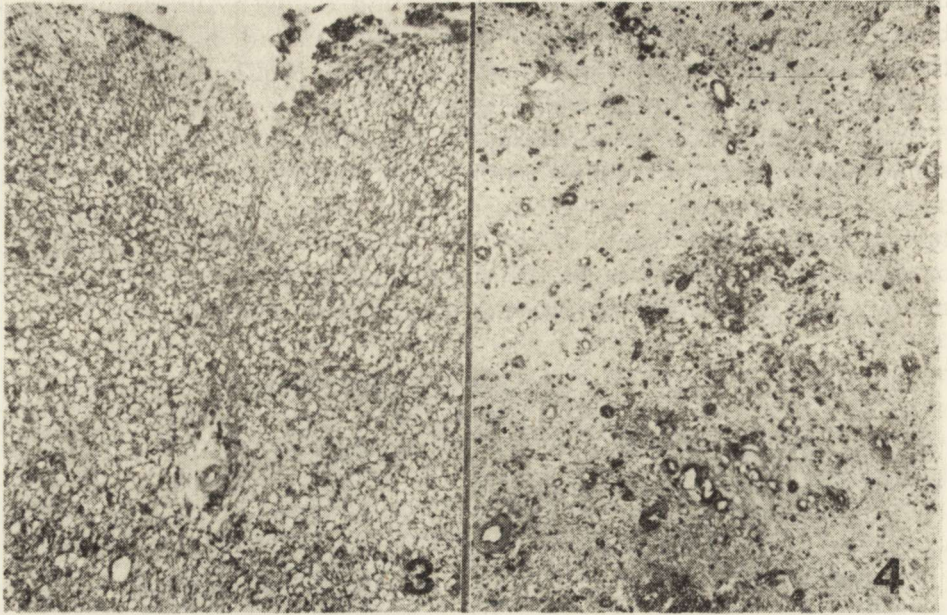
*Fig. 1.* Focal overgrowth of fibres and fibroblasts in the leptomeninges of the cerebral hemisphere. H—E.  $\times 60$

*Ryc. 1.* Ogniskowy rozplem włókien łącznotkankowych oraz fibroblastów w oponach miękkich sklepienia mózgu. H—E. Pow.  $60 \times$

*Fig. 2.* Proliferation of spindle cells and fibroblasts in the wall of a large, meningeal artery of the spinal cord. H—E.  $\times 100$

*Ryc. 2.* Rozplem wrzecionowatych komórek oraz fibroblastów w ścianie dużej tętnicy opony rdzenia kręgowego. H—E. Pow.  $100 \times$

The most intensive and generalized pathological changes were found in the grey and white matter of the spinal cord. At the cervical level symmetrical spongy degeneration of the dorsal columns was prominent (Fig. 3). In this area all small vessels showed fibrotic wall thickening. They stained intensively in the van Gieson and PAS methods. The neurons, especially in the anterior horns, exhibited pronounced degenerative changes and reduction in number. Especially severe and widespread de-



*Fig. 3.* Intensive spongy degeneration of the Goll fascicle at the cervical level of the spinal cord. H—E.  $\times 60$

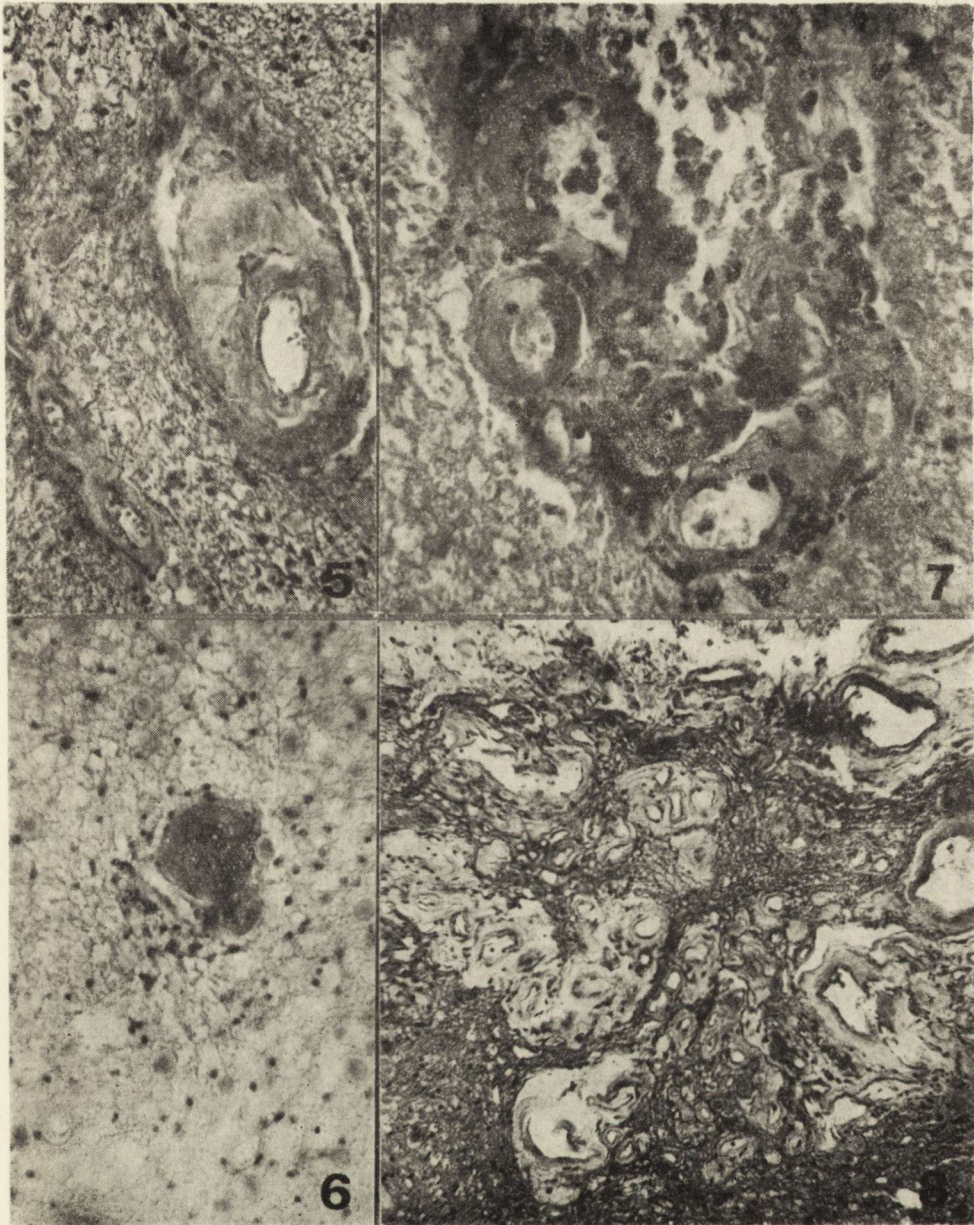
*Ryc. 3.* Zmiany zwyrodnieniowe pęczka Golla na poziomie szyjnym rdzenia kręgowego. H—E. Pow.  $60 \times$

*Fig. 4.* Severe degeneration of the anterior horn of the spinal cord at the thoracic level with cell destruction, gliosis and spongy degeneration of the tissue. Hyalinization of the small vessels. H—E.  $\times 60$

*Ryc. 4.* Zmiany zwyrodnieniowe rogów przednich rdzenia kręgowego w odcinku piersiowym z uszkodzeniem neurocytów, glejozą oraz zgębczeniem tkanki. Szklizowanie drobnych naczyń krwionośnych. H—E. Pow.  $60 \times$

struction of the tissue was found at the thoracic level of the spinal cord. There was heavy loss of neurons or some left cells showed fatty degeneration, tigrolysis, acidophilic properties and shrinkage of their cytoplasm. Among the neurons, cells debris and glial cells were present (Fig. 4). Vessels of small and larger size showed advanced fibrosis and hyalinization (Fig. 5). Sometimes there was significant narrowing of the vessel lumen (Fig. 6). Around small and some larger vessels there were wide perivascular spaces with slight mononuclear perivascular infiltrations. Occasionally, there were minute foci of tissue necrosis with numerous histocytes, epithelioid cells and fibroblasts. These cells were accumulated around the vessels or they penetrated the surrounding tissue. Sometimes the vessels together with abundant epithelioid cells and collagen fibres formed a nodule-like structure (Fig. 7).

In the lateral column of the mid-thoracic segments of the spinal cord and adjacent subarachnoid space a vascular malformation was found. It consisted of numerous small and larger vessels, both arteries and veins. Most of the vessels, especially small arteries, showed distinct hyaliniza-



*Fig. 5.* Prominent collagen overbuild of the small and large vessels of the spinal cord. Van Gieson.  $\times 200$

*Ryc. 5.* Rozplem włókien kolagenowych w ścianie drobnych i dużych naczyń krwionośnych rdzenia kręgowego. Van Gieson. Pow.  $200 \times$

*Fig. 6.* Small vessel of the spinal cord with prominent thickening of the wall and obliteration of the lumen. PAS.  $\times 200$

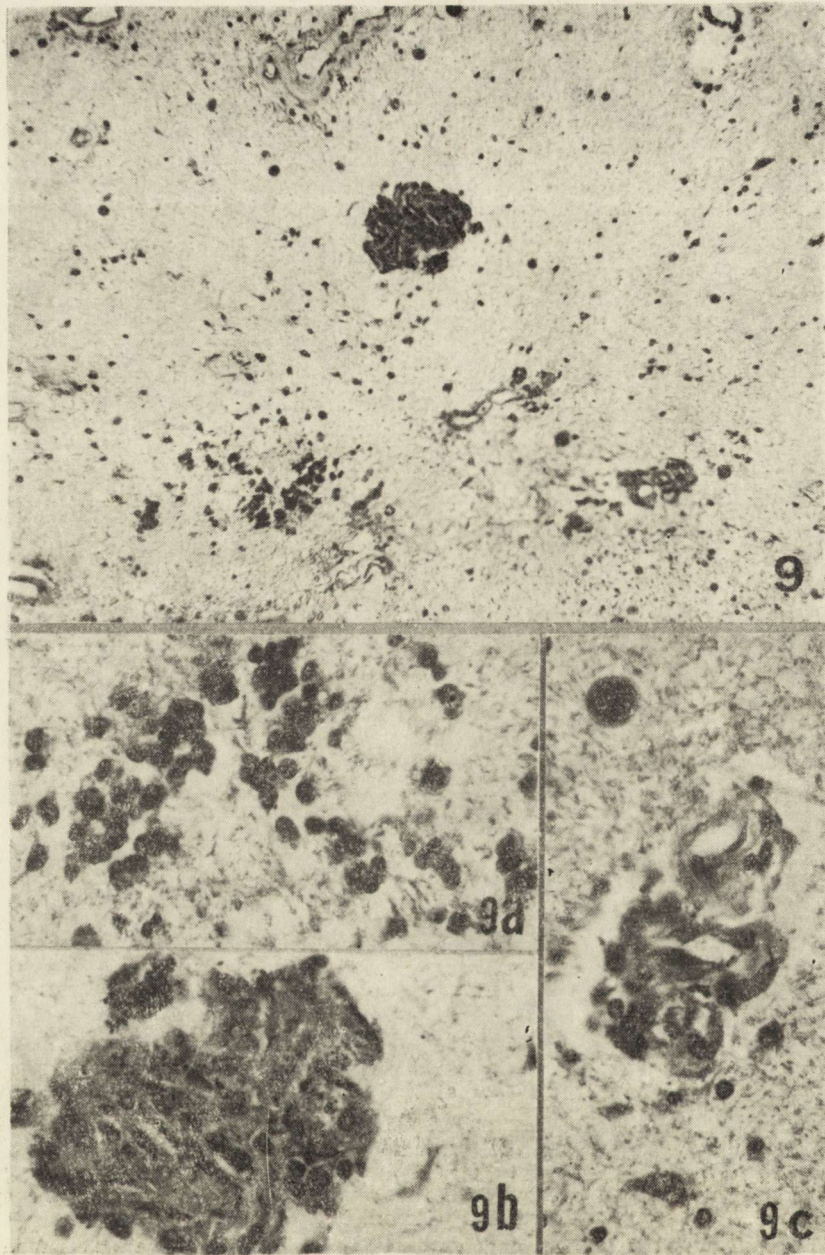
*Ryc. 6.* Drobne naczynia krwionośne rdzenia kręgowego z wybitnie pogrubiałą ścianą naczyniową oraz zaciśniętym światłem. PAS.  $\times 200$

*Fig. 7.* Accumulation of small and larger vessels surrounded by infiltrates in the spinal cord at the thoracic level. H—E.  $\times 400$

*Ryc. 7.* Zgrupowanie drobnych i większych naczyń krwionośnych otoczonych przez nacieki w segmentach piersiowych rdzenia kręgowego. H—E. Pow.  $400 \times$

*Fig. 8.* Arterio-venous malformation in the thoracic segments of the spinal cord. H—E.  $\times 100$

*Ryc. 8.* Malformacja tętniczo-żylna w segmentach piersiowych rdzenia kręgowego. H—E. Pow.  $100 \times$



*Fig. 9.* Fragment of white matter of the spinal cord at the thoracic level with spongy degeneration of the tissue, vascular changes and nodule formation. H—E.  $\times 60$ . *a, b, c.* Higher magnification of Fig. 9 fragments. H—E.  $\times 400$ . *a.* interstitial accumulation of cells with slightly oval or elongated nuclei; *b.* nodule composed of cells with oval, elongated or round nuclei; *c.* outgrowth of similar cells from the vessel wall

*Ryc. 9.* Fragment istoty białej rdzenia kręgowego w odcinku piersiowym ze zgęszczeniem tkanki, zmianami naczyniowymi oraz tworzeniem guzka. H—E. Pow.  $60 \times$ . *a, b, c.* Większe powiększenie fragmentów z ryciny 9. H—E. Pow.  $400 \times$ . *a.* śródkankowe skupienie komórek z owalnymi lub nieco wydłużonymi jądrami; *b.* guzek utworzony przez komórki o owalnych, wydłużonych lub okrągłych jądrach; *c.* komórki o podobnych cechach widoczne przy ścianie naczynia krwionośnego



tion, fibrotic thickening of the wall and closed lumen. Between the vessels collagen bundles were densely packed (Fig. 8).

In the next thoracic segments small, isolated and sharply outlined, more or less developed, single nodules were seen. They were composed of single mononuclear cells, numerous fibroblasts, epithelioid and non-identified cells, often elongated in shape, containing scanty cytoplasm and a dark, hyperchromatic nucleus (Fig. 9a—c). In some areas direct outgrowth of these cells from the vessel wall could be traced.

Lumbar segments of the spinal cord were not affected. Only moderate hyalinization of the vessels was visible. The spinal ganglia showed no abnormalities. Spinal nerve roots presented a slight pallor of the myelin sheaths.

For microscopical examination the thyroid gland was taken as an example of internal organs. Intimal fibrosis was advanced, so was focal destruction of the internal elastic lamina and thickening of the media in the vessels of the thyroid stroma. In the other arteries proliferation of endothelium was found.

#### DISCUSSION

Our case presented a peculiar picture of NF, different in many aspects from the other cases described, even from those of the central form. Typical skin changes allowed for case diagnosis as NF. The neurological picture of the disease pointed to focal damage of the spinal cord as a complication of NF, largely reflected in vascular and tissue changes as it was visualized in the neuropathological examination. The reason why these changes were only confined to the spinal cord remained unclear.

The clinical course of the disease resulted from the damaged permeability of the vessels as well as from local anoxic changes induced by arterio-venous malformation. Although, both fibrosis and hyalinization may have also resulted from aging and arteriosclerosis of the 72-year-old patient, the intensity of vascular changes, collagen overproduction, lack of these changes in the brain hemispheres and hamartomatous lesion exceeded by far the criteria of aging and arteriosclerosis (Jellinger 1967).

Structural changes of the blood vessels in the organs belong to the picture of NF and, even in some cases their enhancement allowed to distinguish a vascular form of NF (Reubi 1945; Feyrter 1949; Salyer, Salyer 1974). In the CNS vascular abnormalities are rarely described. In the three cases aneurysm and arterial wall defect (Pearce 1967) or intracranial arteries occlusive diseases (Tomsick et al. 1976) were noted. In NF,

in the spinal cord, vascular changes were not documented except for the Głuszcz case (1965) describing them as corresponding to the Reubi description. Although they were observed together with CNS tumors, he concluded that vascular changes expressed collagen disease not necessarily connected with malignancy.

All the above described changes of the vessels were clearly visible in our case in the absence of a CNS tumor. Thus, postulated by Mikuz et al. (1975) a theory of a dysplasia of small vessels, not related to neural malignancy agreed with our neuropathological picture permitting to ascertain vessel changes as a primary alteration induced by an unknown factor(s).

Besides the vascular changes, interstitial nodules formed by proliferating mesodermal cells were seen. The composition of the nodules, the following steps of their evolution and their derivation from the vessel's walls presented the mesodermal tissue response to a damaging factor. In NF disease metastases of skin nodules to the CNS have not been documented, but the tumors of non-neural crest origin were found in other organs (Hope, Mulvihill 1981). It seems that in our case, the changes observed in the spinal cord, both concerning the vessels and cell proliferation just manifested mesodermal dysplasia, suggesting a genetic defect of the cell of non-neural crest origin. This could agree with the implicated general defect of fibroblasts which has been observed in tissue culture as enhanced cells transformation after oncogenic virus (Bidot-Lopez, Frankel 1983).

In our case the coexistence of vascular malformation with NF may additionally suggest a possibility of NF relation to phakomatoses like Sturge-Weber disease or Cobb's syndrome (Russel, Rubinstein 1977). Those facts implicate NF as a dysontogenetic, genetically inherited defect of the mesodermal tissue.

#### ZMIANY NACZYNIOWE W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM W NERWIAKOWŁÓKNIAKOWATOŚCI

#### Streszczenie

Opisano przypadek 72-letniego chorego z powoli postępującym niedowładem kończyn dolnych w przebiegu nerwiakowłókniakowatości. Badanie neuropatologiczne wykazało nasilone uszkodzenia istoty białej i szarej rdzenia kręgowego w odcinku piersiowym oraz znaczne zmiany strukturalne naczyń krwionośnych rdzenia kręgowego. Stwierdzono ponadto w odcinku piersiowym rdzenia kręgowego malformację tętniczo-żylną oraz pojedyncze drobne guzki złożone z komórek pochodzenia mezenchymalnego. Przedyskutowano patogenezę zmian naczyniowych, będących przypuszczalnie wynikiem dysplazji o charakterze dysontogenetycznym.

СОСУДИСТЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ  
В НЕВРОФИБРОМАТОЗЕ

Резюме

Описан случай 72-летнего больного с неврофиброматозом, у которого медленно прогрессировал парез нижних конечностей. Патоморфологическое исследование обнаружило выразительное повреждение белого и серого вещества грудного отдела спинного мозга и значительные структурные изменения кровеносных сосудов спинного мозга. В его грудном отделе авторы обнаружили также мальформацию артерио-венозную и немногочисленные мелкие узелки, составленные из клеток мезенхимального происхождения. Продискутирован патогенез сосудистых изменений являющихся, вероятно, результатом дисплазии связанной с дефектом в развитии.

REFERENCES

1. Bidot-Lopez P., Frankel J. W.: Enhanced viral transformation of skin fibroblasts from neurofibromatosis patients. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1983, 13, 27—32.
2. Feyrter F.: Über Neurome und Neurofibromatose, nach Untersuchungen am menschlichen Magen-Darmschlauch. *Wien Med. Wschr.*, 1949, 98, 287—290.
3. Głuszczyk A.: Patomorfologia ośrodkowej postaci choroby Recklinghausena na podstawie analizy własnego przypadku. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 71—88.
4. Hope D. G., Mulvihill J. J.: Malingancy in neurofibromatosis. In: *Advances in Neurology*. Vol. 29. Neurofibromatosis (von Recklinghausen disease). Eds. V. M. Riccardi, J. J. Mulvihill. Raven Press, New York 1981, 33—56.
5. Jellinger K.: Spinal cord arteriosclerosis and progressive vascular myelopathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1967, 30, 195—206.
6. Mikuz G., Weiser G., Propst A.: Vascular neurofibromatosis. *Path. Microbiol.*, 1975, 43, 195—198.
7. Pearce J.: The central nervous system pathology in multiple neurofibromatosis. *Neurology*, 1967, 17, 691—697.
8. Reubi F.: Neurofibromatose et lesions vasculaires. *Schweiz. Med. Wschr.*, 1945, 75, 463—465.
9. Rubinstein A. E., Mytilineou C., Yahr M. D., Revoltella R. P.: Neurological aspects of neurofibromatosis. In: *Advances in Neurology*. Vol. 29. Neurofibromatosis (von Recklinghausen disease). Eds. V. M. Riccardi, J. J. Mulvihill. Raven Press. New York 1981, 11—21.
10. Russell D. S., Rubinstein L. J.: Pathology of tumors of the nervous system. Ed. E. Arnold. London, 1977, 48-55, 135—141.
11. Salyer W. R., Salyer D. C.: The vascular lesions of neurofibromatosis. *Angiology*, 1974, 25, 510—519.
12. Tomsick T. A., Lukin R. R., Chambers A. A., Benton C.: Neurofibromatosis and intracranial arterial occlusive disease. *Neuroradiology*, 1976, 11, 229—234.

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

WANDA GORDON-MAJSZAK<sup>1</sup>, RYSZARD PLUTA<sup>2</sup>, JERZY W. ŁAZAREWICZ<sup>1</sup>

WPLYW PODWYŻSZONEJ TEMPERATURY OTOCZENIA  
NA PODSTAWOWE PARAMETRY OBWODOWEJ KRWI TĘTNICZEJ  
ORAZ PEROKSYDACJĘ LIPIDÓW KORY MÓZGU U KRÓLIKA \*

<sup>1</sup> Zakład Neurochemii i <sup>2</sup> Zakład Neuropatologii, Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Mózg wykazuje dużą wrażliwość na przegrzanie, przejawiającą się w przypadku udaru cieplnego zaburzeniami orientacji, drgawkami i śpiączką oraz nieodwracalnym uszkodzeniem neuronów (Gwóźdź i wsp. 1978; Siesjö 1978; Millan i wsp. 1979; Dydyk, Pluta 1984). Nasze poprzednie badania nie wykazały jednak istotnych zaburzeń czynnościowych w izolowanych zakończeniach synaptycznych mózgu królików poddanych 3 godz. przegrzaniu w temperaturze 40—41°C (Łazarewicz i wsp. 1986). Wykazano tylko wzmożone pobieranie wapnia w synaptosomach przy obniżonym nagromadzeniu tego kationu w mitochondriach i mikrosomach mózgu (Łazarewicz, Gordon-Majszak 1986). W badaniach wpływu przegrzania na metabolizm lipidów mózgu wykazano natomiast pobudzenie przemian gangliozydów, wzrost poziomu wolnych kwasów tłuszczowych, a także zaburzenia wolnorodnikowego utleniania lipidów: obniżenie zawartości końcowych produktów peroksydacji oraz spadek poziomu lipofilnych antyoksydantów (Domańska-Janik i wsp. 1986). Obniżenie poziomu produktów peroksydacji wykazano także we frakcji synaptosomów izolowanych po hipertermii (Łazarewicz, Gordon-Majszak 1986).

Mechanizm zaburzenia peroksydacji w mózgu podczas hipertermii nie jest znany, a wyjaśnienie jego istoty wydaje się celowe ze względu na możliwość udziału procesów wolnorodnikowych w patogenezie uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego (Demopoulos 1973; Majewska i wsp. 1978). Rozpatrując modyfikację procesów peroksydacji w ośrodkowym układzie nerwowym, należy uwzględnić zarówno mechanizmy tkankowe, jak i ogólnoustrojową odpowiedź na przegrzanie organizmu. Obniżenie stężeń niektórych produktów peroksydacji może wynikać ze zmniej-

\* Praca finansowana przez PAN w ramach tematu T-7.

szonej podatności tkanek na wolnorodnikowe utlenianie, choć może zachodzić także przy pobudzeniu peroksydacji ze wzmożonym usuwaniem lub rozkładem jej końcowych produktów. Na te procesy z kolei może mieć wpływ wiele czynników miejscowych i ogólnoustrojowych, takich jak: poziom antyoksydantów, szybkość przemian metabolicznych, pH, przepływ mózgowy.

Praca zmierzała do wyjaśnienia, w jakim stopniu zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej mogły wpłynąć na wolnorodnikowe utlenianie lipidów mózgu oraz czy w wyniku przegrzania zmienia się podatność tkanek ośrodkowego układu nerwowego na peroksydację. Przedmiotem analizy był wpływ hipertermii na równowagę kwasowo-zasadową u królika oraz aktywność procesów wolnorodnikowych *in vitro* przy różnej kwasowości środowiska. Jednocześnie zbadano wpływ egzogenego układu indukującego wolnorodnikowe utlenianie na nagromadzanie produktów peroksydacji w homogenatach mózgu królików poddanych hipertermii.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 26 królikach, albinosach, obu płci, o masie ciała 2,5—3,5 kg. Zwierzęta umieszczano na trzy godziny w komorze termicznej o temperaturze powietrza 38—40°C i wilgotności względnej wahającej się od 60 do 45% (Pluta 1984). Przed umieszczeniem zwierząt w komorze termicznej, w narkozie eterowej cewnikowano przez tętnicę udową w celu pobrania próbek krwi do badań gazometrycznych, hematokrytu, hemoglobiny (Hb) i liczby erytrocytów.

Poziom  $pO_2$ ,  $pCO_2$ ,  $HCO_3^-$ ,  $O_2CT$ ,  $O_2SAT$  i pH oznaczano w próbkach krwi pobranych z tętnicy udowej po 1, 2 i 3 godzinach przebywania zwierząt w warunkach hipertermii oraz 0,5 godz. po doświadczeniu. Oznaczenia wykonywano za pomocą aparatu 175 automatic pH/blood gas system (CORNING). Obliczeń całkowitego  $CO_2/TCO_2$  dokonywano opierając się na tablicach Siggaarda-Andersena (1964).

Hematokryt, Hb i liczbę erytrocytów oznaczano w próbkach krwi bezpośrednio po wyjęciu zwierząt z komory termicznej. W celu oceny hematokrytu krew tętniczną pobierano do heparynizowanych kapilar i wirowano w wirówce mikrohematokrytowej (Janetzki TH 11). Hemoglobinę i liczbę erytrocytów w krwi tętnicznej oceniano metodą opisaną przez Maja (1977).

Wszystkie doświadczenia danej serii przeprowadzono w tej samej porze dnia i roku, pojedynczo na zwierzętach kontrolnych. Po zakończeniu doświadczeń u wszystkich królików przeprowadzono badanie sekcyjne.

Materiał do oznaczeń *in vitro* pobierano natychmiast po zakończeniu 3 godz. hipertermii lub od zwierząt kontrolnych. Króliki uśmiercano przez zatrzymanie akcji serca wstrzykniętym dożylnie 20% roztworem  $MgSO_4$  i dosercową perfuzją 200 ml ochłodzonego roztworu Ringera.

Pobierano mózgi i izolowano istotę szarą półkul, którą poddawano homogenizacji w 9 objętościach 150 mM KCl. Niezhomogenizowane fragmenty tkanek usuwano przez wirowanie w ciągu 3 min przy 1000 g. Próbkę homogenatu (0,2 mg białka) inkubowano przez okres od 0 do 30 min (ryc. 1—3) w temperaturze 37°C w środowisku zawierającym 150 mM KCl, 100 mM bufor Tris-Cl, pH 7,5. W części doświadczeń mieszanina inkubacyjna zawierała ponadto 12  $\mu$ M  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2$  oraz 200  $\mu$ M kwas askorbinowy, dodane w celu indukowania peroksydacji, a bufor Tris-Cl o pH 7,5 był zastąpiony 100 mM buforami Tris-maleinowym (pH 5,5), Tris-Cl (pH 6,5 i 8,5) lub buforem boranowym o pH 9,5.

Substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym w badanych próbkach oznaczano metodą podaną przez Kogure i wsp. (1982). Wyniki wyrażano w wartościach absorpcji odczytywanej przy 532 nm na spektrofotometrze Pay-Unicam SP-500.

Znamiennosc statystyczna uzyskanych wyników oceniano przy zastosowaniu testu *t* studenta.

#### WYNIKI

##### Zmiany hematokrytu, poziomu hemoglobiny i liczba erytrocytów w obwodowej krwi tętniczej

Wyniki przeprowadzonych badań zestawiono w tabeli 1. Hematokryt u królików przed doświadczeniem wynosił od 40,0 do 46,2%. Po trzech godzinach przebywania zwierząt w komorze termicznej obniżał się on do

Tabela 1. Zmiany wybranych parametrów obwodowej krwi tętniczej pod wpływem wysokiej temperatury otoczenia

Table 1. Changes of selected parameters in peripheral arterial blood under high ambient temperature

Badane parametry Values measured	Kontrola Control	Po 3 godz. hipertermii After 3 h hyperthermia
Hemoglobina Hemoglobin g %	14,4±0,5 (22)	13,1±0,5* (22)
Hematokryt Hematocrit %	42,2±1,4 (22)	38,6±1,5* (22)
Krwinki czerwone Erythrocytes × 10 <sup>3</sup> /μl	4432±142 (22)	4051±157* (22)

Wartości średnie ± SD. \*  $p > 0,001$

The means ± SD

W nawiasach podano liczbę zwierząt

In parentheses number of animals is given

35,5 do 40,9‰. Po trzech godzinach przebywania zwierząt w temperaturze otoczenia 38—40°C, spadek hematokrytu wynosił od 1,9 do 5,7‰, przy średniej wartości wynoszącej  $3,6 \pm 1,4\%$ .

Poziom hemoglobiny u królików przed umieszczeniem ich w komorze termicznej mieścił się w zakresie 13,6—15,7g‰. Po doświadczeniu poziom Hb wynosił od 12,1 do 13,9g‰. Spadek hemoglobiny po 3 godz. hipertermii wynosił od 0,6 do 1,9g‰ (średnio  $1,2 \pm 0,5g\%$ ).

Liczba erytrocytów w krwi obwodowej u zwierząt przed umieszczeniem w komorze termicznej wahała się od  $4200 \times 10^3$  do  $4851 \times 10^3/\mu\text{l}$ . W trakcie doświadczenia obserwowano zmniejszenie się liczby erytrocytów o wartości od 199 500 do 598 500, średnio o  $380\,864 \pm 142\,325/\mu\text{l}$ . Po doświadczeniu liczba krwinek czerwonych była w granicach od  $3727 \times 10^3$  do  $4294 \times 10^3/\mu\text{l}$ .

### Zmiany gazometryczne w obwodowej krwi tętniczej

Wyniki przeprowadzonych badań zestawiono w tabeli 2. Przed hipertermią kontrolowano w krwi tętniczej  $\text{pO}_2$ ,  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{TCO}_2$ ,  $\text{O}_2\text{CT}$ ,  $\text{O}_2\text{SAT}$  i pH. Prężność tlenu u swobodnych królików wahała się od 73,9 do 84,6 mm Hg, natomiast  $\text{pCO}_2$  od 30,9 do 37,6 mm Hg. Wartości  $\text{HCO}_3^-$  i  $\text{TCO}_2$  były zawarte odpowiednio w granicach od 18,7 do 25,7 mEq/l oraz od 20,7 do 26,6 mMol/l. Zawartość  $\text{O}_2$  we krwi wynosiła od 20,0 do

Tabela 2. Zmiany prężności gazów i pH w tętniczej krwi królików pod wpływem wysokiej temperatury otoczenia

Table 2. Changes of arterial blood gases and pH in rabbits submitted to high ambient temperature

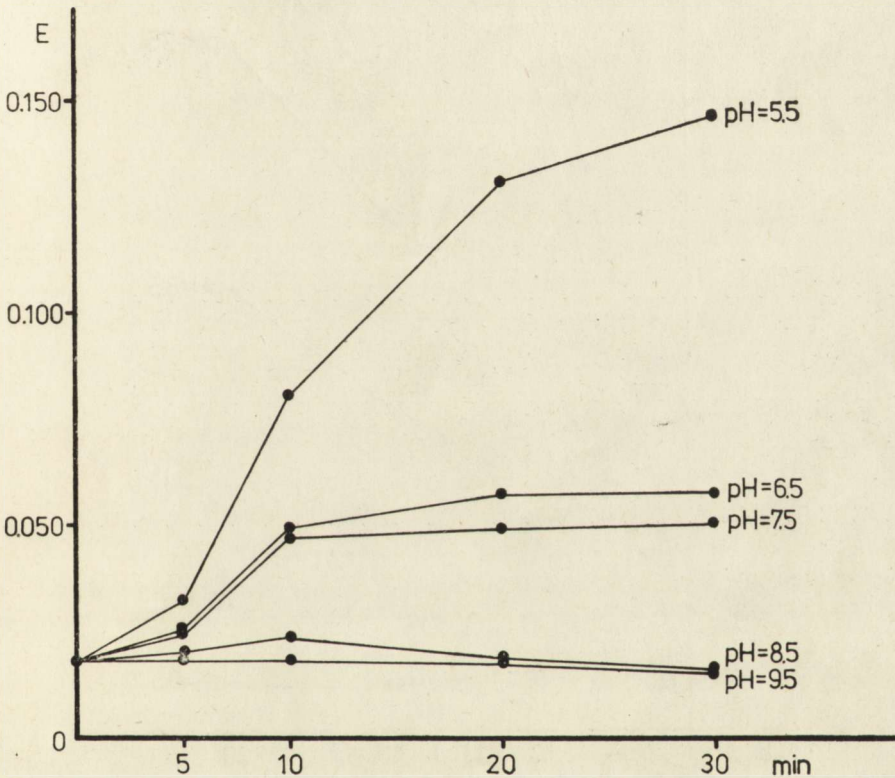
Badane parametry Values measured	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia			0,5 godz. po hipertermii 0,5 h after hyperthermia
		1 godz. 1 h	2 godz. 2 h	3 godz. 3 h	
$\text{pO}_2$ (mm Hg)	$78,6 \pm 5,1$ (n = 8)	$76,3 \pm 9,4$ (n = 8)	$85,6 \pm 13,4$ (n = 8)	$85,6 \pm 8,0$ (n = 6)	$83,0 \pm 4,3$ (n = 4)
$\text{O}_2\text{CT}$ ml/dl)	$20,2 \pm 0,1$ (n = 8)	$18,9 \pm 0,4^*$ (n = 8)	$18,3 \pm 0,6^*$ (n = 8)	$17,7 \pm 0,3^*$ (n = 6)	$16,6 \pm 0,8^*$ (n = 4)
$\text{O}_2\text{SAT}$ (%)	$94,8 \pm 1,2$ (n = 8)	$93,4 \pm 1,7$ (n = 8)	$93,5 \pm 3,1$ (n = 8)	$94,0 \pm 1,7$ (n = 6)	$90,7 \pm 4,4^*$ (n = 4)
$\text{pCO}_2$ (mm Hg)	$33,4 \pm 2,7$ (n = 8)	$38,5 \pm 3,9^*$ (n = 6)	$37,2 \pm 2,9^*$ (n = 6)	$32,8 \pm 4,4$ (n = 6)	$38,4 \pm 7,9$ (n = 4)
$\text{HCO}_3^-$ (mEq/l)	$24,2 \pm 1,8$ (n = 7)	$20,7 \pm 3,1^*$ (n = 8)	$18,6 \pm 4,2^*$ (n = 8)	$18,2 \pm 3,5^*$ (n = 6)	$16,9 \pm 1,8^*$ (n = 4)
$\text{TCO}_2$ (mMol/l)	$25,5 \pm 1,8$ (n = 7)	$21,9 \pm 3,4^*$ (n = 8)	$19,9 \pm 4,6^*$ (n = 8)	$19,8 \pm 3,9^*$ (n = 6)	$18,4 \pm 2,1^*$ (n = 4)
pH	$7,459 \pm 0,073$ (n = 8)	$7,389 \pm 0,022^*$ (n = 8)	$7,379 \pm 0,063^*$ (n = 8)	$7,366 \pm 0,041^*$ (n = 6)	$7,276 \pm 0,044^*$ (n = 4)

Wartości średnie  $\pm$ SD. W nawiasach liczba zwierząt \*  $p < 0,05$ .

The means  $\pm$ SD. Number of animals in parentheses

20,3 ml/dl, a wysycenie hemoglobiny tlenem było od 95,1 do 96,7%. Wartości pH zawierały się w granicach od 7,345 do 7,520.

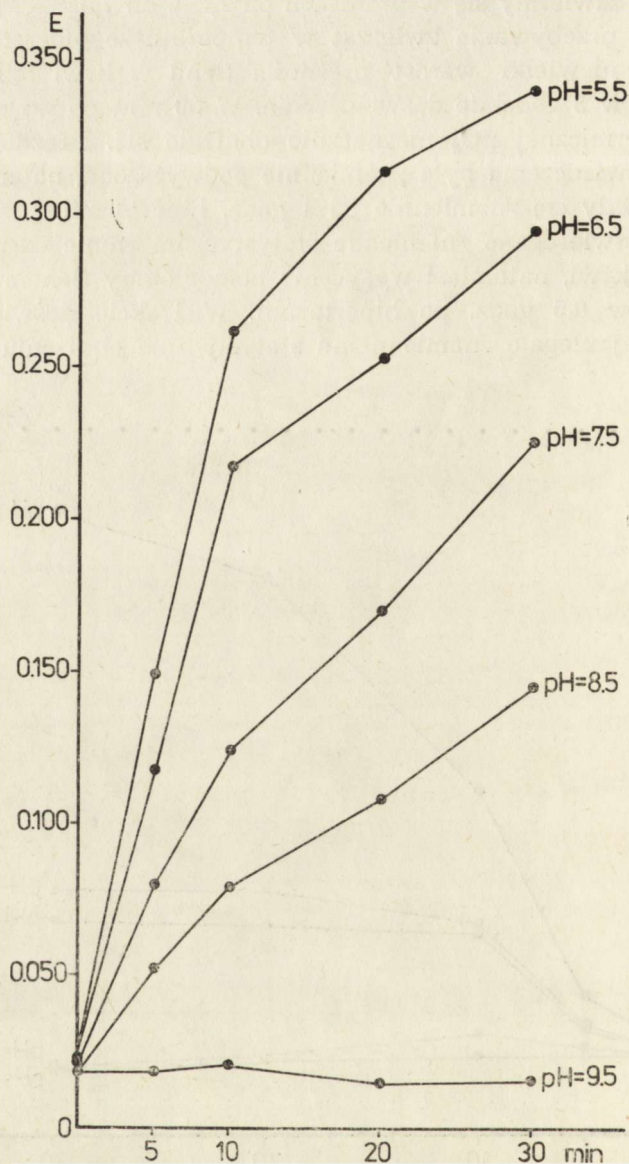
W czasie przebywania zwierząt w temperaturze otoczenia 38—40°C stwierdzono niewielki wzrost prężności tlenu w krwi tętniczej — do 85,6 mm Hg w 3 godzinie doświadczenia. W 30 min po wyjęciu zwierząt z komory termicznej  $pO_2$  nieznacznie obniżało się. Prężność  $CO_2$  w 1 i 2 godz. doświadczenia była znamienne podwyższona, natomiast  $HCO_3^-$  i  $TCO_2$  obniżały się znamienne od 1 godz. hipertermii. Przez cały czas hipertermii stwierdzano znamienne statystycznie zmniejszenie zawartości tlenu we krwi, natomiast wysycenie hemoglobiny tlenem obniżało się znamienne w 0,5 godz. po hipertermii. W trakcie doświadczenia pH krwi tętniczej ulegało znamienne statystycznie obniżeniu.



Ryc. 1. Wpływ pH na spontaniczne nagromadzenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym w homogenacie kory mózgu królika *in vitro*. Homogenaty przygotowywano i inkubowano przy różnych wartościach pH, jak opisano w Materiałach i Metodach. Wyniki wyrażono w jednostkach ekstynkcji w przeliczeniu na próbkę zawierającą 0,2 mg białka. Punkty stanowią średnie z 4—6 doświadczeń, S. D. nie przekraczało 10% wartości średniej

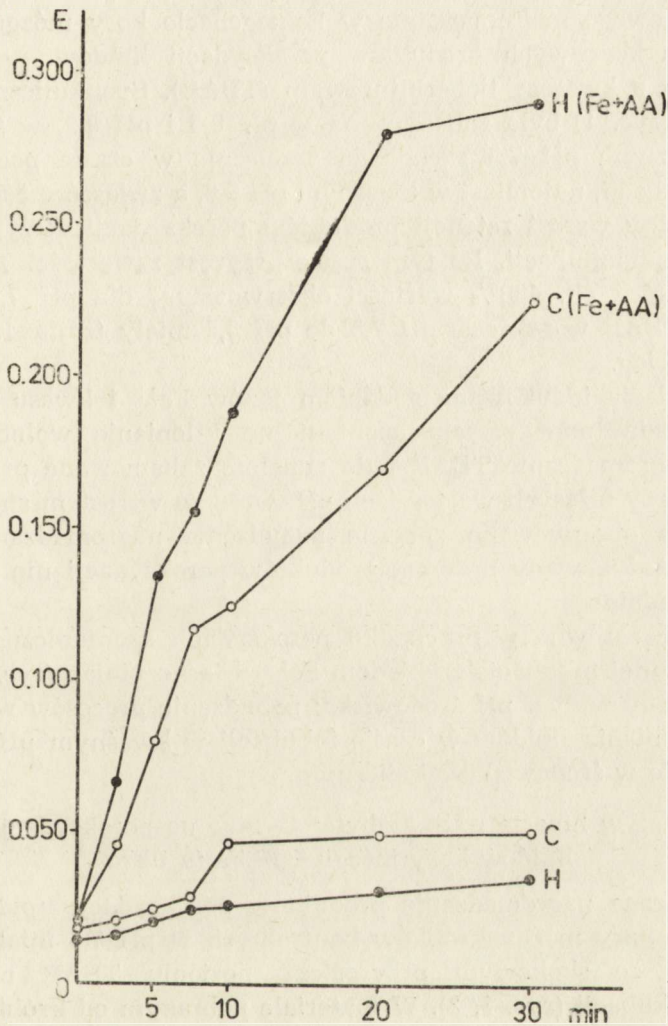
Fig. 1. Effect of pH on *in vitro* spontaneous accumulation of thiobarbituric acid reactive material in rabbit brain cortex homogenate. Homogenates were prepared and incubated at different pH as described in Material and Methods. Results are expressed in extinction units per sample containing 0.2 mg protein. Points represent means from 4—6 experiments, S. D. did not exceed 10% of the mean value





Ryc. 2. Wpływ pH na nagromadzenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym w homogenatach kory mózgu królika w czasie inkubacji *in vitro* z  $\text{Fe}^{2+}$  i kwasem askorbinowym. Homogenaty inkubowano przy różnych wartościach pH w obecności  $12 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  i  $200 \mu\text{M}$  kwasu askorbinowego. Opis jak dla ryc. 1

Fig. 2. Effect of pH on *in vitro* accumulation of thiobarbituric acid reactive material in rabbit brain cortex homogenates upon incubation with  $\text{Fe}^{2+}$  and ascorbic acid. Homogenates were incubated at different pH with  $12 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$  and  $200 \mu\text{M}$  ascorbic acid. Explanations as for Fig. 1



Ryc. 3. Wpływ hipertermii na spontaniczne oraz indukowane przez  $\text{Fe}^{2+}$  i askorbinian nagromadzenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym w homogenatach kory mózgu królików. Warunki hipertermii *in vivo* oraz przygotowania i inkubacji homogenatów kory mózgu, jak podano w Materiale i Metodach oraz w opisach do ryc. 1 i 2

Fig. 3. Effects of hiperthermia on spontaneous and  $\text{Fe}^{2+}$  + ascorbate-induced accumulation of thiobarbituric acid-reactive material in brain cortex homogenates. Conditions of *in vivo* hiperthermia, preparation and incubation of brain cortex homogenates as described in Material and Methods. Explanations as for Figs 1 and 2

### Wpływ pH na wolnorodnikowe utlenianie lipidów kory mózgu królika *in vitro*

Badano spontaniczne oraz indukowane dodaniem jonów  $\text{Fe}^{3+}$  i kwasu askorbinowego nagromadzanie w homogenacie kory mózgu królików kontrolnych końcowych produktów peroksydacji lipidów — substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBAR). Spontaniczna produkcja TBAR (ryc. 1) była zahamowana w pH 8,5 i pH 9,5, w środowisku o fizjologicznym pH 7,5 zachodziła wyłącznie w czasie początkowych 10 min inkubacji, natomiast w kwaśnym pH 6,6, a zwłaszcza 5,5, obserwowano wyraźny wzrost retencji produktów peroksydacji utrzymujący się aż do 30 min inkubacji. Po tym czasie przyrost zawartości TBAR przy pH 5,5 wynosił ok. 400% wartości obserwowanej dla pH 7,5. Krzywe przyrostu TBAR w zakresie pH 7,5 do pH 5,5 miały trójfazowy, sigmoidalny przebieg.

Peroksydacja indukowana dodaniem jonów  $\text{Fe}^{3+}$  i kwasu askorbinowego znacznie przewyższała spontaniczne utlenianie wolnorodnikowe (ryc. 2). Nagromadzanie TBAR było zupełnie zahamowane przy pH 9,5, natomiast przy niższych wartościach pH, wraz ze wzrostem stężeń jonów wodorowych obserwowano znaczne pobudzenie nagromadzania TBAR, przy czym indukowany przyrost produktów peroksydacji nie miał przebiegu sigmoidalnego.

Tak więc zarówno w przypadku peroksydacji spontanicznej (ryc. 1), jak i wywołanej inkubacją z układem  $\text{Fe}^{3+}$  + askorbinian (ryc. 2) stwierdzono wyraźny wpływ pH środowiska: pobudzenie procesów wolnorodnikowego utleniania lipidów w czasie inkubacji w kwaśnym pH oraz jego zahamowanie w środowisku alkalicznym.

### Wpływ hipertermii przebytej *in vivo* na peroksydację lipidów kory mózgu królika *in vitro*

Spontaniczne nagromadzanie produktów peroksydacji lipidów w homogenatach kory mózgu królików kontrolnych w pH 7,5 miało przebieg sigmoidalny ze skokowym przyrostem poziomu TBAR między 7,5 a 10 min inkubacji (ryc. 1, 3). W materiale pobranym od królików hipertermicznych po 30 min inkubacji obserwowano 30% obniżenie zawartości produktów peroksydacji, na co miał wpływ niższy poziom wyjściowy TBAR oraz brak szybkiej fazy wolnorodnikowego utleniania lipidów (ryc. 3).

Przyrost TBAR podczas 30 min inkubacji homogenatów kory mózgu w obecności  $12 \mu\text{M}$   $\text{Fe}^{3+}$  i  $200 \mu\text{M}$  kwasu askorbinowego był po hipertermii o 1/3 wyższy od kontroli. Zastosowany tu nieenzymatyczny układ indukujący peroksydację pobudzał produkcję TBAR w kontroli ponad sześciokrotnie, a w materiale po hipertermii — dwunastokrotnie. Stwierdzono więc obniżoną podatność homogenatów kory mózgu królików pod-

danych 3 godz. hipertermii na spontaniczną peroksydację *in vitro*, natomiast indukowane utleniania wolnorodnikowe były w tym materiale znacznie pobudzone.

#### OMÓWIENIE

Wyniki przedstawionych badań wskazują na obniżenie wartości hematokrytu, spadek liczby krwinek czerwonych oraz zawartości hemoglobiny we krwi tętniczej królików przebywających przez 3 godz. w podwyższonej temperaturze otoczenia. Mechanizm tego zjawiska nie jest jasny, natomiast jego rola w patogenezie zaburzeń wywołanych przez hipertermię wydaje się znacząca, tym bardziej, że zmianom parametrów, obwodowej krwi tętniczej towarzyszył spadek zawartości tlenu we krwi, obniżenie pH, spadek stężenia  $\text{HCO}_3^-$  oraz całkowitego  $\text{CO}_2$ . Jednocześnie prężność tlenu pozostawała bez zmian, a prężność  $\text{CO}_2$  znamienne wzrastała w 1 i 2 godz. hipertermii. Wykazane zaburzenia parametrów gazometrycznych krwi tętniczej w hipertermii są zgodne z obserwacjami Carlssona i wsp. (1976), uzyskanymi na zwierzętach poddanych narkozie ogólnej. Stwierdzony w przedstawionej pracy spadek zawartości tlenu w krwi tętniczej poniżej wartości kontrolnych korelował z obniżeniem ilości hemoglobiny i spadkiem pH oraz wykazany poprzednio wzrostem temperatury ciała i mózgu królika (Pluta 1984). Wzrost temperatury tkanek zgodnie z prawem Van't Hoffa powoduje pobudzenie metabolizmu i prowadzi do zwiększonego zapotrzebowania i zużycia tlenu przez mózg (Carlsson i wsp. 1976). Wzrost zapotrzebowania na tlen przy obniżonej zdolności krwi do jego transportu może prowadzić do niedoboru tlenu w tkankach. Wydaje się więc, że przebywanie królików przez 3 godz. w podwyższonej temperaturze otoczenia może doprowadzić do ostrego lub podostrego niedotlenienia anemicznego.

Wynikiem zasługującym na podkreślenie było stwierdzenie, że mimo towarzyszącej przegrzaniu hiperwentylacji (Pluta 1984) nie tylko nie stwierdza się hipokapnii i alkalozji, ale nawet dochodzi do znamienego statystycznie obniżenia pH. Efekt ten, zgodny z obserwacjami poczynionymi przez innych autorów na różnych modelach doświadczalnych (Bouverot i wsp. 1974; Carlsson i wsp. 1976) jest prawdopodobnie związany z pobudzeniem metabolizmu, ze wzmożoną konsumpcją glikogenu i glukozy, a co za tym idzie wzrostem produkcji  $\text{CO}_2$ , pobudzeniem glikolizy i podwyższeniem zawartości kwasu mlekowego we krwi (Samek 1966; Samek i wsp. 1970, 1971; Szulc 1972; Carlsson i wsp. 1976). Wzrost produkcji mleczanu może dodatkowo świadczyć o względnym niedoborze tlenowym w tkankach organizmu poddanego przegrzaniu. Ponadto związana z hipertermią umiarkowana kwasica wskazuje na celowość badania wpływu pH na szybkość procesów wolnorodnikowych w mózgu.

W tej pracy badano zarówno peroksydację spontaniczną, jak i indukowaną przez dodanie  $\text{Fe}^{3+}$  i kwasu askorbinowego. Sigmoidalny charakter krzywej spontanicznego nagromadzenia produktów peroksydacji — substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym, można tłumaczyć znanym, lawinowym przebiegiem fazy propagacji wolnorodnikowego utleniania (Mead 1984). Świadczy o tym także zmiana przebiegu krzywej, gdy peroksydację indukowano przez dodanie  $\text{Fe}^{3+}$  i kwasu askorbinowego, gdzie natychmiast dochodziło do pełnej aktywacji procesu. Wyniki uzyskane w tej pracy wyraźnie wskazują na aktywację spontanicznej i indukowanej peroksydacji lipidów w kwaśnym środowisku (pH 6,5 do 5,5). Proces ten był zahamowany w alkalicznym pH. Pobudzający wpływ wyższego stężenia protonów na wolnorodnikowe utlenianie lipidów mózgu został ostatnio, już po wykonaniu naszych badań, opisany przez Siesjö i wsp. (1985). Mechanizm tego efektu nie jest jasny: sugerowano m.in. możliwość zwiększonego powstawania w kwaśnym środowisku lipofilnego i silnie utleniającego rodnika  $\cdot\text{OOH}$  (Gąbicki, Bielski 1981) lub uwalnianie w środowisku kwaśnym endogennego żelaza z tkanek (Siesjö i wsp. 1985). To ostatnie wyjaśnienie nie wydaje się przekonujące zważywszy, że obniżenie pH szczególnie pobudza peroksydację w obecności dodawanych w naszych doświadczeniach jonów  $\text{Fe}^{3+}$ .

Uwzględniając wykazane w tej pracy przesunięcie równowagi kwasowo-zasadowej we krwi zwierząt poddanych hipertermii w kierunku kwaśnym można stwierdzić, że zachodzące w przegrzonym organizmie zmiany pH sprzyjają pobudzeniu peroksydacji. O możliwości pobudzenia wolnorodnikowego utleniania lipidów w czasie hipertermii świadczy także wykazane poprzednio w naszej pracowni obniżenie się w tych warunkach poziomu lipofilnych antyoksydantów w mózgu (Domańska-Janik i wsp. 1986). Badanie wpływu przebytej hipertermii na podatność tkanek mózgu na wolnorodnikowe utlenianie lipidów dało wyniki świadczące o złożonym mechanizmie regulacji tego procesu. Wzrost peroksydacji w układzie indukowanym przez jony  $\text{Fe}^{3+}$  i askorbinian znajduje wytłumaczenie w wykazanym w hipertermii obniżeniu poziomu lipofilnych antyoksydantów oraz we wzroście zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w mózgu, świadczącym o naruszeniu struktury błon (Domańska-Janik i wsp. 1986). Zaobserwowane w tej pracy, a także poprzednio (Domańska-Janik 1986), obniżenie spontanicznej retencji TBAR w homogenacie mózgu królika poddanego hipertermii może z kolei świadczyć o wyczerpaniu się w tym materiale, już w czasie hipertermii *in vivo*, puli substratów najbardziej podatnych na peroksydację, m.in. wielonienasyconych kwasów tłuszczowych. W efekcie nie dochodzi do lawinowego nagromadzenia się wolnych rodników i samopowieliania się procesu, za czym przemawia obserwowany brak sigmoidalnego przebiegu spontanicznej akumulacji TBAR w homogenatach z mózgow zwierząt poddanych hipertermii.

Wyniki tej pracy zgodne są więc z koncepcją zakładającą, że w przebiegu hipertermii dochodzi do aktywacji wolnorodnikowego utleniania lipidów mózgu. Pojawia się jednak pytanie, dlaczego temu procesowi towarzyszy obniżone, a nie zwiększone nagromadzenie końcowych produktów peroksydacji (Domańska-Janik i wsp. 1986; Łazarewicz, Gordon-Majszak 1986). Wydaje się, że efekt ten znajduje wyjaśnienie w zgodnym z prawem Van't Hoffa pobudzeniu metabolizmu w podwyższonej temperaturze, a więc i degradacji aldehydu malonylowego i innych substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym, będących produktami wolnorodnikowego utleniania lipidów. Należałoby założyć, że po 3 godz. hipertermii i związanej z nią peroksydacji lipidów dochodzi do wyczerpania puli substratów szczególnie podatnych na wolnorodnikowe utlenianie. Niezależnie od tego obniżenie zawartości TBAR w mózgu po 3 godz. hipertermii może być spowodowane zwiększonym usuwaniem tych produktów z mózgu na skutek znacznego wzrostu mózgowego przepływu krwi (Carlsson i wsp. 1976).

Postulowane pobudzenie wolnorodnikowego utleniania lipidów, obok wykazanego w tej pracy względnego niedotlenienia anemicznego, mogą stanowić elementy patomechanizmu odwracalnych zmian ultrastrukturalnych obserwowanych w badaniach mikroskopowo-elektronowych (Dydyk, Pluta 1984; Gajkowska i wsp. 1985; Loesch i wsp. 1985), a nawet mogą prowadzić do nieodwracalnych uszkodzeń neuronów (Gwóźdź i wsp. 1978).

#### WNIOSKI

1. W hipertermii trwającej 3 godz. dochodzi do zaburzeń składu morfotycznego i gazowego obwodowej krwi tętniczej, świadczących o upośledzeniu transportu do tkanek.

2. W hipertermii dochodzi do przesunięcia równowagi kwasowo-zasadowej w kierunku kwaśnym, co pobudza procesy wolnorodnikowego utleniania lipidów. Tkanki mózgu królika poddanego hipertermii wykazują zwiększoną podatność na indukowaną peroksydację lipidów.

3. Niedotlenienie anemiczne oraz pobudzenie peroksydacji mogą stanowić elementy mechanizmu prowadzącego do rozwoju zmian strukturalnych neuronów mózgu w hipertermii.

#### EFFECT OF HYPERTHERMIA ON BASIC PARAMETERS OF PERIPHERAL ARTERIAL BLOOD AND BRAIN CORTEX LIPID PEROXIDATION IN RABBIT

#### Summary

Rabbits were subjected to 3 h hyperthermia at ambient temperature of 38°—40°C. Selected physiological parameters of arterial blood were determined as well as the susceptibility of brain cortex homogenates to *in vitro* peroxidation and the

effect of pH on free radical lipid oxidation. It was found that hyperthermia leads to a significant decrease in hematocrit, number of erythrocytes and hemoglobin content in the blood. Hyperthermia also induced drop of oxygen content, an increase of  $p\text{CO}_2$  (with decreased  $\text{HCO}_3^-$  concentration and total  $\text{CO}_2$  content) and decrease of pH in the arterial blood. *In vitro* peroxidation of brain lipids was activated in acidic pH and inhibited at elevated pH values. Hyperthermia increased susceptibility of brain tissues to  $\text{Fe}^{3+}$  + ascorbate-induced *in vitro* lipid peroxidation, whereas the spontaneous process was inhibited. The presented results point to the possible participation of anemic hypoxia and elevated peroxidation in the pathomechanism of hyperthermia-induced structural changes in the brain.

#### ВЛИЯНИЕ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ НА ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ КРОВИ И ПЕРОКСИДАЦИЮ ЛИПИДОВ КОРЫ МОЗГА КРОЛИКА.

##### Резюме

Кролики подвергались 3-часовой гипертермии в температуре среды 38–40°C. Исследовались основные физиологические параметры периферической артериальной крови, а также влияние pH на окисление свободными радикалами липидов мозга кролика *in vitro* и влияние гипертермии на восприимчивость гомогенатов коры мозга на пероксидацию. Обнаружено, что гипертермия ведёт к понижению гематокрита, количества эритроцитов и количества гемоглобина в крови, к понижению содержания кислорода, понижению pH и повышению напряжения  $\text{CO}_2$ . Понижается и концентрация  $\text{HCO}_3^-$  и полное содержание  $\text{CO}_2$  в артериальной крови. Пероксидация липидов мозга *in vitro* возбуждалась в низком pH, а тормозилась в щелочной среде. Гипертермия вела к повышению восприимчивости тканей мозга к окислению липидов свободными радикалами индуцированному, системой  $\text{Fe}^{3+}$  с аскорбатам; вместо этого спонтанная пероксидация была в том материале понижена. Полученные результаты показывают возможность участия анемической гипоксии и увеличенных процессов пероксидации в патомеханизме структурных изменений мозга, вызванных перегреванием.

##### PIŚMIENNICTWO

1. Bouverot P., Gildwein G., Le Goff D.: Evaporative water loss, respiratory pattern, gas exchange and acid-base balance during thermal panting in Pekin ducks exposed to moderate heat. *Respir. Physiol.*, 1974, 21, 255–269.
2. Carlsson C., Hägerdal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001–1006.
3. Demopoulos H. B.: Control of free radicals in biologic systems. *Federation Proc.*, 1973, 32, 1903–1908.
4. Domańska-Janik K., Dąbrowiecki Z., Gordon-Majszak W., Strosznajder J.: Rabbit brain lipids during short-term hyperthermia. *Neurochem. Pathol.*, 1986 (w druku).
5. Dydyk L., Pluta R.: Wpływ wysokiej temperatury na ultrastrukturę kory mózgu i substancji białej podkorowej królika. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 97–115.
6. Gajkowska B., Loesch A., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. I. The supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 55–69.

7. Gębicki J. M., Bielski B. H. J.: Comparizon of the capacities of the perhydroxyl and the superoxide radicals to initiate chain oxidation of linoleic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, 103, 7020—7022.
8. Gwóźdź B., Dyduch A., Grzybek H., Panz B.: Structural changes in brain mitochondria of mice subjected to hyperthermia. *Exp. Path. Bd.*, 1978, 15, 124—126.
9. Kogure K., Watson B. D., Busto R., Abe K.: Potentiation of lipid peroxides by ischemia in rat brain. *Neurochem. Res.*, 1982, 7, 437—454.
10. Loesch A., Gajkowska B., Pluta R.: Effect of high ambient temperature on the hypothalamo-neurohypophysial system of the rabbit. II. The neurohypophysial axons. *Neuropat. Pol.*, 1985, 23, 71—81.
11. Łazarewicz J. W., Dąbrowiecki Z., Noremberg K., Pastuszko A., Rafałowska U., Wideman J.: Hipertermia a właściwości izolowanych zakończeń nerwowych kory mózgu królika. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 557—571.
12. Łazarewicz J. W., Gordon-Majszak W.: Wpływ hipertermii na transport wapnia i zawartość produktów peroksydacji lipidów we frakcjach subkomórkowych kory mózgu królika. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 545—556.
13. Maj St.: Badania krwinek czerwonych i hemoglobiny. W: Diagnostyka laboratoryjna w hematologii. Red. Śl. Pawelski, PZWL, Warszawa, 1977, 59—61.
14. Majewska M. D., Strosznajder J., Łazarewicz J.: Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res.*, 1978, 158, 423—434.
15. Mead J. F.: Free radical mechanisms in lipid peroxidation and prostaglandins. W: Free radicals in molecular biology, aging and disease. D. Armstrong, R. S. Sohal, R. G. Cutler, T. F. Slater Eds., Raven Press, New York, 1984, p. 53—66.
16. Millan N., Murdock L. L., Bleier R., Siegel F. L.: Effects of acute hyperthermia on polyribosomes *in vivo*, protein synthesis and ornithine decarboxylase activity in the neonatal rat brain. *J. Neurochem.*, 1979, 32, 311—317.
17. Pluta R.: Zmiany temperatury mózgu i wybranych okolic ciała królika oraz jego zachowania się w podwyższonej temperaturze otoczenia. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 435—444.
18. Samek D.: Coefficient of glucose consumption of the brain in hyperthermia. Correlation with arterial blood pressure and respiration. *Acta Physiol. Pol.*, 1966, 17, 740—754.
19. Samek D., Szulc A., Wieprzycki H.: Pyruvic acid concentration in blood flowing through the brain during hyperthermy in cats. *Acta Physiol. Pol.*, 1970, 21, 246—254.
20. Samek D., Szulc A., Wieprzycki H.: Lactic acid concentration in blood flowing through the brain of cats in hyperthermia. *Acta Physiol. Pol.*, 1971, 22, 61—69.
21. Samek D., Szulc A.: Glycogen concentration in the brain stem of mice in hyperthermia. *Acta Physiol. Pol.*, 1972, 23, 1005—1009.
22. Siesjö B. K.: Brain energy metabolism. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, New York, 1978.
23. Siesjö B. K., Bendek G., Koide T., Westerberg E., Wieloch T.: Influence of acidosis on lipid peroxidation in brain tissues *in vitro*. *J. Cereb. Blood Flow Metabol.*, 1985, 5, 253—258.
24. Siggaard-Andersen O.: The acid-base status of the blood. Munksgaard, Copenhagen, 1964.

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



JERZY W. ŁAZAREWICZ, WANDA GORDON-MAJSZAK

WPŁYW HIPERTERMII NA TRANSPORT WAPNIA  
I ZAWARTOŚĆ PRODUKTÓW PEROKSYDACJI LIPIDÓW  
WE FRAKCJACH SUBKOMÓRKOWYCH KORY MÓZGU KRÓLIKA \*

Zakład Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Obserwacje kliniczne oraz dane patofizjologiczne dostarczają dowodów na szczególną wrażliwość układu nerwowego na przegrzanie. Objawami udaru cieplnego są drgawki i śpiączka, a prowadzące do śmierci załamanie krążenia i oddychania wiąże się przyczynowo z wrażliwością na przegrzanie odpowiednich ośrodków w pniu mózgu (Shibolet i wsp. 1967; Samek, Szulc 1972; Shapiro i wsp. 1973; Siesjö 1978; Pluta 1984). Są podstawy do przypuszczenia, że funkcja zakończeń synaptycznych może być wybiórczo zaburzona w czasie hipertermii (Peterson, Prosser 1972). Jednym z ważnych elementów mechanizmu neurotransmisji jest wewnątrzkomórkowa homeostaza wapnia.

Organizm ssaków, a zwłaszcza mózg, jest chroniony przed przegrzaniem dzięki licznym mechanizmom zabezpieczającym, jednak prosty model hipertermii, polegający na kilkugodzinnej ekspozycji zwierzęcia na temperaturę otoczenia około 40°C, prowadzi do podwyższenia temperatury w różnych obszarach mózgu do 40—42°C (Pluta 1984). Jednakże, jak wykazano poprzednio (Łazarewicz i wsp. 1986), zakończenia synaptyczne kory mózgu cechują się względną odpornością na przegrzanie *in situ*, a zaburzenia funkcjonalne obserwowane w tym modelu doświadczalnym sprowadzają się do wzmożonego spoczynkowego pobierania <sup>45</sup>Ca przez synaptosomy. Z drugiej strony wyniki badań Domańskiej-Janik i wsp. (1986) sugerują, że w czasie hipertermii dochodzi do zaburzenia wolnorodnikowego utleniania lipidów mózgu.

Ponieważ przegrzanie mózgu prowadzi do inhibicji ATPaz błon synaptoplazmatycznych (Bowler, Tirri 1974), rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji i uszkodzenia struktury mitochondriów (Gwóźdź i wsp. 1970),

\* Praca finansowana przez PAN w ramach tematu T-7.

uznano za celowe zbadanie wpływu hipertermii na nagromadzenie i uwalnianie wapnia w różnych frakcjach subkomórkowych mózgu. Podjęto także badanie wybranych parametrów charakteryzujących procesy peroksydacji lipidów we frakcjach subkomórkowych mózgu, mające na celu wyjaśnienie udziału poszczególnych struktur w obserwowanych w hipertermii zaburzeniach wolnorodnikowego utleniania lipidów.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na królikach albinotycznych obu płci, o masie ciała około 3 kg. Przed doświadczeniem zwierzęta głodzono przez 12 godz.

Hipertermię wywoływano przez przetrzymywanie zwierząt w komorze termicznej o objętości ok.  $0,15 \text{ m}^3$  z temperaturą wnętrza utrzymaną w zakresie  $40,5 \pm 1^\circ\text{C}$ , a wilgotnością względną ok. 60%. Zwierzęta były poddawane przegrzaniu przez okres 3 godzin.

*Preparatyka frakcji subkomórkowych.* Natychmiast po doświadczeniu króliki uśmiercano przez zatrzymanie akcji serca wywołane dożylnym wstrzyknięciem 20% roztworu  $\text{MgSO}_4$  i perfuzję dosercową ochłodzonym roztworem Ringera. Pobierano mózgi do roztworu (temp.  $0^\circ\text{C}$ ), izolowano korę mózgu, którą poddawano homogenizacji w 9 objętościach 0,3 M sacharozy z 10 mM buforem tris-Cl pH 7,4 i 0,5 mM EDTA. Homogenat dzielono na dwie równe objętości służące do izolacji mitochondriów i synaptosomów. Mitochondria izolowano metodą Clarka i Nicklasa (1970), natomiast synaptosomy wg Hajosa (1975). Frakcje mikrosomów mózgu uzyskiwano przez wirowanie połączonych supernatantów ( $S_2$ ), uzyskanych po osadzeniu nie oczyszczonych frakcji mitochondriów i synaptosomów ( $P_2$ ), przez 1 godz. przy 105 000 g.

*Pobieranie  $^{45}\text{Ca}$  przez frakcje subkomórkowe.* Wyizolowane frakcje subkomórkowe mózgu inkubowano w środowiskach zawierających  $^{45}\text{CaCl}_2$ , jak opisano w legendach do tabel 1—3. Inkubację mitochondriów i mikrosomów przerywano przez dodanie pięciokrotnej objętości 0,15 M KCl, do zawiesiny zawierającej synaptosomy dodawano 0,15 M NaCl, po czym próby sączono pod ciśnieniem przez sączki Whatman GF/B, które przemywano 20 ml w.w. roztworów NaCl i KCl. Radioaktywność pozostająca na sączku była oznaczana w mieszaninie scyntylacyjnej Bray'a za pomocą licznika scyntylacyjnego Beckman LS 9000.

*Fluorescencja chlorotetracykliny.* Wiązanie wapnia do elementów hydrofobowych badanych struktur błonowych badano przy użyciu chlorotetracykliny (CTC) — hydrofobowej sondy chelatującej kationy dwuwartościowe (Caswell 1972; Łazarewicz i wsp. 1981). Fluorescencję mierzono przy 525 nm (długość fali światła wzbudzającego 380 nm) na spektrofлуorymetrze Aminco-Bowman. Przy obliczaniu wyników uwzględ-

Tabela 1. Wpływ hipertermii na fluorescencję chlorotetracykliny (CTC) i nagromadzenie  $^{45}\text{Ca}$  w mitochondriach kory mózgu królika  
 Table 1. Effect of hyperthermia on chlorotetracycline (CTC) fluorescence and  $^{45}\text{Ca}$  accumulation in rabbit brain cortex mitochondria

Substraty i inhibitory Substrates and inhibitors	Fluorescencja CTC CTC Fluorescence				Nagromadzenie $^{45}\text{Ca}$ $^{45}\text{Ca}$ accumulation	
	Szybkość zmian Rate of changes		Poziom w stanie równowagi Steady state level		nmole/mg białka/2 min nmoles/mg prot./2 min	
	jedn./mg białka/min units/mg prot./min		jedn./mg białka units/mg prot.		Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia
	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia
Glutaminian + jabłczan Glutamate + malate ( $7,5 \times 10^{-3}$ )	+75,9 ± 5,3	+50,0 ± 3,4 <sup>2</sup>	123,6 ± 7,4	95,3 ± 6,7 <sup>1</sup>	5,52 ± 0,12	4,75 ± 0,13 <sup>1</sup>
Bursztynian + rotenon Succinate + rotenone ( $10^{-2} - 5 \times 10^{-6}$ )	+126,0 ± 9,4	+86,1 ± 7,9 <sup>1</sup>	179,1 ± 7,5	151,9 ± 6,0 <sup>1</sup>	17,86 ± 0,06	18,30 ± 0,49
Bursztynian + rotenon + antymycyna A Succinate + rotenone + antimycin A ( $2 \times 10^{-6}$ )	-76,5 ± 14,7	-72,8 ± 2,6	24,8 ± 1,9	22,0 ± 2,0	2,15 ± 0,05	2,03 ± 0,20

Mitochondria (1 mg białka na próbę) były zawieszane w 3 ml środowiska zawierającego 250 mM sacharozę, 10 mM Tris-Cl, pH 7,4, 25 mM octan trisu pH 7,4, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ . W równoległe prowadzonych badaniach nagromadzenia  $^{45}\text{Ca}$  w środowisku inkubacyjnym obecne były 10  $\mu\text{M}$   $^{45}\text{CaCl}_2$  (0,1  $\mu\text{Ci}$  na próbę) oraz 1 mM fosforanu potasu pH 7,4. Po 2 min inkubacji w temp. 30°C i filtracji oznaczano  $^{45}\text{Ca}$  w mitochondriach. Wyniki stanowią średnie ± standardowy błąd średniej obliczone z 4 doświadczeń. <sup>1</sup>  $p < 0,05$ , <sup>2</sup>  $p < 0,01$  wg testu *t* Studenta

Mitochondria (1 mg prot. per sample) were suspended in 3 ml of 250 mM sucrose, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 25 mM Tris-acetate, pH 7.4, 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  and 10  $\mu\text{M}$  CTC. In parallel experiments with  $^{45}\text{Ca}$  uptake, incubation system contained also 10  $\mu\text{M}$   $^{45}\text{CaCl}_2$  (0.1  $\mu\text{Ci}$  per sample) and 1 mM potassium phosphate, pH 7.4.  $^{45}\text{Ca}$  accumulated in mitochondria was estimated after 2 min incubation at 30°C and subsequent filtration. The results are means ± SEM from 4 experiments. <sup>1</sup>  $p < 0.05$ , <sup>2</sup>  $p < 0.01$  by Student's *t* test

niano korektę na rozcieńczenie próby i na zmiany fluorescencji w ślepej próbie — nie zawierającej białka.

*Zawartość aldehydu malonylowego (MDA).* Oznaczanie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym w badanych próbach wykonywano metodą Slatera i Sawyera (1971) zmodyfikowaną przez Rehnronę i wsp. (1980). Wyniki wyrażano w nmolach MDA na mg białka, uwzględniając molowy współczynnik ekstynkcji MDA.

*Zawartość grup sulfhydrylowych.* Badanie związanych i nie związanych z białkami grup sulfhydrylowych we frakcjach subkomórkowych mózgu prowadzono metodą Sedlaka i Lindsay'a (1968). Oznaczano całkowitą zawartość grup -SH oraz grupy niebiałkowe, a zawartość grup sulfhydrylowych związanych z białkami obliczano z różnicy ich stężeń.

Białko oznaczano metodą Lowry z albuminą bydlęcą jako standardem.

## WYNIKI

### Nagromadzenie $^{45}\text{Ca}$ w mitochondriach i mikrosomach mózgu

Zdolność frakcji subkomórkowych do pobierania wapnia badano metodą radioizotopową. Jak wynika z danych przedstawionych w tabeli 1, glutaminian i jabłczan nie były optymalnymi substratami oddechowymi dla sprzężonego z transportem elektronów nagromadzenia wapnia w mi-

Tabela 2. Wpływ hipertermii na fluorescencję chlorotetracykliny (CTC) i nagromadzenie  $^{45}\text{Ca}$  w mikrosomach mózgu królika

Table 2. Effect of hyperthermia on chlorotetracycline (CTC) fluorescence and  $^{45}\text{Ca}$  accumulation in rabbit brain microsomes

	Szybkość zmian fluorescencji Rate of changes in fluorescence jedn./mg białka/min units/mg prot./min	Szybkość nagromadzenia $^{45}\text{Ca}$ Rate of $^{45}\text{Ca}$ uptake nmole/mg białka/min nmoles/mg prot./min	Maksymalne nagromadzenie $^{45}\text{Ca}$ Maximal $^{45}\text{Ca}$ uptake nmole/mg białka nmoles/mg prot.
Kontrola Control	+3.30±0.24	0.12±0.01	1.38±0.07
Hipertermia Hyperthermia	+3.13±0.34	0.11±0.01	1.08±0.07 <sup>1</sup>

Mikrosomy (1 mg białka na próbę) zawieszano w 3 ml 100 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM ATP oraz 10 μM CaCl<sub>2</sub> i 10 μM CTC lub 10 μM  $^{45}\text{CaCl}_2$  (0.1 μCi na próbę) i inkubowano przez 10 min w temp. 30°C.<sup>2</sup>

Wyniki stanowią średnie ± standardowy błąd średniej, obliczone z 4 doświadczeń. <sup>1</sup> p < 0.05 wg testu t Studenta

Microsomes (1 mg per sample) were suspended in 3 ml of 100 mM KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 10 μM CaCl<sub>2</sub> with 10 μM CTC or 10 μM  $^{45}\text{CaCl}_2$  (0.1 μCi per 2 sample) and incubated for 10 min at 30°C. The results are means ± SEM from 4 experiments. <sup>1</sup> p < 0.05 by Student's t test

tochondriach mózgu. W tych warunkach doświadczalnych mitochondria izolowane po hipertermii nagromadzały mniej wapnia niż mitochondria kontrolne. Transport  $^{45}\text{Ca}$  w mitochondriach sprzężony z utlenianiem bursztynianu (w obecności rotenonu) był wyższy niż w obecności glutaminianu i jabłczanu, a hipertermia nie miała wpływu na ten proces. Inhibicja łańcucha oddechowego przez antymycynę A prowadziła do zupełnego niemal zahamowania nagromadzania wapnia.

Badanie pobierania wapnia przez mikrosomy mózgu (tab. 2) nie wykazało istotnego wpływu hipertermii na szybkość nagromadzania  $^{45}\text{Ca}$ , stwierdzono natomiast znaczne obniżenie pojemności dla wapnia we frakcjach mikrosomów izolowanych po hipertermii.

#### Fluorescencja CTC w mitochondriach i mikrosomach mózgu

Chlorotetracyklina, chelatująca jony dwuwartościowe sonda fluorescencyjna, była stosowana do monitorowania względnej szybkości nagromadzania lub uwalniania Ca oraz oceny maksymalnej pojemności hydrofobowych rejonów błon mitochondrialnych dla wapnia.

Jak przedstawiono w tabeli 1 przyrost fluorescencji CTC (tworzenie kompleksu CTC-Ca w błonie) towarzyszy nagromadzeniu wapnia, natomiast spadek fluorescencji towarzyszy uwalnianiu wapnia z mitochondriów. Przebyta hipertermia upośledzała, zarówno szybkość przyrostu fluorescencji, jak i maksymalną fluorescencję osiąganą w stanie równowagi, przy czym efekt ten obserwowano zarówno w obecności glutaminianu i jabłczanu, jak i z bursztynianem, i rotenonem. Hipertermia nie miała natomiast istotnego wpływu na szybkość obniżenia fluorescencji po zahamowaniu łańcucha oddechowego przez antymycynę A, ani na osiągnięty minimalny poziom fluorescencji. Szybkość narastania fluorescencji CTC w mikrosomach mózgu nie była znamienne zmieniona po przebytej hipertermii.

#### Transport $^{45}\text{Ca}$ w synaptosomach mózgu

Badano nagromadzanie i uwalnianie  $^{45}\text{Ca}$  we frakcji synaptosomów kory mózgu. Synaptosomy inkubowano w typowym niskopotasowym środowisku jonowym, stąd też pobieranie  $^{45}\text{Ca}$  odzwierciedla bierną przepuszczalność błon synaptoplastmatycznych dla tego kationu. Stwierdzono (tab. 3), że synaptosomy izolowane po hipertermii nagromadzały w tych spoczynkowych warunkach o 72% więcej wapnia niż kontrolne. Z kolei uwalnianie uprzednio nagromadzonego  $^{45}\text{Ca}$  badano w środowisku bezwapniowym w obecności EGTA, a więc przy wyrównanym lub nawet odwróconym gradiencie stężeń wapnia wewnątrz i na zewnątrz synaptosomów. Wykazano, że większość dodatkowo nagromadzonej puli wapnia zostaje uwolniona z hipertermicznej frakcji synaptosomów już w czasie pierwszych trzech minut inkubacji, natomiast dynamika zaniku radioaktywności w późniejszym okresie nie różniła się od kontroli.

Tabela 3. Wpływ hipertermii na nagromadzenie i uwalnianie  $^{45}\text{Ca}$  z synaptosomów kory mózgu królika

Table 3. Effect of hyperthermia on  $^{45}\text{Ca}$  accumulation and efflux from rabbit brain cortex synaptosomes

	$^{45}\text{Ca}$ w synaptosomach po 10 min preinkubacji z $^{45}\text{Ca}$ , podczas inkubacji w środowisku bezwapniowym przez:			
	$^{45}\text{Ca}$ in synaptosomes after 10 min preincubation with $^{45}\text{Ca}$ upon incubation in Ca-free medium for:			
	0 min	3 min	5 min	10 min
	nmole/mg białka nmoles/mg protein			
Kontrola	5.40±0.15	3.14±0.04	2.54±0.03	1.42±0.03
Control				
Hipertermia	9.32±0.30 <sup>1</sup>	3.75±0.29	2.39±0.07	1.52±0.04
Hyperthermia				

Synaptosomy kontrolne i hipertermiczne (6 mg białka) zawieszano w 3,6 ml 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,24 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 20 mM Tris-Cl pH 7,4, z 10 mM glukozą oraz 1,3 mM  $^{45}\text{CaCl}_2$  (3  $\mu\text{Ci}$  na próbę) i preinkubowano przez 10 min w temp. 30°C. Po osadzeniu synaptosomów przez wirowanie osad zawieszano w środowisku inkubacyjnym bez Ca zawierającym 0,25 mM EGTA i inkubowano przy 30°C jak, przedstawiono w tabeli. Zawartość  $^{45}\text{Ca}$  w synaptosomach oznaczano po filtracji. Wyniki stanowią średnie  $\pm$  standardowy błąd średniej obliczone z 4 doświadczeń. <sup>1</sup>  $p < 0,001$  wg testu  $t$  Studenta

Control and hyperthermic synaptosomes (6 mg prot.) were suspended in 3.6 ml of 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,24 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4, 20 mM Tris-Cl, pH 7,4, 10 mM glucose and 1,3 mM  $\text{CaCl}_2$  (3  $\mu\text{Ci}$  per sample) and preincubated at 30°C for 10 min. Synaptosomes were pelleted by centrifugation, resuspended in Ca-free medium with 0,25 mM EGTA and incubated at 30°C as indicated.  $^{45}\text{Ca}$  content in synaptosomes was estimated after filtration. Results are means  $\pm$  SEM from 4 experiments. <sup>1</sup>  $p < 0,001$  by Student's  $t$  test

#### Zawartość MDA i -SH we frakcjach subkomórkowych mózgu

Dla ogólnej oceny aktywności procesów wolnorodnikowego utleniania lipidów we frakcjach subkomórkowych mózgu oznaczano zawartość substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (głównie aldehydu malonylowego), będących końcowymi produktami peroksydacji lipidów. Ponadto oznaczano zawartość endogennych antyoksydantów nielipidowych: grup sulfhydrylowych białkowych i niebiałkowych.

Jak przedstawiono w tabeli 4 poziom endogennej MDA różnił się dość znacznie w badanych, kontrolnych frakcjach subkomórkowych, najniższe stężenie wykazano w mitochondriach, a najwyższe w synaptosomach.

Statystycznie znamiennej wpływ hipertermii na zawartość MDA stwierdzono tylko w synaptosomach, w postaci około 15% obniżenia poziomu aldehydu malonylowego. Tendencja do obniżenia zawartości MDA w mikrosomach hipertermicznych oraz jego przyrostu w mitochondriach nie była znamiennej statystycznie. Przeżyta hipertermia nie miała również istotnego wpływu na zawartość grup tiolowych rozpuszczalnych (niebiałkowych) i białkowych we wszystkich badanych frakcjach subkomórkowych mózgu (tab. 5).

Tabela 4. Wpływ hipertermii na zawartość substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBAR) we frakcjach subkomórkowych kory mózgu królika

Table 4. Effect of hyperthermia on thiobarbituric acid reactive (TBAR) material in rabbit brain cortex subcellular fractions

Frakcja Fraction	Ilość dośw. No of expr.	Zawartość TBAR TBAR content		
		Kontrola Control nmole/mg białka nmoles/mg prot.	%	Hipertermia Hyperthermia % kontroli % of control
Mitochondria Mitochondria	5	0.25±0.06	100	169.0±39.0
Mikrosomy Microsomes	6	0.46±0.06	100	90.1±6.1
Synaptosomy Synaptosomes	4	0.62±0.14	100	85.8±1.4 <sup>1</sup>

Przed oznaczeniem TBAR mitochondria i mikrosomy były zawieszane w 0.15 M KCl a synaptosomy w środowisku inkubacyjnym opisanym w tabeli 3, nie zawierającym glukozy. Wyniki stanowią średnie ± standardowy błąd średniej. <sup>1</sup> p < 0.001 wg testu *t* Studenta dla sparowanych prób

Before TBAR determination mitochondria and microsomes were suspended in 0.15 M KCl, for synaptosomes the medium described in Tab. 3 (glucose free) was used. Results are means ± SEM. <sup>1</sup> p < 0.001 by Student's *t* test for paired samples

Tabela 5. Wpływ hipertermii na zawartość grup sulfhydrylowych (-SH) we frakcjach subkomórkowych kory mózgu królika

Table 5. Effect of hyperthermia on thiol (-SH) group content in subcellular fractions of rabbit brain cortex

Frakcja Fractions	Zawartość grup -SH (nmole/mg białka) -SH group content (nmoles/mg prot.)					
	Całkowite Total		Niebiałkowe Non-protein		Białkowe Protein	
	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia
Mitochondria Mitochondria	61.1±10.2	74.3±7.0	5.2±0.8	6.1±0.5	55.9±9.5	68.2±6.8
Mikrosomy Microsomes	77.2±2.7	78.3±3.7	6.9±0.5	7.4±0.6	70.3±2.7	70.9±3.8
Synaptosomy Synaptosomes	73.3±3.4	74.4±4.1	7.5±0.7	8.8±1.7	65.8±3.2	65.6±2.7

Frakcje subkomórkowe po izolacji były zawieszane jak opisano w tabeli 4 i natychmiast oznaczano zawartość grup -SH. Wyniki stanowią średnie ± standardowy błąd średniej z 5 doświadczeń. Wyniki uzyskane na materiale hipertermicznym nie różnią się znacząco od odpowiednich kontroli (p > 0.05 wg testu *t*-Studenta)

Subcellular fractions after isolation were suspended as described in Table 4 and thiol groups were detected immediately. Results are means ± SEM from 5 experiments. Results from hyperthermic samples do not differ significantly from corresponding controls (p > 0.05 by Student's *t* test)

## OMÓWIENIE

W obecnej pracy zastosowano wypróbowany w poprzednich badaniach model doświadczalny hipertermii, opisany szczegółowo przez Plutę (1984), zapewniający wzrost temperatury kory mózgu do około 40°C. Frakcje subkomórkowe mózgu były izolowane z użyciem metod zapewniających wysoki stopień oczyszczenia przy zachowaniu integralności metabolicznej i funkcjonalnej uzyskanych struktur. Jak wykazano poprzednio (Łazarewicz i wsp. 1986), hipertermia nie miała wpływu na rozkład białka i czystość uzyskanych frakcji subkomórkowych.

Badanie nagromadzania wapnia w mitochondriach i mikrosomach mózgu przeprowadzono z użyciem izotopu wapnia  $^{45}\text{Ca}$  oraz wrażliwej na wapń sondy fluorescencyjnej — chlorotetracykliny. Metoda izotopowa zapewnia możliwość obiektywnego pomiaru transportu wapnia w badanych strukturach subkomórkowych, jej mankamentem jest natomiast niemożność śledzenia w sposób ciągły dynamiki transportu i duże zużycie białka. Z tego względu zastosowano chlorotetracyklinę, której fluorescencja jest proporcjonalna do zawartości wapnia w hydrofobowych domenach błon (Caswell, Hutchison 1971). Mimo ograniczeń tej metody, jakimi są m.in. kompleksowanie z innymi jonami dwuwartościowymi, zwłaszcza  $\text{Mg}^{2+}$ , oraz interferencja fosforanu, była ona z powodzeniem stosowana przy badaniu transportu wapnia w mitochondriach, mikrosomach i synoptosomach (Caswell 1972; Caswell, Warren 1972; Łazarewicz i wsp. 1981).

Wyniki badania wpływu przegrzania na zdolność mitochondriów i mikrosomów mózgu do nagromadzania wapnia wskazują na upośledzenie transportu Ca w tych strukturach. Pobieranie  $^{45}\text{Ca}$  przez mitochondria przy utlenianiu glutaminianu i jabłczanu było znacznie słabsze niż w obecności bursztynianu i rotenonu. Jest to zgodne z naszymi poprzednimi obserwacjami (Łazarewicz, Hamberger 1977). Hipertermia powodowała hamowanie nagromadzania  $^{45}\text{Ca}$  tylko przy metabolizowaniu substratów związanych z NAD. Interesujące, że fluorescencja CTC-Ca w mitochondriach hipertermicznych nagromadzających wapń była znacznie niższa, zarówno w obecności glutaminianu i jabłczanu, jak i przy utlenianiu bursztynianu. Wyniki te mogłyby świadczyć o wybiórczym zaburzeniu w hipertermii wiązania wapnia przez hydrofobowe domeny błon mitochondrialnych.

Ze względów metodycznych przy badaniu fluorescencji CTC-Ca w mitochondriach konieczne było pominięcie fosforanu w medium inkubacyjnym (Caswell 1972). Przy nieobecności fosforanu pojemność mitochondriów dla nagromadzanego wapnia jest determinowana przez endogenne miejsca wiążące Ca na wewnętrznej powierzchni wewnętrznych błon mitochondrialnych. Brak wpływu hipertermii na uwalnianie wapnia z mitochondriów po zahamowaniu łańcucha oddechowego antymycyną



A może świadczyć o tym, że mechanizm zaburzenia nagromadzenia wapnia w mitochondriach polega nie na pobudzeniu wypływu Ca, ale raczej na pierwotnym zaburzeniu energizacji mitochondriów w hipertermii. Jest to zgodne z wykazaniem przez Gwoźdźcia i wsp. (1970) rozprężeniem oksydacyjnej fosforylacji i uszkodzeniem struktury mitochondriów mózgu w hipertermii.

Zaburzenia nagromadzenia wapnia w mikrosomach hipertermicznych ograniczało się do obniżenia maksymalnej pojemności tych struktur dla  $^{45}\text{Ca}$ , natomiast szybkość nagromadzenia wapnia mierzona metodą izotopową lub fluorymetryczną była nie zmieniona.

Zgodnie z poprzednimi wynikami (Łazarewicz i wsp. 1986) stwierdzono w tej pracy znaczne pobudzenie nagromadzenia wapnia w synaptosomach hipertermicznych. Efekt ten może świadczyć o zwiększonej biernej przepuszczalności błon synaptoplazmatycznych dla wapnia. Przemawia za tym także szybki wypływ wapnia z synaptosomów hipertermicznych poddanych inkubacji w środowisku bezwapniowym w obecności EGTA. Uzyskane wyniki wskazują na obniżenie zdolności mitochondriów i mikrosomów mózgu izolowanych po hipertermii do nagromadzenia wapnia oraz na wzrost przepuszczalności błon plazmatycznych dla wapnia. Może to być odbiciem upośledzenia homeostazy wapnia w komórkach OUN w hipertermii. Obserwowane zaburzenia transportu Ca mogą być także wtórnym efektem uszkodzenia błon badanych struktur subkomórkowych mózgu w czasie ich preparatyki, jeśli subfrakcje izolowane po hipertermii cechowałyby się bardziej labilną strukturą. Jak wykazały badania Domańskiej-Janik i wsp. (1986), w czasie hipertermii dochodzi do wzrostu zawartości wolnych kwasów tłuszczowych w błonach oraz do zmian w metabolizmie glikolipidów w mózgu, co może modyfikować fizykochemiczne właściwości błon.

Innym efektem hipertermii, stwierdzonym uprzednio na homogenatach całego mózgu (Domańska-Janik i wsp. 1986), było obniżenie zawartości aldehydu malonylowego oraz spadek antyoksydantów w mózgu. Oznaczenia zawartości MDA i grup tiolowych w różnych frakcjach subkomórkowych mózgu dały wyniki korespondujące z danymi uzyskanymi na nie frakcjonowanych homogenatach. Spadek poziomu MDA w synaptosomach hipertermicznych był znamieny statystycznie, a w mikrosomach po hipertermii stwierdzono tendencję do obniżenia MDA. W mitochondriach po hipertermii zaobserwowano tendencję do nagromadzenia MDA, wydaje się jednak, że ten ostatni wynik może być, przynajmniej częściowo, spowodowany wtórnymi efektami preparatyki. Zgodnie z wcześniejszymi danymi Domańskiej-Janik i wsp. (1986), nie stwierdzono związanych z hipertermią zmian zawartości grup -SH we wszystkich badanych frakcjach. Zaburzenia peroksydacji w hipertermii można także wiązać ze stresem nieuchronnie komplikującym przegrzanie zwierzęcia i wyrzutem katecholamin.

Uzyskane wyniki, rozpatrywane w powiązaniu z poprzednimi badaniami (Łazarewicz i wsp. 1986; Domańska-Janik i wsp. 1986), wskazują na istnienie zmian w strukturze i funkcji błon biologicznych kory mózgu w hipertermii, obejmujących zarówno błony plazmatyczne, jak i struktury wewnątrzkomórkowe. Jednakże zmiany te mają charakter ograniczony i szybko ustępują po przywróceniu normotermii.

CALCIUM TRANSPORT AND PRODUCTS OF LIPID PEROXIDATION  
IN BRAIN CORTEX SUBCELLULAR FRACTIONS  
OF RABBITS SUBMITTED TO HYPERTHERMIA

Summary

The effect of hyperthermia on calcium transport and the content of thiobarbituric acid-reactive material (TBAR) and thiol groups (-SH) in brain cortex subcellular fractions was studied in rabbits exposed for 3 h to ambient temperature of 40°C. Mitochondria isolated after hyperthermia exhibited a significant drop in <sup>45</sup>Ca accumulation linked to oxidation of glutamate and malate, whereas <sup>45</sup>Ca uptake with succinate + rotenone was not changed. Calcium accumulation was accompanied by an increase of chlorotetracycline (CTC) fluorescence, which was significantly lower in hyperthermic mitochondria. Hyperthermia exerted no effect on the rate of calcium efflux from deenergized mitochondria. A 20% drop in the capacity of hyperthermic microsomes for <sup>45</sup>Ca was noted. The uptake of <sup>45</sup>Ca by synaptosomes isolated from the brain cortex of rabbits submitted to hyperthermia was stimulated by 72%. This additionally accumulated pool of calcium was rapidly released from hyperthermic synaptosomes to Ca-free medium. A significant drop of TBAR content in hyperthermic synaptosomes was noted, whereas there was no change in TBAR in mitochondria and microsomes as well as in the level of -SH groups in all fractions tested. The results point to the modification of intracellular Ca homeostasis and diverse changes in lipid peroxidation in different brain subcellular fractions in hyperthermia.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ НА ТРАНСПОРТ КАЛЬЦИЯ  
И СОДЕРЖАНИЕ ЛИПИДОВ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ КОРЫ  
МОЗГА КРОЛИКА

Резюме

Исследовалось влияние перегревания, вызванного 3-часовым пребыванием кроликов в температуре 40°C на транспорт кальция и содержание субстанции реагирующей с тиобарбитуровой кислотой (ТВАР) и тиоловых групп (-SH) в субклеточных фракциях коры мозга *in vitro*. В митохондриях изолированных после гипертермии, выявлено статистически значимое понижение скопления <sup>45</sup>Са во время окисления глутамината и малоната, зато отбор <sup>45</sup>Са в присутствии сусцината и ротенона не изменилось. Накоплению кальция сопутствовало повышение флуоресценции хлортетрациклина (СТС) значительно более низкое в митохондриях после гипертермии. Перегревание не влияло на скорость выхода кальция из деэнергизированных митохондрий. Обнаружено 20% понижение для гипертермических микросом аккумуляции <sup>45</sup>Са. Синаптозома изолированные из коры мозга кроликов, под-

вергнутых гипертермии, проявляли 72% повужение накопления  $^{45}\text{Ca}$  в условиях покоя. Пул добавочно накопленного кальция освобождался быстро из гипертермических синаптозомов в бескальциевую среду. Обнаружено статистически значимое понижение содержания TBAR в фракции синаптозомов изолированных после гипертермии. Не было значительных изменений содержания TBAR в митохондриях и микросомах и уровня —SH во всех исследованных фракциях. Полученные результаты показывают модификацию внутриклеточного гомеостаза кальция и разнообразные изменения в процессах перекисидации липидов в разных субклеточных структурах мозга в гипертермии.

## PIŚMIENNICTWO

1. Bowler K., Tirri R.: The temperature characteristics of synaptic membrane ATPases from immature and adult rat brain. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 611—613.
2. Caswell A. H.: The migration of divalent cations in mitochondria visualized by a fluorescence chelate probe. *J. Membrane Biol.*, 1972, 7, 346—365.
3. Caswell A. H., Hutchison J. D.: Visualization of membrane bound cations by a fluorescent technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 42, 43—49.
4. Caswell A. H., Warren S.: Observation of calcium uptake by isolated synaptoplasmatic reticulum employing a fluorescent chelate probe. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 1757—1763.
5. Clark J. B., Nicklas W. J.: The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4724—4731.
6. Domańska-Janik K., Dąbrowiecki Z., Gordon-Majszak W., Strosznajder J.: Rabbit brain lipids during short-term hyperthermia. *Neurochem. Pathol.*, 1986 (w druku).
7. Gwóźdź B., Krause M., Dyduch A.: Investigations on oxidative phosphorylation in the brain tissue of animals subjected to high temperature. *Acta Physiol. Pol.*, 1970, 21, 239—245.
8. Hajos F.: An improved method for the preparation of synaptosomal fraction of high purity. *Brain Res.*, 1975, 93, 485—489.
9. Łazarewicz J. W., Hamberger A.: Respiration-linked limited calcium accumulation in brain mitochondria. II. Requirement for ATP and other factors. *Bull. Acad. Pol. Sci. Ser. sci. biol.*, 1977, 25, 623—631.
10. Łazarewicz J. W., Pastuszko A., Noremberg K., Bertoli E., Lewandowski W.: Effects of barbiturates on calcium metabolism in rat brain synaptosomes visualized by chlorotetracycline as a fluorescence chelate probe. *Cell. Mol. Biol.*, 1981, 27, 325—332.
11. Łazarewicz J. W., Dąbrowiecki Z., Noremberg K., Pastuszko A., Rafałowska U., Wideman J.: Hipertermia a właściwości izolowanych zakończeń nerwowych kory mózgu królika. *Neuropat. Pol.*, 1986, 24, 557—571.
12. Peterson R. H., Prosser C. L.: The effects of cooling on electrical responses of gold fish (*Carassius aurea* tus) central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1972, 42A, 1019—1029.
13. Pluta R.: Zmiany temperatury mózgu i wybranych miejsc ciała królika oraz jego zachowanie w temperaturze otoczenia 38—39°C. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 435—444.
14. Rehnrons S., Smith D. S., Åkesson B., Westerberg E., Siesjö B. K.: Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during  $\text{Fe}^{2+}$  — and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 1630—1638.
15. Samek D., Szulc A.: Glycogen concentration in the brain stem of mice in hyperthermia. *Acta Physiol. Pol.*, 1972, 23, 1005—1009.

16. Sedlak J., Lindsay R. H.: Estimation of total, protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.*, 1968, 25, 192—205.
17. Shapiro Y., Rosenthal T., Sohar E.: Experimental heat. A model in dogs. *Arch. Int. Med.*, 1973, 131, 688—692.
18. Shibolet S., Coll R., Gilat T., Sohar E.: Heatstroke: its clinical picture and mechanism in 36 cases. *Quart. J. Med.*, 1967, 36, 525—548.
19. Siesjö B. K.: Brain energy metabolism. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, New York, 1978.
20. Slater T. F., Sawyer B. C.: The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions *in vitro*. *Biochem. J.*, 1971, 123, 805—814.

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

JERZY W. LAZAREWICZ, ZBIGNIEW DĄBROWIECKI, KRYSZYNA NOREMBERG,  
ANNA PASTUSZKO, URSZULA RAFAŁOWSKA, JANUSZ WIDEMAN

## HIPERTERMIA A WŁAŚCIWOŚCI IZOLOWANYCH ZAKOŃCZEŃ NERWOWYCH KORY MÓZGU KRÓLIKA \*

Zakład Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Eksperymentalne przegrzanie zarówno u człowieka, jak i u zwierząt doświadczalnych, przybiera postać udaru cieplnego charakteryzującego się drgawkami i śpiączką oraz może prowadzić do śmierci wśród objawów załamania krążenia i oddychania (Frankel i wsp. 1963; Shibolet i wsp. 1967; Siesjö 1978). Obecnie przeważa pogląd, że bezpośrednia przyczyna zaburzeń oddechowo-krążeniowych nie jest pochodzenia obwodowego, ale wiąże się ze szczególną wrażliwością na przegrzanie odpowiednich ośrodków w pniu mózgu (Krause 1960; Samek, Szulc 1972; Pluta 1984). Już umiarkowana hipertermia jest związana z wystąpieniem szeregu objawów mózgowych, których nasilenie jest proporcjonalne do wzrostu temperatury. Przy temperaturach ciała przewyższających 40°C pojawiają się nudności, zaburzenia orientacji, apatia i delirium, a powyżej 42°C dochodzi do bezpośredniego termicznego uszkodzenia neuronów, którego nasilenie zależy od stopnia i czasu trwania hipertermii (Shapiro i wsp. 1973; Siesjö 1979).

Wzrost temperatury powyżej 40°C prowadzi do zaburzenia metabolizmu mózgu *in vivo* i *in vitro* (Siesjö 1978). Zużycie glukozy i tlenu przez mózg ulega gwałtownemu załamaniu przy temperaturze ciała powyżej 42°C (Samek 1966; Nemoto i wsp. 1970). Hipertermii towarzyszy wzrost poziomu glukozy, G-6-P, F-6-P i glutamianu w mózgu (Carlsson i wsp. 1976). Przegrzanie prowadzi do rozpadu polisomów i zahamowania biosyntezy białka w mózgu (Murdock i wsp. 1978; Heikkila, Brown 1979; Millan i wsp. 1979), inhibicji ATPaz błon synaptoplazmatycznych (Bowler, Tirri 1974), rozprężenia oksydacyjnej fosforylacji oraz uszkodzenia struktury mitochondriów (Gwóźdź i wsp. 1970). Są dane wskazujące na szczególną wrażliwość transmisji synaptycznej na temperaturę otoczenia

\* Praca finansowana przez PAN w ramach tematu T-7.

(Peterson, Prosser 1972) oraz na termolabilność izolowanych zakończeń synaptycznych mózgu *in vitro* (Whittaker 1969). Dane te, podobnie jak występowanie w stanach przegrzania mózgu objawów upośledzenia funkcji ośrodkowego układu nerwowego, mogą sugerować udział zaburzeń transmisji synaptycznej w patomechanizmie termicznego uszkodzenia mózgu.

Zaburzenia temperatury otoczenia są zarazem jednym z podstawowych czynników fizjologicznych wywołujących odpowiedź adaptacyjną organizmu. Zdolność organizmu do adaptacji jest w głównej mierze uwarunkowana zmianami adaptacyjnymi w ośrodkowym układzie nerwowym, a zwłaszcza w zakończeniach synaptycznych. Są dane wskazujące na udział fosfolipidów i gangliozydów błon synaptycznych w adaptacji do zmian temperatury (Rahmann i wsp. 1982).

Celem badań przeprowadzonych na frakcji wzbogaconej w izolowane zakończenia synaptyczne kory mózgu królika było określenie wpływu przegrzania *in vivo* na wybrane parametry metaboliczne i czynnościowe synaptosomów związane z mechanizmem neurotransmisji lub charakteryzujące ogólnie stan metaboliczny tej frakcji.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na dojrzałych królikach albinotycznych, obu płci, o masie ciała około 3 kg.

Hipertermię wywoływano w komorze termicznej o objętości 0,144 m<sup>3</sup>, z czego połowę stanowiła przestrzeń pozostawiona zwierzęciu do swobodnego poruszania się. Komora była wyposażona w regulację temperatury powietrza w zakresie do 60°C i wilgotności względnej od 25 do 100%. Pokrywa z pleksiglasu umożliwiała obserwację zwierzęcia i pomiary temperatury. Temperaturę mierzono przy użyciu termometrów rtęciowych w niedostępnej dla zwierzęcia części komory tuż przy nawiewie ogrzanego powietrza oraz w najdalszej części klatki zajmowanej przez królika. Higrometr włosowy umieszczony był w pobliżu wlotu powietrza. Po ustaleniu się temperatury w komorze różnica w odczytach obu termometrów kontrolnych nie przekraczała 2°C. Temperaturę komory doprowadzano na 1 godz. przed doświadczeniem do stabilnego poziomu około 40°C, po czym umieszczano w niej królika i utrzymywano temperaturę na poziomie 40 ± 1°C przy wilgotności względnej 55—60% przez okres 3 godzin.

Grupy doświadczalne obejmowały: a) zwierzęta kontrolne nie przegrzewane; b) króliki poddane 3 godz. hipertermii; c) zwierzęta, które po 3 godz. okresie przegrzewania przetrzymywano przez następne 3 godz. w warunkach normotermii (temperatura pokojowa).

*Izolacja frakcji subkomórkowych.* Jednoczesne wydzielenie z tkanki szeregu frakcji subkomórkowych — do badania rozkładu białka i aktyw-

ności IDH NADP — przeprowadzano metodą wirowania różnicowego według Whittakera i Burkera (1972), stosując jako materiał wyjściowy 10% homogenat półkul mózgu w 0,32 M sacharozie z 10 mM buforem Tris-HCl, pH 7,4 i 1 mM EDTA. Frakcja zawierająca jądra i resztki tkanki ( $P_1$ ) była osadzana przez wirowanie przy 1000 g przez 11 min, nie oczyszczoną frakcją mitochondriów ( $P_2$ ) i frakcją postmitochondrialną ( $S_2$ ) otrzymywano wirując nadsąc ( $S_1$ ) przy 12 000 g przez 30 min, frakcją mikrosomów (M) i cytosol ( $S_3$ ) otrzymywano przez wirowanie nadsąc  $S_2$  przez 1 godz. przy 105 000 g. Dalsze frakcjonowanie osadu  $P_2$  prowadzono zgodnie z opisaną niżej procedurą Bootha i Clarka (1978).

Frakcję wzbogaconą w zakończenia synaptyczne (synaptosomy) izolowano z półkul mózgu królika metodą flotacyjną Bootha i Clarka (1978) na gradiencie Ficollu. Procedura obejmowała ręczną homogenizację tkanki w środowisku zawierającym 0,32 M sacharozę, 1 mM EDTA z 10 mM buforem Tris-HCl, pH 7,4, izolację nie oczyszczonej frakcji  $P_2$  przez kolejne wirowania przez 3 min przy 1 300 g i przez 10 min przy 17 000 g, oczyszczenie frakcji przez wirowanie przez 30 min przy 98 000 g na gradiencie 7% i 12% Ficollu w medium izolacyjnym i ostateczne osadzenie uzyskanych frakcji wzbogaconych w mielinę (A), synaptosomy (B) i mitochondria (C) przy 17 000 g przez 10 min.

*Środowisko inkubacyjne.* Otrzymaną frakcją synaptosomów inkubowano w standardowym środowisku jonowym zawierającym 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM  $CaCl_2$ , 1,2 mM  $MgCl_2$ , 1,0 mM bufor fosforanowy pH 7,4, 10 mM bufor Tris-HCl, pH 7,4 i 10 mM glukozę.

Oddychanie synaptosomów mierzono w termostatowanym szczelnym naczyniu polarograficznym wyposażonym w mieszało magnetyczne, przy użyciu elektrody tlenowej typu Clarka z tlenomierzem N-5221 Mera-Elwro. Elektrode kalibrowano i aktywność oddechową określano wg Estabrooka (1967).

Nagromadzanie wapnia oznaczano metodą radioizotopową przez pomiar pobierania  $^{45}Ca$  przez synaptosomy inkubowane w temperaturze 30°C w podanym wyżej środowisku kontrolnym lub w medium depolaryzującym wysokopotasowym zawierającym 75 mM KCl i 50 mM NaCl. Próby ślepe zawierały synaptosomy inkubowane w temperaturze 0°C. Po zakończeniu inkubacji synaptosomy oddzielano od środowiska jonowego przez filtrację przez kolumnę 0,5 × 10 cm wypełnioną Dowex AG50 W-X8 20-50 mesh — według metody Gasko i wsp. (1976) i oznaczano radioaktywność nagromadzonego  $^{45}Ca$ .

*Nagromadzanie neurotransmiterów.* Pobieranie noradrenaliny, dopaminy i serotoniny oznaczano metodą radioizotopową szczegółowo opisaną przez Pastuszko i wsp. (1982). Synaptosomy zawieszono w standardowym, jonowym środowisku inkubacyjnym w stężeniu około 2 mg/ml inkubowano przez 5 min w temperaturze 30°C w obecności znakowanych trytem neurotransmiterów o stężeniu 0,4 μM przy aktywności specyficz-

nej 15—50 mCi/ $\mu$ mol. Po inkubacji synaptosomy oddzielano od środowiska jonowego przez wirowanie poprzez warstwę oleju silikonowego. Mierzono następnie radioaktywność w nadsączu i osadzie, uprzednio zsolubilizowanym za pomocą NCS. Nagromadzenie kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) mierzono przez inkubację synaptosomów w temperaturze 30°C przez 2 min w obecności 2,4  $\mu$ M  $^3$ H-GABA 80  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol i 10  $\mu$ M kwasu aminooksyoctowego, zakończoną sączeniem przez sączki Whatman GF/B.

*Uwalnianie  $^3$ H-GABA.* Wpływ i zależny od depolaryzacji wyrzut GABA z synaptosomów mierzono metodą superfuzji — jak opisano poprzednio (Łazarewicz i wsp. 1977). Endogenną pulę GABA wyznakowywano przez inkubację synaptosomów w temp. 30°C przez 15 min w obecności 10  $\mu$ M  $^3$ H-GABA 15  $\mu$ Ci/ $\mu$ mol i 10  $\mu$ M kwasu aminooksyoctowego. Po inkubacji synaptosomy osadzano przez wirowanie w ciągu 5 min przy 1000 g na sączek Whatman GF/B i umieszczano w komorze superfuzyjnej, przez którą tłoczono środowisko jonowe zawierające 10  $\mu$ M kwasu aminooksyoctowy z szybkością 1,2 ml/min. Synaptosomy depolaryzowano podając przez okres 10 min środowisko inkubacyjne zawierające 75 mM KCl. Próbkę medium superfuzyjnego zbierano co 1 min i mierzono radioaktywność w scyntylatorze Braya. Wyliczono szybkość uwalniania  $^3$ H-GABA z synaptosomów w procentach radioaktywności pozostającej w preparacie na minutę, a wpływ hipertermii wyrażono w procentach kontroli.

Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej oznaczano metodą spektrofotometryczną według Ochoa (1955) przez pomiar redukcji NADP przy 340 nm. Mieszanina inkubacyjna zawierała w 3 ml końcowej objętości 40 nmoli Tris-HCl, pH 6,7; 18  $\mu$ moli MgCl<sub>2</sub>, 0,6  $\mu$ moli izocytrynianu sodu, 0,5  $\mu$ mola NADP, białko od 0,8 do 1,5 mg. Czas pomiaru 5 min.

*Oznaczanie zawartości białka.* Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951), stosując jako standard albuminę surowiczą krwi bydlęcej (Fracja V).

Pomiary radioaktywności prób znakowanych  $^3$ H i  $^{45}$ Ca były dokonywane w liczniku scyntylacyjnym Beckman 9000 z użyciem scyntylatora Braya.

*Analiza statystyczna wyników.* Wyniki wyrażono jako średnie  $\pm$ SD. Liczbę doświadczeń (n) podano w nawiasach lub w legendach do tabel. Znamienność statystyczną poszczególnych różnic obliczano na podstawie testu *t* studenta, jako znamienne statystyczne przyjęto wartości  $p < 0,05$ .

*Odczynniki.* Albumina bydlęca, frakcja V, dopamina, EDTA, EGTA, GABA, kwas aminooksyoctowy, noradrenalina, serotonina były produkcji Sigma; Ficoll był produkcji Pharmacia. Znakowane trytem neurotransmitery były produkcji Amersham,  $^{45}$ CaCl<sub>2</sub> — IBJ, Świerk.



## WYNIKI

Badanie rozkładu białka w poszczególnych frakcjach subkomórkowych mózgu królika (ryc. 1) nie wykazało istotnego wpływu przegrzania na właściwości sedymentacyjne izolowanych frakcji. Zwraca uwagę zupełnie brak różnic w rozkładzie białka w podstawowych frakcjach izolowanych metodą wirowania różnicowego (ryc. 1A). Także procentowa zawartość białka we frakcjach synaptosomalnej (B) i mitochondrialnej (C) oczyszczonych na gradiencie Ficollu (ryc. 1B) zmieniała się zaledwie w granicach 1—2<sup>0</sup>%, a stwierdzone różnice w zawartości białka we frakcji mielinowej (A) nie były znamienne statystycznie.

Wyniki tabeli 1 przedstawiają wpływ przegrzania na aktywność specyficzną dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej w nie oczyszczonej frakcji mitochondrialnej (P<sub>2</sub>), oczyszczonej frakcji synaptosomów

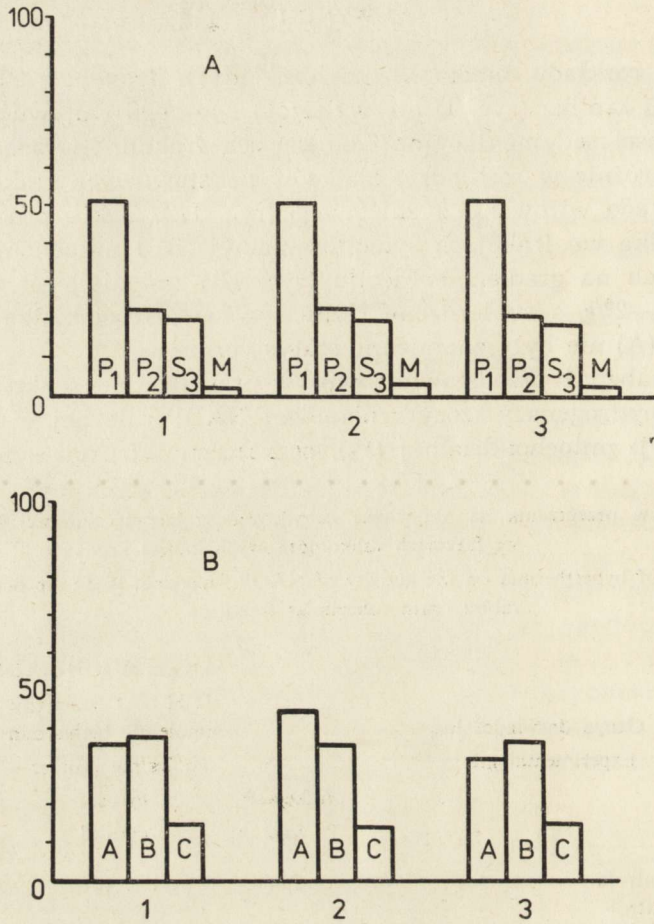
*Tabela 1.* Wpływ przegrzania na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej NADP-zależnej we frakcjach subkomórkowych mózgu królika

*Table 1.* Effect of hyperthermia on the activity of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in rabbit brain subcellular fractions

Nr dośw. No of expr.	Grupa doświadczalna Experimental group	Aktywność IDH-NADP		
		IDH-NADP activity		
		frakcja P <sub>2</sub> P <sub>2</sub> fraction	cytosol cytosol	synaptosomy synaptosomes
1.	Kontrola Control	7,50	2,10	2,00
	Hipertermia Hyperthermia	7,80	2,00	2,00
	3 godz. po hipertermii 3 h after hyperthermia	7,60	2,10	2,00
2.	Kontrola Control	9,21	3,07	5,40
	Hipertermia Hyperthermia	9,75	2,47	5,29
	3 godz. po hipertermii 3 h after hyperthermia	10,39	2,41	5,18
3.	Kontrola Control	8,21	2,40	2,62
	Hipertermia Hyperthermia	8,20	2,42	2,68
	3 godz. po hipertermii 3 h after hyperthermia	8,18	2,46	2,71

Dane z 3 indywidualnych doświadczeń. Każdy wynik stanowi średnią z 3 równoległych oznaczeń

Data from 3 individual experiments. Each result is a mean from 3 parallel determinations



*Ryc. 1.* Wpływ przegrzania na rozkład białka (%) we frakcjach subkomórkowych mózgu królika. Frakcje subkomórkowe otrzymywano zgodnie z opisem w Materiale i Metodach. Odzysk białek przy wirowaniu różnicowym (ryc. 1A) był równy 96%, a przy rozdziale na gradiencie Ficollu (ryc. 1B) wynosił ok. 90%. Zawartość białka odnieszono do całkowitej ilości białka w wyjściowym homogenacie (ryc. 1A) lub we frakcji P<sub>2</sub> (ryc. 1B). P<sub>1</sub> — jądra, resztki tkanki, P<sub>2</sub> — nie oczyszczona frakcja mitochondrialna, S<sub>3</sub> — cytosol, M — mikrosomy, A — mielina, B — synaptosomy, C — mitochondria. 1 — kontrola, 2 — hipertermia, 3 — normotermia 3 godz. po hipertermii. Średnie z 3 doświadczeń. SD nie przekraczało 10% wartości średniej. Różnice między średnimi nie są znamienne statystycznie.

*Fig. 1.* Effect of hyperthermia on protein distribution (%) in rabbit brain subcellular fractions. Subcellular fractions were isolated as described in Material and Methods. Protein recovery after differential centrifugation (Fig. 1A) was 96% and after Ficoll gradient separation reached 90% (Fig. 1B). The protein content was related to the total protein of the homogenate (Fig. 1A) or of the P<sub>2</sub> fraction (Fig. 1B). P<sub>1</sub> — nuclei, cell debris, P<sub>2</sub> — crude mitochondrial fraction, S<sub>3</sub> — cytosol, M — microsomes. A — myelin, B — synaptosomes, C — mitochondria. 1 — control, 2 — hyperthermia, 3 — normothermia 3 h after hyperthermia. Means from 3 experiments. SD did not exceed 10% of the mean. Differences between means are not statistically significant.

oraz w cytosolu mózgu królika. Aktywności wyjściowe badanego enzymu w homogenacie i frakcji P<sub>2</sub> były różne w poszczególnych doświadczeniach, jednakże analiza wyników indywidualnych doświadczeń wyraźnie wskazuje na brak wpływu przegrzania na aktywność tego enzymu w badanych frakcjach. Również aktywność całkowita IDH NADP nie ulega zmianie.

Dalsze badania prowadzono wyłącznie na oczyszczonej frakcji synaptosomów mózgu. Wpływ przegrzania na zużycie tlenu przez frakcję synaptosomów badano *in vitro* w środowisku nie zawierającym egzogennych substratów (oddychanie endogenne) oraz w obecności 10 mM glukozy lub 10 mM glukozy i 4 mM bursztynianu (tab. 2). Uzyskane frakcje wykazywały dość wysoką aktywność oddechową kosztem substratów endogennych, która ulegała nieznacznemu tylko pobudzeniu w obecności glukozy. Po dodaniu bursztynianu oddychanie synaptosomów wzrastało ponad dwukrotnie. Aktywność oddechowa synaptosomów w nieobecności substratów oddechowych oraz kosztem bursztynianu i glukozy w obu badanych grupach doświadczalnych — bezpośrednio i w 3 godz. po 3 godzinnej hipertermii — nie różniła się od wartości kontrolnych. Natomiast zużycie tlenu w obecności glukozy jako jedynego substratu metabolicz-

Tabela 2. Wpływ przegrzania na oddychanie frakcji synaptosomów mózgu królika  
Table 2. Effect of hyperthermia on the respiration of rabbit brain synaptosomal fraction

Substrat oddechowy Respiratory substrate	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia	Normotermia 3 godz. po przegrzaniu Normothermia 3 h after hyperthermia
	(zużycie tlenu — $\mu\text{g O}_2/\text{mg}$ białka/min) (oxygen consumption — $\mu\text{g O}_2/\text{mg}$ prot./min)		
Endogenne Endogenous	7,50±1,60 (4)	8,99±1,71 (5)	8,46±1,77 (5)
Glukoza 10 mM 10 mM glucose	7,70±0,48 (5)	9,99±2,20* (6)	11,19±3,16* (5)
Glukoza 10 mM+bursztynian 4 mM 10 mM glucose+ 4 mM succinate	20,08±2,96 (4)	20,53±2,75 (4)	18,86±2,50 (4)

Synaptosomy (4 mg białka) zawieszano w standardowym środowisku jonowym bez glukozy, po oznaczeniu szybkości oddychania endogennego kolejno dodawano substraty oddechowe. Objętość końcowa próby — 3,6 ml. Średnie  $\pm$ SD z ilości doświadczeń podanej w nawiasach.

\* Różnice między średnimi znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ )

Synaptosomes (4 mg prot.) were suspended in the standard ionic medium without glucose. After determination of endogenous respiration, the respiratory substrates were added consecutively. The final volume of sample was 3.6 ml. Means  $\pm$ SD from the number of experiments given in parenthesis. \* Statistically significant differences between means ( $p < 0.05$ )

nego było pobudzone w 30% w synaptosomach inkubowanych natychmiast po zakończeniu hipertermii i w 45% w synaptosomach izolowanych w 3 godz. po zakończeniu przegrzania.

Jak przedstawiono w tabeli 3, w wyniku 3 godz. hipertermii dochodzi do znamienego statystycznie 40% pobudzenia nagromadzania  $^{45}\text{Ca}$  w synaptosomach inkubowanych w warunkach kontrolnych. Natomiast nagromadzanie wapnia w środowisku depolaryzującym — wysokopotasowym nie różniło się w sposób znamieny statystycznie od wartości kontrolnych. Opisane zaburzenia transportu wapnia dotyczą jednak wyłącznie synaptosomów izolowanych z mózgu królika po 3 godz. hipertermii i są całkowicie odwracalne po następnych 3 godzinach.

Tabela 3. Wpływ przegrzania na nagromadzanie  $^{45}\text{Ca}$  w synaptosomach mózgu królika  
Table 3. Effect of hyperthermia on  $^{45}\text{Ca}$  uptake in rabbit brain synaptosomes

Środowisko inkubacyjne Incubation medium	Kontrola Control	Hipertermia Hyperthermia	Normotermia 3 godz. po przegrzaniu Normothermia 3 h after hyperthermia
		nmole/mg białka/1,5 min nmoles/mg prot./1,5 min	
Kontrolne Control (120 mM Na <sup>+</sup> , 5 mM K <sup>+</sup> )	8,41 ± 0,22	11,90 ± 1,00*	8,87 ± 0,91
Depolaryzujące Depolarizing (50 mM Na <sup>+</sup> , 75 mM K <sup>+</sup> )	15,22 ± 0,80	14,47 ± 1,96	15,89 ± 0,88

Frakcję synaptosomów inkubowano w medium jonowym kontrolnym lub wysokopotasowym przez 1,5 min w temp. 30°C w obecności 1,2 mM  $^{45}\text{Ca}$  (0,1 mCi/mmol), po czym oddzielano na kolumnie 0,5 × 10 cm wypełnionej Dowex AG-50 W-X8, 20–50 mesh. Średnie z 4 doświadczeń ± SD. \* Różnice między średnimi znamienne statystycznie (p < 0,05)

Synaptosomal fraction was incubated in the ionic medium, control or high potassium, for 1.5 min at 30°C in the presence of 1.2 mM  $^{45}\text{Ca}$  (0.1 mCi/mmol), then synaptosomes were separated on Dowex AG-50 W-X8, 20–50 mesh column, 0.5 × 10 cm. Means ± SD from 4 experiments. \* Statistically significant differences between means (p < 0.05)

Wyniki tabeli 4 przedstawiają wpływ oraz zależne od depolaryzacji uwalnianie  $^3\text{H}$ -GABA z synaptosomów, a także zdolność izolowanych zakończeń synaptycznych mózgu królika do pobierania tego neuroprzekaźnika. Nie stwierdzono znamienego statystycznie wpływu przegrzania na dynamikę spontanicznego wypływu oraz zależnego od depolaryzacji uwalniania  $^3\text{H}$ -GABA z synaptosomów, choć zarysowała się tendencja do

obniżenia spontanicznego wypływu  $^3\text{H}$ -GABA po 3 godz. hipertermii oraz do utrzymywania się wzmożonego wypływu GABA po zaprzestaniu depolaryzacji, zarówno po 3 godz. przegrzaniu, jak i w 3 godz. po przywróceniu normotermii. Jak wynika z tabeli 4, zdolność synaptosomów do

Tabela 4. Wpływ przegrzania na transport  $^3\text{H}$ -GABA w synaptosomach mózgu królika

Table 4. Effect of hyperthermia on  $^3\text{H}$ -GABA transport in rabbit brain synaptosomes

	Kontrola Control		Hipertermia Hyperthermia	Normotermia 3 godz. po przegrzaniu Normothermia 3 h after hyperthermia
Uwalnianie $^3\text{H}$ -GABA (w % kontroli, n = 7) $^3\text{H}$ -GABA release %/min (% of control, n = 7)				
Środowisko niskopotasowe, stan równowagi przed depolaryzacją Low potassium medium, steady state level before depolarization	1,55 ± 0,34	100	86,4 ± 9,0	104,7 ± 8,3*
Środowisko depolaryzujące, wysoko- potasowe High potassium, depolarizing medium	19,52 ± 2,15	100	107,2 ± 2,8	92,6 ± 14,2
Środowisko niskopotasowe, stan równowagi po depolaryzacji Low potassium medium, steady state level after depolarization	2,50 ± 0,62	100	109,7 ± 6,2	121,1 ± 14,3*
Nagromadzenie $^3\text{H}$ -GABA (nmole/mg białka/2 min) $^3\text{H}$ -GABA uptake (nmoles/mg prot./2 min)				
	0,216 ± 0,049 n = 6	100	99,5 ± 13,4 n = 5	86,1 ± 19,0 n = 5

Nagromadzenie i uwalnianie  $^3\text{H}$ -GABA badano — jak opisano w Materiale i Metodach. Wyniki stanowią średnie ± SD z ilości doświadczeń podanej w nawiasach. \*Różnice średnich są znamienne statystyczne ( $p < 0,05$ ) (test  $t$  dla wartości sparowanych)

$^3\text{H}$ -GABA uptake and release were studied as described in Material and Methods. Results are means ± SD from the number of experiments given in parentheses. \*Statistically significant differences between means ( $p < 0.05$ ) by the  $t$ -test for paired values

nagromadzenia  $^3\text{H}$ -GABA nie była zmieniona w obu grupach doświadczalnych w porównaniu z kontrolą. Nie stwierdzono także wpływu przegrzania na pobieranie przez synaptosomy innych neurotransmiterów: dopaminy, noradrenaliny i serotoniny (tab. 5).

Tabela 5. Wpływ przegrzania na pobieranie dopaminy (DA), noradrenaliny (NE) i serotoniny (5-HT) w synaptosomach mózgu królika

Table 5. Effect of hyperthermia on dopamine (DA), norepinephrine (NE) and serotonin (5-HT) uptake in rabbit brain synaptosomes

Neurotransmitter Neurotransmitter	Hipertermia Hyperthermia	Normotermia 3 godz. po hipertermii Normothermia 3 h after hyperthermia
	pobieranie (% kontroli) uptake (% of control)	
DA	109,2±8,1 (5)	104,3±6,2 (5)
NE	102,1±4,8 (4)	103,7±4,2 (5)
5-HT	98,6±10,1 (5)	106,1±7,0 (5)

Synaptosomy inkubowane przez 5 min w temp. 30°C w środowisku jonowym w obecność 0,4 μM neurotransmiterów znakowanych <sup>3</sup>H. Średnie ± SD z ilości doświadczeń podanej w nawiasach. Różnice między średnimi nie są znamienne statystycznie (p > 0,05)

Synaptosomes were incubated for 5 min at 30°C in the ionic medium in the presence of 0.4 μM neurotransmitters labeled with <sup>3</sup>H. Means ± SD from the number of experiments given in parentheses. Differences between means are not statistically significant (p > 0.05)

#### OMÓWIENIE

Zastosowany w tej pracy model doświadczalny hipertermii polegający na przetrzymywaniu królików przez 3 godz. w komorze termicznej o temperaturze powietrza około 40°C jest zgodny z warunkami doświadczeń prowadzonych przez Plutę (1984). Autor ten wykazał, że temperatura w mózgowiu królika wzrasta w czasie 3 godz. ekspozycji na przegrzanie z 37,6°C do 39,4°C w korze mózgu i do 41,9°C w podwzgórzu i nie ulega pełnej normalizacji w 4 godz. po przywróceniu prawidłowej temperatury otoczenia.

Wybór izolowanej frakcji zakończeń synaptycznych (synaptosomów) mózgu jako przedmiotu badań wynika z faktu, że frakcja ta zachowuje liczne morfologiczne, metaboliczne i funkcjonalne właściwości, charakteryzujące zakończenia synaptyczne *in situ* (Whittaker 1969; Bradford 1973; Levi, Raiteri 1976). Właściwości uzyskanej frakcji synaptosomów w dużej mierze zależą od metody preparatyki. Stosowana w tej pracy zmodyfikowana metoda Bootha i Clarka (1978) pozwala na izolację synaptosomów przewyższających homogennością i zachowaniem integralności metabolicznej frakcje synaptosomalne uzyskiwane innymi metodami (Deutsch, Rafałowska 1979; Rafałowska i wsp. 1980; Deutsch i wsp. 1981).

Przy interpretacji wyników badań prowadzonych na frakcjach komórkowych izolowanych w różnych stanach patologicznych należy uwzględnić możliwość zmiany właściwości sedymentacyjnych tych frak-

cji i zmniejszonego ich odzysku lub zanieczyszczenia innymi frakcjami. Efekt ten obserwowano w warunkach niedokrwienia mózgu (Rossowska, Zalewska 1979; Pylova i wsp. 1986). Wyniki uzyskane w tej pracy nie wykazały żadnych zmian w rozkładzie białka między różnymi frakcjami mózgu w hipertermii, co wskazuje na brak uchwytnych zaburzeń we właściwościach fizykochemicznych białek tych frakcji.

Ocenę wpływu hipertermii na aktywność enzymów przeprowadzono przez oznaczenia aktywności izocytrynianowej dehydrogenazy NADP-zależnej. Enzym ten wybrano do badań głównie dlatego, że lokalizowany on jest zarówno we frakcji rozpuszczalnej, jak i partykularnej mózgu (Rafałowska, Książak 1976) i odgrywa kluczową rolę w przemianach podstawowego substratu metabolicznego, cytrynianu, jak również w transporcie równoważników redukcyjnych przez błony mitochondrialne (Rafałowska 1976). Brak zmian w aktywności specyficznej i całkowitej tego enzymu w warunkach hipertermii wskazuje na dużą jego termostabilność. Również brak przemieszczenia IDH NADP z mitochondriów do cytosolu, które obserwowano np. w warunkach hipoksji (Rafałowska, Gromek 1975), świadczy o braku istotnych zmian w przepuszczalności błony mitochondrialnej.

Badania prowadzone *in vitro* na izolowanych zakończeniach synaptycznych dotyczące oddychania, nagromadzenia wapnia oraz uwalniania i nagromadzenia neurotransmiterów podjęte zostały z myślą o scharakteryzowaniu niektórych procesów warunkujących prawidłowy przebieg neurotransmisji chemicznej. Wyniki badania wpływu hipertermii na oddychanie synaptosomów mózgu królika wskazują na pobudzenie zużycia tlenu w obecności glukozy jako substratu metabolicznego. Przyspieszenie oddychania może być związane albo z rozprężeniem oksydacyjnej fosforylacji albo też przy zachowaniu sprzężeń metabolicznych ze zwiększonym zapotrzebowaniem na ATP. Za pierwszą ewentualnością przemawiają dane z piśmiennictwa, sugerujące rozprężenie oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach mózgu w hipertermii (Gwóźdź i wsp. 1970), natomiast brak wpływu przegrzania na zużycie tlenu w obecności bursztynianu jako substratu oddechowego wydaje się świadczyć o zachowanym sprzężeniu mitochondriów wewnątrzsynaptosomalnych. Zwiększone zapotrzebowanie hipertermicznych synaptosomów na ATP mogłoby się wiązać ze wzrostem przepuszczalności błon dla jonów, zwłaszcza dla sodu, wapnia, i z aktywacją w tych warunkach odpowiednich ATPaz. Hydroliza ATP i zwiększona produkcja ADP oraz nagromadzenie wapnia w mitochondriach synaptosomalnych może z kolei stymulować oddychanie. Efekt ten może się nie ujawnić przy maksymalnym pobudzeniu oddychania i produkcji ATP w obecności glukozy oraz bursztynianu jako substratów oddechowych.

Wykazane w tej pracy 40% pobudzenie spoczynkowego napływu wapnia do synaptosomów w hipertermii wydaje się przemawiać za zabu-

rzeniem barierowej funkcji błon synaptoplazmatycznych, biernym napływem jonów i aktywacją ATPaz jako przyczyną pobudzenia oddychania. Zwraca jednak uwagę fakt, że pobudzenie spoczynkowego wychwytu  $^{45}\text{Ca}$  występuje tylko w synaptosomach izolowanych z mózgu królika po 3 godz. hipertermii i jest całkowicie odwracalne po następnych 3 godz. normotermii. Nagromadzanie wapnia w środowisku wysokopotasowym, obrazujące zależny od depolaryzacji napływ wapnia do synaptosomów, nie ulega zmianie w hipertermii. Zgodnie z tą obserwacją nie stwierdzono także wpływu przegrzania na zależne od depolaryzacji i wapnia uwalnianie  $^3\text{H}$ -GABA z synaptosomów. Spontaniczny wypływ GABA z synaptosomów hipertermicznych nie był także w istotny sposób zmieniony. Na podstawie zwiększonej dyfuzji  $^{45}\text{Ca}$  do synaptosomów można było raczej oczekiwać pobudzenia uwalniania GABA w tych warunkach doświadczalnych. Wydaje się jednak, że wewnątrzsynaptosomalne mechanizmy wiążące wapń mogą skutecznie zapobiegać wzrostowi aktywności tego jonu w cytoplazmie, gdy pobudzenie biernej dyfuzji wapnia do komórek nie jest zbyt wielkie (Blaustein, Rasgado-Flores 1981). Sądzić należy, że mimo zwiększonego spoczynkowego wnikania wapnia do synaptosomów hipertermicznych poziom tego kationu w synaptoplazmie nie osiąga wartości niezbędnej do pobudzenia uwalniania neurotransmiterów.

W obecnej pracy nie stwierdzono wpływu hipertermii na zdolność frakcji synaptosomów do nagromadzania neurotransmiterów: GABA, dopaminy, noradrenaliny i serotoniny. Obserwacja ta może świadczyć o braku głębszych zaburzeń w metabolizmie energetycznym oraz równowadze elektrolitowej w badanej frakcji. Wiadomo, że zwrotny wychwyt neurotransmiterów jest procesem zależnym od energii, potencjału błonowego i gradientu stężeń sodu (Pastuszko i wsp. 1982).

Uzyskane wyniki wskazują na ograniczony charakter zmian czynnościowych synaptosomów izolowanych z kory mózgu królików poddanych hipertermii. Zaobserwowano jedynie pobudzenie odychania i wzrost biernego napływu wapnia do synaptosomów. Wyniki te świadczą o pewnym upośledzeniu barierowej funkcji błon synaptoplazmatycznych, które nie rzutuje jednak na zdolność synaptosomów do uwalniania i zwrotnego pobierania neurotransmiterów. Wpływ 3 godz. przegrzania na właściwości frakcji synaptosomów kory mózgu królika był więc mało istotny. Wyniki te nie świadczą o szczególnej termolabilności zakończeń synaptycznych *in vivo*. Jest to sprzeczne z opisaną przez Whittakera (1969) i obserwowaną także w naszej pracowni dużą wrażliwością izolowanych frakcji synaptosomów na przegrzanie *in vitro*. Sądzić można, że izolowane frakcje są bardziej labilne, podatniejsze na uszkadzające działanie czynników zewnętrznych, podczas gdy *in vivo* rozwijają się mechanizmy adaptacyjne i kompensacyjne, chroniące korę przed nadmiernym przegrzaniem skuteczniej niż inne obszary mózgu (Samek, Szulc 1972; Pluta 1984).



PROPERTIES OF BRAIN CORTEX NERVE ENDINGS ISOLATED  
FROM RABBITS EXPOSED TO HYPERTHERMIA

## Summary

The effect of hyperthermia *in vivo* on the synaptosomal fraction isolated from the brain cortex was studied in rabbits exposed to 40°C for 3 h and after 3 h of subsequent normothermia.

Hyperthermia appeared to be ineffective as regards protein distribution and the specific activity of IDH NADP in synaptosomes and other brain subcellular fractions. Hyperthermia did not change the respiration of synaptosomes with succinate, whereas oxygen uptake in the presence of glucose was stimulated in both experimental groups by 30 or 40% respectively. There was a 40% stimulation of <sup>45</sup>Ca uptake by hyperthermic synaptosomes incubated in control conditions, but their uptake of <sup>45</sup>Ca in depolarizing media did not differ from the control. Hyperthermia did not modify either spontaneous or depolarization-dependent <sup>3</sup>H-GABA release and the uptake of <sup>3</sup>H-GABA, <sup>3</sup>H-dopamine, <sup>3</sup>H-norepinephrine and <sup>3</sup>H-serotonine. Therefore, the results suggest a relative thermostability of the nerve endings of rabbit brain cortex *in situ*. The mild functional disturbances observed here did not affect processes basic for chemical transmission.

ГИПЕРТЕРМИЯ И СВОЙСТВА ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ  
КОРЫ МОЗГА КРОЛИКА

## Резюме

Исследовалось влияние гипертермии *in vivo* на свойства фракции синаптозмов коры мозга кролика непосредственно после 3-часового перегревания животных в температуре 40°C и 3 часа после окончания перегревания. Показано, что гипертермия не изменяет распределения белка и специфической активности IDH NADP в синаптозомах и других субклеточных фракциях мозга. Перегревание не влияло на дыхание синаптозмов за счёт сукцината, вместо этого употребление кислорода в присутствии глюкоза в обеих экспериментальных группах было возбуждено о 30 и 45% соответственно. Перегревание вызывает 40% повышение скопления <sup>45</sup>Ca синаптозомами, инкубированными в контрольной среде, тогда как нагрузка <sup>45</sup>Ca в условиях деполаризации не было модифицирована гипертермией. Не обнаружено также влияния перегревания на спонтанное и зависимое от деполаризации освобождение <sup>3</sup>H-GABA, а также на накопление синаптозомами <sup>3</sup>H-GABA, <sup>3</sup>H-допамина, <sup>3</sup>H-норадреналина и <sup>3</sup>H-серотонина. Получённые результаты свидетельствуют об относительной термостабильности нервных окончаний коры мозга кролика *in situ*. Наблюдаемые у экспериментальных животных незначительные функциональные нарушения не влияли на активность процессов, являющихся основой химической нейротрансмиссии.

## PIŚMIENICTWO

1. Blaustein M. P., Rasgado-Flores H.: The control of cytoplasmic free calcium in presynaptic nerve terminals. W: Calcium and phosphate transport across biomembranes. Red. F. Bronner, M. Peterlik, Acad. Press, New York, London, 1981, 53—58.

2. Booth R. F., Clark J. B.: A rapid method for the preparation of relatively pure, metabolically component synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.*, 1978, 176, 365—370.
3. Bowler K., Tirri R.: The temperature characteristics of synaptic membrane ATPases from immature and adult rat brain. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 611—613.
4. Bradford H. F.: Cerebral cortex slices and synaptosomes: in vitro approaches to brain metabolism. W: *Methods in Neurochemistry*, vol. 3. Red. R. Fried, M. Dekker Inc., New York 1973, 155—202.
5. Carlsson G., Hägerdal M., Siesjö B. K.: The effect of hyperthermia upon oxygen consumption and upon organic phosphates, glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates and associated amino acids in rat cerebral cortex. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 1001—1006.
6. Deutsch C., Drown C., Rafałowska U., Silver I. A.: Synaptosomes from rat brain: Morphology, compartmentation and transmembrane pH and electrical gradients. *J. Neurochem.*, 1981, 36, 2063—2072.
7. Deusch C., Rafałowska U.: Transmembrane electrical potential measurements in rat brain synaptosomes. *FEBS Lett.*, 1979, 108, 274—278.
8. Estabrook R. W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. W: *Methods in Enzymology*, vol. 10, Oxidation and Phosphorylation. Red.: R. W. Estabrook, M. E. Pullman. Acad. Press, New York, London 1967, 41—47.
9. Frankel H. M., Ellis J. P., Cain S. M.: Development of tissue hypoxia during progressive hyperthermia in dogs. *Amer. J. Physiol.*, 1963, 205, 733—737.
10. Gasko O. D., Knowles A. F., Shertzer H. G., Suolinna E. M., Racher E.: The use of ion exchange resins for study in ion transport in biological systems. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 57—65.
11. Gwóźdź B., Krause M., Dyduch A.: Investigations on oxidative phosphorylation in the brain tissue of animals subjected to high temperature. *Acta Physiol. Pol.*, 1970, 21, 239—245.
12. Heikkilä J. J., Brown J. R.: Hyperthermia and disaggregation of brain polyosomes induced by bacterial pyrogen. *Life Sci.*, 1979, 25, 347—352.
13. Krause M.: O wpływie wysokiej temperatury na ośrodkowy układ nerwowy w świetle badań doświadczalnych. *Med. Pracy*, 1960, 11, 341—351.
14. Levi G., Raiteri M.: Synaptosomal transport processes. *Int. Rev. Neurobiol.*, 1976, 19, 51—74.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
16. Łazarewicz J. W., Kanje M., Sellström Å., Hamberger A.: Calcium fluxes in cultures and bulk isolated neuronal and glial cells. *J. Neurochem.*, 1977, 29, 495—502.
17. Millan N., Murdock L. L., Bleier R., Siegel F. L.: Effects of acute hyperthermia on polyribosomes, *in vivo* protein synthesis and ornithine decarboxylase activity in the neonatal rat brain. *J. Neurochem.*, 1979, 32, 311—317.
18. Murdock L. L., Berlow S., Colwell R. E., Siegel F. L.: The effects of hyperthermia on polyribosomes and amino acid levels in infant rat brain. *Neurosci.*, 1978, 3, 349—357.
19. Nemoto E. M., Frankel H. M.: Cerebral oxygenation and metabolism during progressive hyperthermia. *Amer. J. Physiol.*, 1970, 219, 1784—1788.
20. Ochoa S.: Isocitric dehydrogenase system (TPN) from pig heart. W: *Methods in Enzymology*, vol. 1. Red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan. Acad. Press, New York 1955, 699—704.
21. Pastuszko A., Wilson D. F., Erecińska M.: Energetics of gamma-aminobutyrate transport in rat brain synaptosomes. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 7514—7519.

22. Pastuszko A., Wilson D. F., Erecińska M.: Neurotransmitter metabolism in rat brain synaptosomes. The effect of anoxia and pH. *J. Neurochem.*, 1982, 38, 1657—1667.
23. Peterson R. H., Prosser C. L.: The effects of cooling on electrical responses of gold fish (*Carassius aurea tus*) central nervous system. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1972, 42 A, 1019—1029.
24. Pluta R.: Zmiany temperatury mózgu i wybranych miejsc ciała królika oraz jego zachowanie w temperaturze otoczenia 38—39°C. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 435—444.
25. Pylova S. I., Rafałowska U., Łazarewicz J. W.: Effects of ischemia on the protein distribution pattern in gerbil brain subcellular fractions. *Resuscitation*, 1986, 13, 265—273.
26. Rafałowska U.: Wewnątrzkomórkowa regulacja metabolizmu cytrynianu. *Postępy Biologii Komórki* 1976, 3, 4, 325—342.
27. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F.: Energy metabolism in rat brain synaptosomes from nembutal anesthetized and unanesthetized animals. *J. Neurochem.*, 1980, 34, 1380—1386.
28. Rafałowska U., Gromek A.: Effect of oxygen deficiency and barbiturate anesthesia on citrate oxidation in brain cytoplasm. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 229—239.
29. Rafałowska U., Książak H.: Subcellular localization of enzymes oxidizing citrate in the rat brain. *J. Neurochem.*, 1976, 27, 813—815.
30. Rossowska M., Zalewska T.: Effect of hypoxia and ischemia on the distribution of protein in brain cellular fractions. *Neurochem. Res.*, 1979, 4, 15—23.
31. Samek D.: Coefficient of glucose consumption of the brain in hyperthermia. Correlation with arterial blood pressure and respiration. *Acta Physiol. Pol.*, 1966, 17, 740—754.
32. Samek D., Szulc A.: Glycogen concentration in the brain stem of mice in hyperthermia. *Acta Physiol. Pol.*, 1972, 23, 1005—1009.
33. Shapiro Y., Rosenthal T., Sohar E.: Experimental heatstroke. A model in dogs. *Arch. Int. Med.*, 1973, 131, 688—692.
34. Shibolet S., Coll R., Gilat T., Sohar E.: Heatstroke: its clinical picture and mechanism in 36 cases. *Quart. J. Med.*, 1967, 36, 525—548.
35. Siesjö B. K.: Brain energy metabolism. John Wiley and Sons Ltd, Chichester, New York 1978.
36. Whittaker V. P.: The synaptosome. W: *Handbook of Neurochemistry*, vol. 2, Structural neurochemistry. Red. A. Lajtha, Plenum Press, New York, London, 1969, 327—364.
37. Whittaker V. P., Burker L. A.: The subcellular fractionation of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. W: *Methods in Neurochemistry*, vol. 2. Red. R. Fried, M. Dekker Inc., New York, 1972, 1—52.

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

JÓZEF SZCZECH, ANTONI GODLEWSKI

APPRAISAL OF BLOOD VESSELS IN THE RAT BRAIN  
FOLLOWING ADMINISTRATION OF NITROSOUREA  
DERIVATIVES \*

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

Alkyl derivatives of nitrosourea (BCNU, CCNU, MeCCNU) used in oncologic chemotherapy are generally thought to be free of toxic effects on the central nervous system, when applied in therapeutic doses (Young, Posner 1979; Strian, Maurach 1981; Goldberg et al. 1982; Ilsen, Heiss 1985).

Our earlier studies have demonstrated that administration of BCNU and CCNU to rats, in doses corresponding to those used in clinical practice, results in several morphological alterations in the brain (Maziarz, Szczech 1984; Szczech, Godlewski 1986), precipitated most probably by injury to cerebral blood vessels.

The observed alterations have provided grounds for undertaking the present study, involving attempts to appraise alterations in cerebral blood vessels of the rat which appear as a result of multiple administration of alkyl nitrosourea derivatives.

MATERIAL AND METHODS

Studies were performed on adult Wistar rats of either sex, 260 to 400 g in body weight. Cytostatic drugs were given four times, at weekly intervals, in doses resembling average doses used in oncologic chemotherapy. BCNU (Nitrumon, Simes, Italy) was given intraperitoneally in doses of 7.5 mg, CCNU (CECENU, Bellon, France) was administered intragastrically, in oil suspension, in doses of 2.5 mg and 5 mg (the last dose). The experimental animals were divided into two groups; of which one was used for studies on permeability of the blood-brain barrier, while the other for estimation of histoenzymatic activity in cerebral

---

\* Work supported by Polish Academy of Sciences (Grant No. 10.4.05.3.3).

blood vessels. Control groups consisted of rats which received four one-week spaced intragastric doses of 1 ml cooking oil or intraperitoneal injections of 0.5 ml saline.

#### Studies on permeability of blood-brain barrier

Seven days after administering the last dose of a cytostatic drug to experimental rats and placebo to control rats, 1 ml of 2‰ Evans blue in saline was injected into the femoral vein. Another group of experimental and control animals received an injection into the femoral vein of 1 ml bovine albumin (Sigma) labelled with fluorescein isothiocyanate (FITC, Chemapol) according to the Clark and Shepard (1963) dialysis technique. The solution contained 42.6 mg albumin per 1 ml and the fluorescein-albumin ratio, determined spectrophotometrically, was 1.2.

The animals were sacrificed 30 min after injection of the labels. The brains were fixed in Baker's solution at room temperature and embedded in paraffin. The deparaffinated sections were mounted in glycerogel and examined under a Fluoval fluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena) using an excitation filter B224g and restricting filter G249.

#### Histo enzymatic studies with application of computer analysis of microscope images

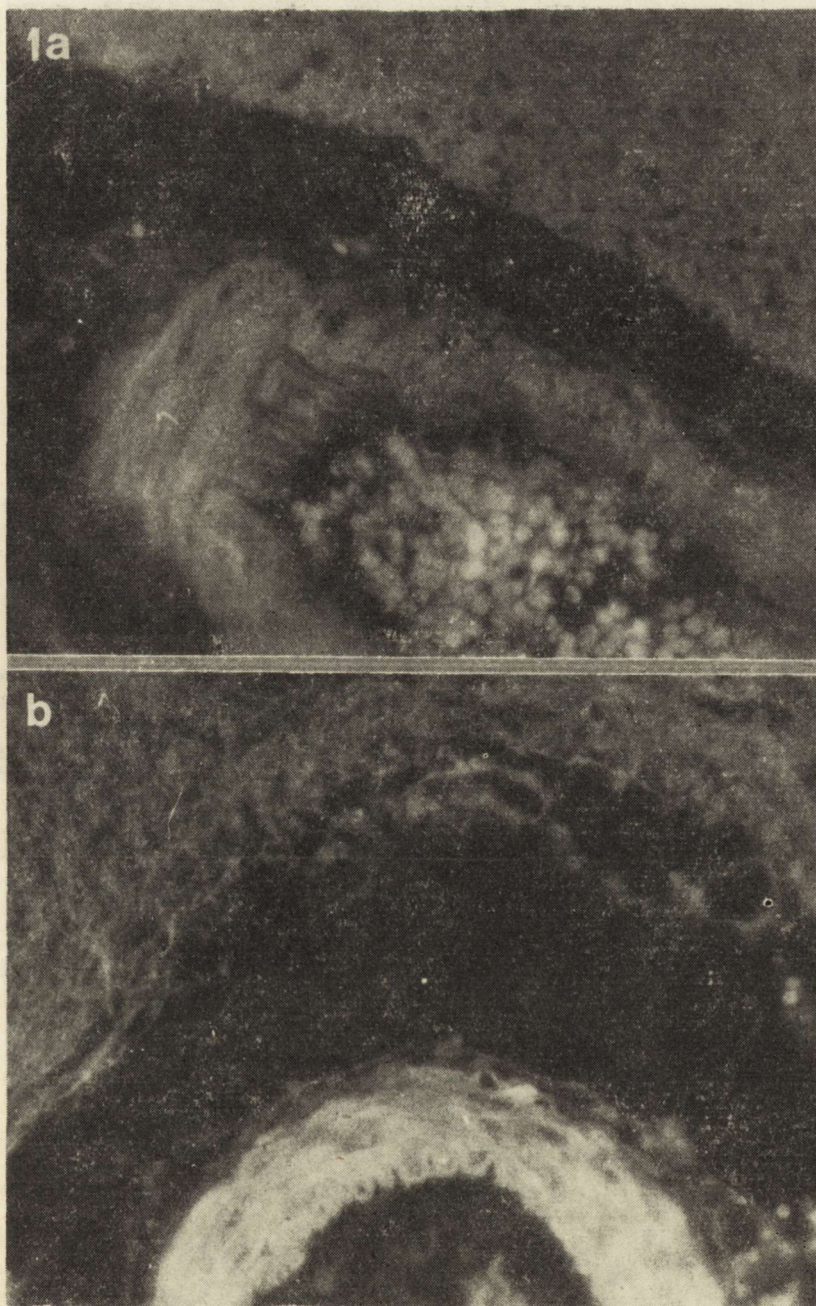
The brains of experimental and control animals were fixed in Baker's solution for 16 h at 4°C. Enzymatic activity of cholinesterase (ChE, E.L. 3.1.1.8) was determined according to the technique of Koelle in the modification of Gerebtzoff (1953). Duration of incubation at 37°C was 180 min. The sections were mounted in glycerogel and the relative area occupied by blood vessels showing positive reaction for ChE was estimated in the parietal cortex, lateral-dorsal part of the thalamus and in corpus callosum.

Measurements were performed using the automatic microscope image analyzer Morphoquant (Carl Zeiss, Jena) coupled to a KSR 4100 computer (Agadshanian et al. 1977; Voss et al. 1979), under white light, at 50 fields. The area of a single measuring field was 4200  $\mu\text{m}^2$ . The results obtained in control and experimental sections were compared using the non-parametric test of Kolmogorov-Smirnov (Greń 1982).

### RESULTS

#### Studies on permeability of blood-brain barrier

In sections originating from brains of control animals given supravitaly Evans blue or albumin-FITC complex, intense fluorescence was noted mainly in the blood vessel lumen and was related to morphotic blood elements. Faint fluorescence was observed in the walls of larger blood vessels (Fig. 1a) but their elastic membrane showed no fluores-



*Fig. 1a.* Nonspecific weak fluorescence of basal artery wall in the rat brain from control group. Evans blue.  $\times 240$

*Ryc. 1a.* Slaba nieswoista fluorescencja ściany tętnicy podstawnej mózgu szczura grupy kontrolnej. Błękit Evansa. Pow.  $240 \times$

*Fig. 1b.* Fluorescence of basal artery wall in the rat brain after administering BCNU. Evans blue.  $\times 240$

*Ryc. 1b.* Fluorescencja ściany tętnicy podstawnej mózgu szczura po podawaniu BCNU. Błękit Evansa. Pow.  $240 \times$



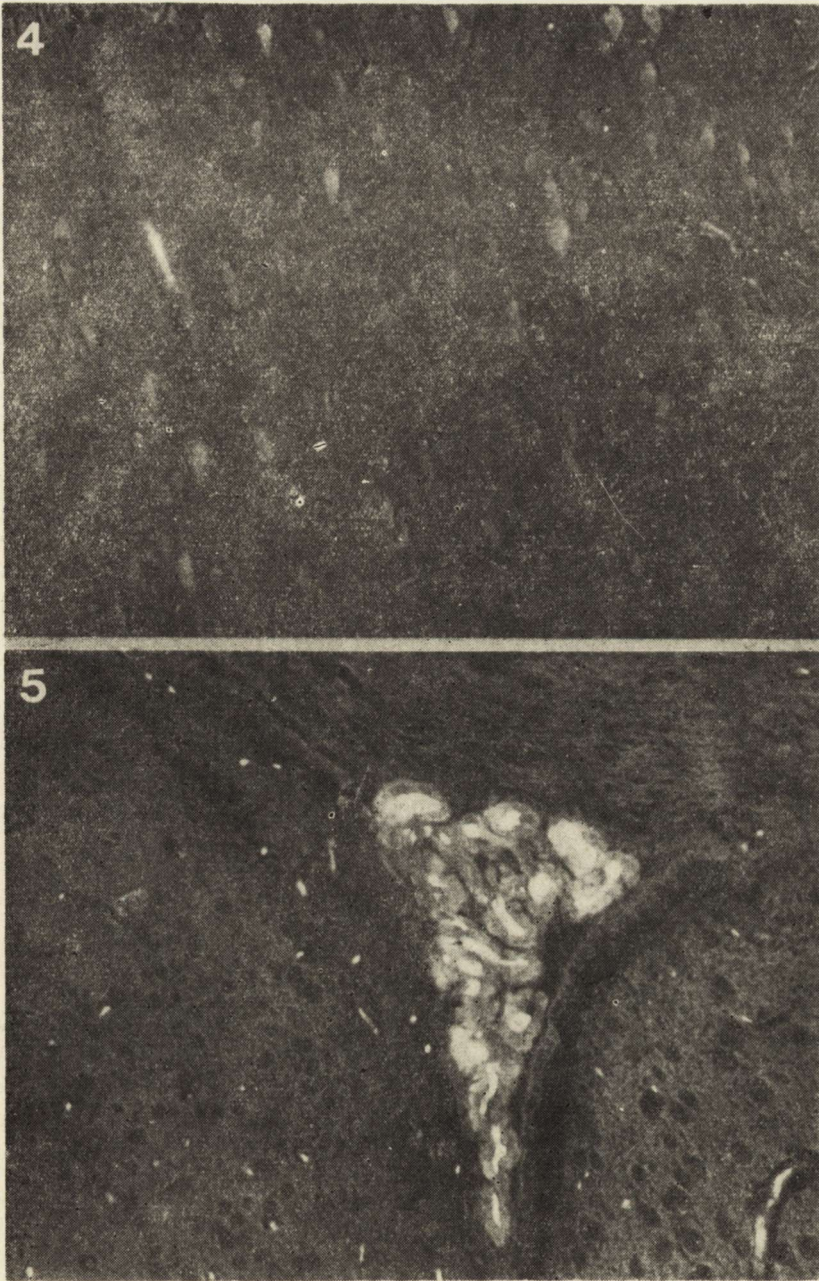
*Fig. 2.* Fluorescence of nerve cells in the dorsal pons region. Intense fluorescence of erythrocytes in a small hemorrhagic focus and in the lumen of the 4th ventricle. Rat given CCNU. FITC-albumin.  $\times 240$

*Ryc. 2.* Fluorescencja komórek nerwowych grzbietowej części mostu. Intensywna fluorescencja erytrocytów w niewielkim ognisku krwotocznym i w świetle IV komory. Szczur po CCNU. FITC-albumina. Pow.  $240 \times$



*Fig. 3.* Fluorochrome passage to blood vessel surroundings. Parietal cortex. Rat given BCNU. FITC-albumin.  $\times 120$

*Ryc. 3.* Przechodzenie fluorochromu do otoczenia naczyń krwionośnych. Kora ciemieniowa. Szczur po BCNU. FITC-albumina. Pow.  $120 \times$



*Fig. 4.* Fluorescence of nervous cell cytoplasm in gyrus cinguli cortex. Rat given BCNU. FITC-albumin.  $\times 240$

*Ryc. 4.* Fluorescencja komórek nerwowych kory zakrętu obręczy. Szczur po BCNU. FITC-albumina. Pow.  $240 \times$

*Fig. 5.* Choroid plexus of the lateral ventricle. Fluorescence of epithelial cells. Rat given BCNU. FITC-albumin.  $\times 120$

*Ryc. 5.* Splot naczyniówkowy komory bocznej mózgu. Fluorescencja komórek nabłonkowych. Szczur po BCNU. FITC-albumina. Pow.  $120 \times$



cence. Occasionally the fluorescence was seen in the cytoplasm of individual neurocytes, mainly in the olfactory cortex and in hypothalamic neurocytes, in the vicinity of the 3rd ventricle. In the cerebellum of control rats faint fluorescence was seen in some Purkinje and granular cells. In the choroid plexus, similarly to blood vessels, fluorescence exhibited morphotic blood elements.

In both experimental groups, i.e. after administration of either BCNU or CCNU, visible fluorochrome passage was noted beyond the vascular bed into the surrounding nervous tissue. In large blood vessels, delicate fluorescence encompassed the whole thickness of vascular walls and was noticeable in the elastic membrane (Fig. 1b). In several regions of the brain and brain ventricles, extravascular erythrocytes, strongly labeled with fluorochromes were noted (Fig. 2). Penetration of FITC-labelled albumin is illustrated in Fig. 3 while fluorescence of neurocyte cytoplasm is exemplified in Fig. 4. Similarly to intracerebral blood vessels, the choroid plexus in brain ventricles of experimental animals showed distinctly increased permeability of the applied markers. The vascular plexus of the 3rd ventricle after administrating Evans blue to experimental animals and staining with the label of the plexus epithelium cells and of their connective tissue sublayer are shown in Fig. 5. A similar phenomenon was noted after injecting labelled albumin. In some experimental animals, Evans blue passage to the white matter was noted with visible fluorescence of transverse nerve fibers of the striatum and pons. No differences were noted in alterations which would reflect the type of the applied cytostatic drug.

#### Histoenzymatic studies with the use of computer analysis of microscope images

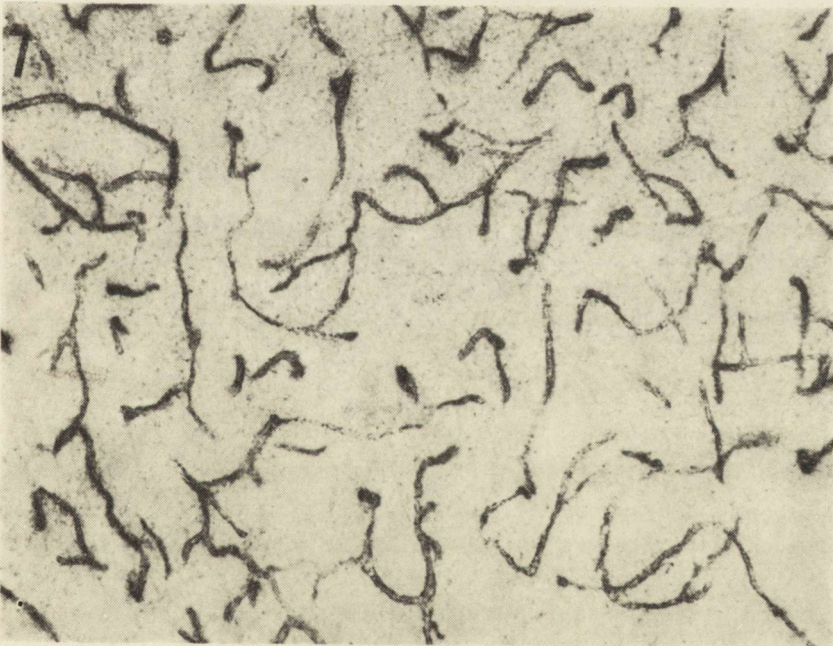
In the control group the enzymatic reaction for cholinesterase was present exclusively in the basal membrane of blood vessels. The enzymatic reaction varied between different sites: the strongest reaction for ChE was seen in blood vessels of subcortical structures. A less intense reaction was observed in the corpus callosum, the pons, white matter of the cerebellum and relatively last intense one, in the cerebral and cerebellar cortex.

In the two experimental groups, localization of the enzymatic reaction for ChE corresponded to that of control animals. In comparison with brain sections of control animals (Fig. 6), however, a greater number of blood vessels showed a positive enzymatic reaction. In the thalamus (Fig. 7), subthalamus, amygdaloid body and in the brain cortex, a more dense network of blood vessels was seen and, in many of them, the lumen was distended.

Results of estimating the relative area of blood vessels, showing positive histoenzymatic reaction for ChE are presented in Table 1. Multi-



*Fig. 6.* Enzymatic reaction for ChE. Thalamus. Rat of control group.  $\times 320$   
*Ryc. 6.* Reakcja enzymatyczna dla ChE. Wzgórze. Szczur kontrolny. Pow.  $\times 320$



*Fig. 7.* Enzymatic reaction for ChE. Thalamus. Rat given CCNU. Enzymatic reaction is more intense and present in a higher number of blood vessels.  $\times 320$   
*Ryc. 7.* Reakcja enzymatyczna dla ChE. Wzgórze. Szczur po CCNU. Odczyn enzymatyczny intensywniejszy i obecny w większej liczbie naczyń krwionośnych. Pow.  $320 \times$

ple administration of small, therapeutic-like doses of either BCNU or CCNU induced an increase in relative area of blood vessels in all examined structures. In the cerebral cortex of the control group, blood vessels occupied, on the average, an area of 10.6%, after administrating BCNU — 14.9% and after CCNU — 13.9%. In the thalamus of control animals, blood vessels with positive reaction for ChE occupied 9% of the examined fields, in the corpus callosum — 4.7%. Administration of cytostatic drugs caused a significant increase in the fraction (Table 1). The highest increase in the relative area of blood vessels was observed in the thalamus of rats given BCNU. The area was more than twofold larger than that in the control group.

Table 1. Relative surface area of blood vessels showing positive reaction for ChE, expressed in percent of the area of total measuring field

Tabela 1. Względna powierzchnia naczyń krwionośnych o dodatniej reakcji dla ChE, wyrażona jako procent powierzchni całego pola pomiarowego

	Control Kontrola		BCNU			CCNU		
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	p	$\bar{x}$	SD	p
parietal cortex kora ciemieniowa	10.6%	4.0	14.9%	3.5	ns	13.9%	3.2	ns
thalamus wzgórze	9.0%	2.9	19.8%	6.5	0.001	15.3%	4.5	0.001
corpus callosum spoidło wielkie	4.7%	2.5	7.9%	2.5	0.001	8.0%	2.4	0.001

$\bar{x}$  — arithmetical mean for measurements made on 50 fields of 4200  $\mu\text{m}^2$  each,

$\bar{x}$  — średnia arytmetyczna pomiarów 50 pól o powierzchni 4200  $\mu\text{m}^2$  każde,

SD — standard deviation,

SD — odchylenie standardowe,

p — level of statistical significance for differences between control and experimental groups,

p — poziom istotności statystycznej różnic pomiędzy grupą kontrolną a doświadczalną,

ns — insignificant alteration.

ns — zmiany nieistotne,

## DISCUSSION

The histoenzymatic reaction for ChE is thought to represent the status of the blood-brain barrier (Joó, Varkonyi 1969). An increase in the reaction has been observed in several experimental models (Kozik et al. 1978; Kozik, Wigowska-Sowińska 1980) and interpreted as demonstrating damage to the blood-brain barrier. In our studies, a significant increase in the relative area occupied by blood vessels with positive reaction for ChE points, moreover, to a distended vascular bed in the brain, stasis in cerebral blood vessels and passive hyperemia in the brain. All these phenomena worsen significantly the hemodynamic conditions of cerebral

circulation. The process is not uniformly expressed in various brain regions. The cerebral cortex, as compared with other examined structures (thalamus, corpus callosum), seems to be the least affected structures. Disturbances in cerebral circulation have been confirmed by the presence of numerous extravascular erythrocytes, frequently penetrating far from the vessels.

The applied fluorochrome-protein complex (Evans blue-albumin complex formed *in vivo* and the administered FITC-albumin complex) do not penetrate in normal conditions through the blood-brain barrier. In situations injuring normal function of the blood-brain barrier, like experimental ischemia (Ito et al. 1976), carbon monoxide intoxication (Rap et al. 1974), acute experimental arterial hypertension (Johansson 1974; Johansson, Linder 1974; Blomstrand et al. 1975) the labels penetrate to perivascular spaces and accumulate in the cytoplasm of nerve cells.

However, the performed studies do not permit to establish the character of metabolic changes provoked by administration of nitrosourea derivatives which lead to lesions of the cerebral vascular system and to increased permeability of the blood-brain barrier. The pattern of nitrosourea derivatives action is complex and multidirectional. The compounds affect nucleic acid synthesis, mainly through nucleotide alkylation (Cheng et al. 1972; Goth, Rajewsky 1972; Jensen, Reed 1978), but also owing to the increased frequency of errors in DNA replication and transcription (Lowley et al. 1972), increased stability of DNA double helix due to formation of transverse alkyl bridges linking nucleotide pairs (Gombar et al. 1979). Nitrosourea derivatives alter also the protein structure, causing carbamylation of its amino acids (Weinkam, Deen 1982). The effects of the compounds on the hematopoietic system and serum protein synthesis, manifested clinically by bone marrow depletion, anemia, granulocytopenia and clotting disturbances (Carter, Newman 1968) should also be kept in mind.

The results of studies here presented confirm earlier observations (Godlewski, Szczech 1985; Szczech, Godlewski 1986) that blood vessel lesion with accompanying dysfunction of the blood-brain barrier is a primary alteration, precipitating further changes in the central nervous system after administering nitrosourea derivatives. It is worth stressing that the two examined cytostatic drugs affect cerebral blood vessels to the same extent.

#### CONCLUSIONS

1. Administration of cytostatic drugs of the nitrosourea derivatives group induces increased permeability of the blood-brain barrier, as manifested by the passage of fluorochrome-albumin complex to the extravascular space.

2. BCNU and CCNU induce a topographically variable increase in cholinesterase activity in blood vessel walls.

3. Histoenzymatic alterations are more intense in subcortical structures than in the cerebral cortex. No significant differences have been disclosed which would reflect the type of the applied cytostatic drug.

#### OCENA STANU NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU SZCZURA PO PODAWANIU POCHODNYCH NITROZOMOCZNIKA

##### Streszczenie

Badania przeprowadzono na dorosłych szczurach Wistar, którym podano czterokrotnie w odstępach siedmiodniowych pochodne nitrozomocznika: BCNU (do otrzewnowo, jednorazowa dawka 7,5 mg) i CCNU (dożołądkowo od 2,5 do 5 mg jednorazowo). Zwierzęta uśmiercano po tygodniu od podania ostatniej dawki leku. Dla oceny stanu naczyń krwionośnych podawano zwierzętom przyżyciowo wodny roztwór błękitu Evansa lub izotiocyanin fluoresceiny sprzężony z albuminą. Ponadto na skrawkach z mózgowia wykonano odczyn histoenzymatyczny dla cholinesterazy (ChE). Intensywność reakcji histoenzymatycznej oceniano ilościowo przy użyciu automatycznej analizy obrazu mikroskopowego.

U szczurów doświadczalnych stwierdzono znamienne statystycznie wzrost względnej powierzchni naczyń krwionośnych o dodatnim odczynie histoenzymatycznym dla ChE we wzgórzu i spoidle wielkim. W mózgowiu zwierząt doświadczalnych zaobserwowano ponadto zmiany świadczące o zwiększonej przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych w postaci przenikania fluorochromów poza ścianę naczyń krwionośnych, fluorescencji włókien nerwowych i neurocytów. Zmiany były takie same u zwierząt otrzymujących BCNU, jak i CCNU.

Uzyskane wyniki mogą przemawiać za istotną rolę zaburzeń w ścianie naczyniowej w powstawaniu zmian patologicznych w OUN pod wpływem cytostatyków, pochodnych nitrozomocznika.

#### ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОДАВАНИЯ ДЕРИВАТОВ НИТРОЗОМОЧЕВИНЫ

##### Резюме

Исследования были проведены у взрослых крыс Wistar, которые получили 4 раза, каждые 7 дней, дериваты нитрозомочевины: BCNU (внутриперитонеальная разовая доза 7,5 мг) и CCNU (в желудок, разовая доза 2,5–5 мг). Животные были убиты в неделю после последней дозы лекарства. Прижизненно был подан водный раствор Эвансблэу или изотиоцианата флуоросцеина, соединенный с альбумином. На мозговых срезах была также произведена гистоэнзиматическая реакция на холинэстеразу (ChE). Интенсивность гистоэнзиматической реакции оценивалась количественным методом, при употреблении автоматического анализа микроскопической картины.

У экспериментальных крыс было обнаружено статистически значимое повышение относительной поверхности кровеносных сосудов с положительной гистоэнзиматической реакцией на ChE в зрительном бугре и в мозолистом теле. В мозгу животных наблюдались также изменения, свидетельствующие о повышенной проницаемости стенок кровеносных сосудов, проявляющейся проникновением флуорохромов через стенку кровеносных со-

судов, флюоресценцией нервных волокон и клеток. Изменения были одинаковые у животных, которые получили BCNU или CCNU.

Полученные результаты могут указывать существенную роль нарушений сосудистой стени в возникновении в центральной нервной системе патологических изменений вызванных цитостатическими дериватами нитрозомочевина.

#### REFERENCES

1. Agadshanian S., Döpel P., Gretscher P., Witsack W.: Morphoquant — ein automatischer Mikroskopbildanalysator des VEB Carl Zeiss Jena. *Jenauer Rundsch.*, 1977, 22, 270—276.
2. Blomstrand C., Johansson B., Rosenbren B.: Blood-brain barrier lesions in acute hypertension in rabbits after unilateral X-ray exposure of brain. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1975, 31, 97—102.
3. Carter S. K., Newman J. W.: Nitrosoureas: 3-bis-(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (NSC 409962, BCNU) and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (NSC 79037, CCNU). *Cancer Chemother. Rep.*, 1968, 1, 115—151.
4. Cheng C. J., Fujimura S., Grunberger D., Weiwstein 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.
5. Clark H. F., Shepard C. C.: A dialysis technique for preparing fluorescent antibody. *Virology* 1963, 20, 642—644.
6. Gerebtzoff M.: Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterases. *Acta Anat. (Basel)*, 1953, 19, 366—379.
7. Godlewski A., Szczech J.: The morphology and histochemistry of adult rats neurocytes after BCNU administration. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 1985, 23, 221—230.
8. Goldberg D. I., Bloomer W. D., Dawson D. M.: Nervous system toxic effects of cancer therapy. *JAMA*, 1982, 247, 1437—1441.
9. Gombar C. T., Tong W. P., Ludlum D. B.: Mechanism of action of the nitrosoureas: Formation of 1,2-(diguanosin-7-yl)ethane from the reaction of BCNU (1,3-bis(chloroethyl)-1-nitrosourea) with guanosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, 90, 878—882.
10. Goth R., Rajewsky M.: Ethylation of nucleic acids by ethyl-nitrosourea-1-C<sup>14</sup> in the fetal and adult rats. *Cancer Res.*, 1972, 32, 1501—1505.
11. Greń J.: *Statystyka matematyczna. Modele i zadania*. PWN, Warszawa, 1982.
12. Ilse H. W., Heiss W. D.: Retrospective study on the effect of CCNU and radiotherapy in malignant gliomas. *J. Neurol.*, 1985, 232, suppl. 7.
13. Ito U., Go K. G., Walker J. T., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischaemia in gerbils. III. Behaviour of the blood-brain barrier. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1976, 34, 1—6.
14. 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 phosphotriester formation. *Biochemistry*, 1978, 17, 5098—5107.
15. Johansson B.: Regional cerebral blood flow in acute experimental hypertension. *Acta Neurol. Scand.*, 1974, 50, 366—372.
16. Johansson B., Linder L. E.: Blood-brain barrier dysfunction in acute arterial hypertension induced by clamping of the thoracic aorta. *Acta Neurol. Scand.*, 1974, 50, 360—365.
17. Joó F., Varkonyi T.: Correlation between cholinesterase activity of capillaries

- and the blood-barrier in the rat. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 1969, 14, 115—119.
18. Kozik M. B., Sosiński E., Wigowska-Sowińska J.: Histochemical changes in the central nervous system as the result of intoxication with mercury compounds. In: *Brain tumors and chemical injuries to the central nervous system*. Ed. M. J. Mossakowski. Pol. Med. Publ. Warsaw, 1978.
  19. Kozik M. B., Wigowska-Sowińska J.: Changes in the activity of some hydrolases of the brain after the administration of methoxyethylmercury chloride. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 1980, 53, 122—133.
  20. Lowley P. D., Orr D. R., Shah S. A.: Reaction of alkylating mutagens and carcinogens with nucleic acids N-3 of guanine as a site of alkylation by N-methyl-N-nitrosourea and dimethyl sulfate. *Chem. Biol. Interact.*, 1972, 4, 431—434.
  21. Maziarz L. J., Szczech J.: Zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w mózgu młodych i dojrzałych szczurów po podawaniu CCNU (Lomustine). *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 399—414.
  22. Rap Z. M., Kapuściński A., Sikorska M.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartości wody w mózgu w doświadczalnym ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 403—412.
  23. Strian F., Maurach R.: Neurotoxische Nebenwirkungen der zytostatische Therapie. *Fortschr. Neurol. Psychiat.*, 1981, 49, 151—163.
  24. Szczech J., Godlewski A.: Histoenzymatic, karyometric and DNA cytophotometric studies on rat neuroglia following administration of BCNU (Carmustine). *Acta Histochem.*, 1986, 78, 147—164.
  25. Voss K., Neumann E., Witsack W.: „Universelles Programmsystem” für den automatischen Mikroskopbildanalysator Morphoquant. *Jenauer Rundsch.*, 1979, 24, 167—169.
  26. Weinkam R. J., Deen D. F.: Quantitative dose-response relations for the cytotoxic activity of chloroethylnitrosoureas in cell culture. *Cancer Res.*, 1982, 42, 1008—1014.
  27. Young D. F., Posner J. B.: Nervous system toxicity of the chemotherapeutic agents. In: *Handbook of clinical neurology*. Ed. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. Elsevier, North Holland Biomed. Press, Amsterdam, 1979, v. 36, 91—126.

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

MIECZYŚLAW SMIAŁEK, HANNA KRÓLIKIEWICZ-ŚCIBOROWSKA,  
MARIA D. SKROBISZ, MARIA NIEMCZEWSKA-SYROPOLSKA,  
MAŁGORZATA SASINOWSKA

POZIOM KWASU HOMOWANILINOWEGO (HVA) I KWASU  
GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA) W PŁYNIE  
MÓZGOWO-RDZENIOWYM U CHORYCH Z ZESPOŁAMI  
POZAPIRAMIDOWYMI

Zakład Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,  
Warszawa

Klinika Neurologiczna II Wydziału Lekarskiego AM, Warszawa

Zakład Farmakodynamiki Instytutu Nauk Fizjologicznych AM, Warszawa

Zaburzenia układów neuroprzekaźnikowych odgrywają istotną rolę w patogenezie wielu chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Liczne badania neurochemiczne wykazały, że w chorobach układu pozapiramidowego dochodzi do znaczących zmian stężeń różnych substancji neuroprzekaźnikowych i ich metabolitów w OUN, zróżnicowanych w zależności od charakteru zespołu klinicznego (Bird 1978; Pycocck 1978). Wiadomo, że w chorobie Parkinsona spada w mózgowiu zawartość dopaminy (Hornykiewicz 1966), a w płasawicy Huntingtona obniża się poziom GABA (Perry i wsp. 1973). Przyjęty jest pogląd, że poziom HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje na zawartość dopaminy w mózgowiu (Gottfries i wsp. 1971), a stężenie GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje na aktywność układu GABAergicznego w OUN (Manyam, Hare 1983). Badania doświadczalne nad patomechanizmem powstawania zespołu pozapiramidowego wykazały, że ważnym czynnikiem wpływającym na obecność objawów neurologicznych jest zmiana stosunku stężeń dopaminy (DA) i GABA w mózgowiu (Kosicka i wsp. 1986).

Celem podjętych badań było ustalenie zależności pomiędzy poziomem GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym a obrazem klinicznym w niektórych zespołach pozapiramidowych, z uwzględnieniem płci i wieku chorych, współistniejących zmian miażdżycowych i leczenia.



## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 81 chorych hospitalizowanych w latach 1981—1985 w Klinice Neurologicznej II Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie, w tym u 12 pacjentów z chorobą Parkinsona bez innych objawów uszkodzenia OUN lub z współistniejącą miażdżycą mózgu, u 34 chorych z zespołem parkinsonowskim w przebiegu miażdżycy mózgu (tzw. parkinsonizm miażdżycowy), u 16 chorych z miażdżycą mózgu bez zaburzeń piramidowych, u 6 chorych z płasawicą Huntingtona oraz u 3 chorych z łagodnym drżeniem samoistnym. Grupa chorych z miażdżycą mózgu bez objawów pozapiramidowych stanowiła kontrolę dla pacjentów z miażdżycą mózgu i towarzyszącym zespołem parkinsonowskim oraz materiał porównawczy dla badań nad zależnością pomiędzy poziomem GABA i HVA a wiekiem chorych. Ponadto kontrolę dla wszystkich grup chorych stanowiło 10 pacjentów nie wykazujących organicznego uszkodzenia OUN, traktowanych jako norma.

Wszyscy chorzy byli badani według jednolitego schematu (tzw. karty ogólnomiażdżycowej), uwzględniającego dokładny wywiad, badanie internistyczne, neurologiczne i psychologiczne. Rozpoznanie choroby Parkinsona, płasawicy Huntingtona i łagodnego drżenia samoistnego opierało się na ogólnie przyjętych kryteriach klinicznych.

Ustalono następujące kryteria dla oceny zmian miażdżycowych w OUN:

a) naczyniowe chromanie mózgowe w wywiadzie i/lub obecność dyskretnych objawów rozsianych neurologicznych, dla których występowania nie znaleziono innej przyczyny niż miażdżycy. Nasilenie tych zmian oceniano w skali punktów od 1 do 3 (miażdżycy mała — 1 punkt, średnia — 2 punkty i duża — 3 punkty);

b) zmiany na dnie oczu o charakterze angiopatii miażdżycowej, określone pod względem zaawansowania od 1 do 3 punktów;

c) zespół psychoorganiczny o cechach otępienia miażdżycowego lub starczego (brak możliwości różnicowania lub zastosowania innych metod badań) — stopień nasilenia punktowano od 1 do 3;

d) ocena na podstawie badania sekcyjnego, jako jedyna pewna metoda określająca stopień zaawansowania zmian miażdżycowych: małe zmiany — 3 punkty, średnie — 6 punktów i duże — 9 punktów.

Objawy parkinsonowskie oceniano za pomocą karty opracowanej przez grupę badawczą chorób pozapiramidowych Światowej Federacji Neurologii (1978). Karta ta obejmowała ocenę niesprawności stanu psychicznego oraz tzw. profilu ruchu, określającego w czteropunktowej skali stopień nasilenia objawów pozapiramidowych (napięcie mięśni i drżenie głowy oraz kończyn, spowolnienie i ubóstwo ruchów, zaburzenia chodu i postawy, mowy i mimiki oraz obecność objawów wegetatywnych). Mak-

symalna liczba punktów wynosiła 49. Dla ujednoczenia oceny badania były prowadzone przez jedną osobę (dr med. M. Skrobisz).

W płasawicy Huntingtona oceniano rozkład i nasilenie ruchów mimowolnych oraz nasilenie zespołu psychoorganicznego. Pacjentów klasyfikowano według pięciopunktowej skali Shoulsona i Fahna (1978), określającej stopień sprawności zawodowej i zaangażowania w życiu codziennym.

Badania zależności pomiędzy poziomem GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym a zespołem pozapiramidowym przeprowadzono jedynie w grupie chorych nie leczonych (68 przypadków z chorobą lub zespołem Parkinsona).

#### Oznaczanie GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym

Płyn mózgowo-rdzeniowy pobierano o stałej porze (godz. 10<sup>00</sup>) w pozycji leżącej na boku, z nakłucia przestrzeni L<sub>4</sub> — L<sub>5</sub> rdzenia kręgowego, po 12-godzinny unieruchomieniu. Do badania pobierano 7 ml płynu (z pierwszych 10 ml). Natychmiast po pobraniu płyn zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem, a następnie poddawano liofilizacji.

Oznaczanie poziomu GABA wykonano metodą Lovego w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974). Fluorescencję uzyskaną w reakcji ninhydrynowej odczytywano w spektrofluorymetrze Aminco—Bowmana przy długościach fal 380 i 450 nm.

Oznaczanie stężenia HVA wykonano metodą Corrodi i Werdiniusa w modyfikacji Farleya i wsp. (1977). Fluorescencję wywołaną za pomocą żelazicyjanku potasu odczytywano w spektrofluorymetrze Aminco—Bowmana przy długościach fal 318 i 420 nm.

Do każdej serii badań GABA i HVA wykonano krzywą standardową oraz oznaczono standard wewnętrzny oraz ślepą próbę. Poziom GABA i HVA obliczano w nmolach/l. Otrzymane wyniki analizowano statystycznie za pomocą testu *t* Studenta.

#### WYNIKI

Dane dotyczące wieku badanych grup chorych z zespołami pozapiramidowymi oraz w normie zestawiono w tabeli 1. Wiek chorych z miażdżycą mózgu w porównaniu z wiekiem pacjentów z objawami pozapiramidowymi choroba Parkinsona, płasawica Huntingtona, łagodne drżenie samoistne i parkinsonizm miażdżycowy był znamienne wyższy w porównaniu z grupą przyjętą za normę. Grupy pacjentów z chorobą Parkinsona, płasawicą Huntingtona i z łagodnym drżeniem samoistnym były reprezentowane przez ludzi młodszych zarówno w stosunku do chorych z miażdżycą mózgu, jak również do chorych z zespołem parkinsonowskim w przebiegu miażdżycy.

Tabela 1. Wiek chorych w poszczególnych grupach  
 Table 1. Age of patients in particular groups

Lp. No	Grupa chorych Group of patients	Liczba chorych Number of patients		Wiek Age $\bar{x} \pm \text{SEM}$	$P_n$	$P_b$
		Ogółem Total	Nie leczeni Nontreated			
1.	Norma Norm	10	10	37,2±2,4		1:2, 3, 4, 5, 6 ≤ 0,01
	a) mężczyźni men	6	6	37,7±4,0		1a:1b > 0,05
	b) kobiety women	4	4	48,3±1,2		
2.	Miażdżycza mózgu Cerebral arterioscler.	16	16	73,6±2,3	≤ 0,001	2:3, 5, 6 ≤ 0,01
	a) mężczyźni men	9	9	70,8±3,5		2:4 > 0,05
	b) kobiety women	7	7	77,1±1,9		2a:2b > 0,05
3.	Zespół parkinsonowski choroba Parkinsona Parkinsonian syndrome Parkinson's disease	7	5	54,6±2,6	≤ 0,001	3:2,4  ≤ 0,01 3:5,6 > 0,05
4.	Zespół parkinsonowski z miażdżycą mózgu Parkinsonian syndrome with arteriosclerosis	39	28	71,9±1,9	≤ 0,001	4:2 > 0,05
	a) mężczyźni men	15	12	69,3±2,6		4:3, 5, 6 ≤ 0,01
	b) kobiety women	24	16	73,5±2,7		4a:4b > 0,05
5.	Pląsawica Huntingtona Huntington's chorea	6	6	51,3±5,9	≤ 0,01	5:2, 4 ≤ 0,01 5:3,6 > 0,05
6.	Łagodne drżenie samoistne Essential tremor	3	3	52,7±5,9	≤ 0,01	
	Razem Total	81	68			

$P_n$  — prawdopodobieństwo obliczone wg testu *t*-Studenta w porównaniu z normą

— probability between the norm and patient group calculated according to Student's *t* test

$P_b$  — prawdopodobieństwo obliczone wg testu *t*-Studenta pomiędzy grupami badanych chorych

— probability between the groups of patients calculated according to Student's *t* test

W celu dokonania analizy statystycznej wpływu miażdżycy na powstawanie zespołu parkinsonowskiego i badania różnicowego choroby Parkinsona z parkinsonizmem miażdżycowym i innymi badanymi jednostkami chorobowymi układu pozapiramidowego przyjęto następujący podział materiału klinicznego: grupa A (bez wyodrębnienia jednostek chorobowych) obejmowała zespół parkinsonowski bez miażdżycy mózgu i innych objawów uszkodzenia OUN, zespół parkinsonowski z towarzyszącą miażdżycą mózgu i miażdżycę mózgu bez zaburzeń piramidowych oraz grupa B — choroba Parkinsona bez współistniejącej miażdżycy mózgu i u chorych z cechami zmian miażdżycowych, miażdżycą z towarzyszącym zespołem parkinsonowskim (parkinsonizm miażdżycowy), miażdżycą mózgu bez innych objawów towarzyszących, płasawica Huntingtona i łagodne drżenie samoistne.

Analiza statystyczna wpływu miażdżycy na powstawanie zespołu parkinsonowskiego i badania różnicowego choroby Parkinsona z parkinsonizmem miażdżycowym oraz z innymi badanymi jednostkami chorobowymi układu pozapiramidowego została przedstawiona w tabelach 2a i 2b. Jak wynika z przedstawionej tabeli 2a stwierdzono statystycznie znamienne obniżenie stężenia GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zespołem parkinsonowskim zarówno z obecnością miażdżycy mózgu, jak i bez cech miażdżycowych oraz w grupie chorych z miażdżycą mózgu bez objawów pozapiramidowych w porównaniu z normą: w grupie z miażdżycą mózgu około 28,3%, w zespole parkinsonowskim bez miażdżycy o 22,5%, w płasawicy Huntingtona o 42,2%, a w grupie z łagodnym drżeniem samoistnym około 32,4%. Jedynie u chorych z zespołem parkinsonowskim z miażdżycą nie uzyskano znaczącej różnicy, chociaż w podgrupie kobiet obniżenie poziomu GABA około 22,9% było statystycznie znamienne. Zanotowano, że stężenie tego neuroprzekaznika u chorych z płasawicą Huntingtona w porównaniu z grupą chorych z zespołem parkinsonowskim i współistniejącą miażdżycą było znamienne (ok. 30,7%). We wszystkich grupach i podgrupach stwierdzono statystycznie znamienne obniżenie poziomu HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym. Względny stosunek GABA/HVA przyjęty w normie za 1, nie odbiegał znacznie od jedności w grupie chorych z miażdżycą mózgu i w zespole parkinsonowskim bez miażdżycy, natomiast u chorych z zespołem parkinsonowskim i miażdżycą mózgu wynosił 1,29.

W tabeli 2b, uwzględniającej podział chorych według jednostek chorobowych i jako kontrolę grupę chorych z miażdżycą mózgu bez innych współistniejących objawów, wykazano, że poziom GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym był istotnie obniżony w porównaniu z normą we wszystkich grupach chorych, z wyjątkiem grupy pacjentów z parkinsonizmem miażdżycowym. W tej grupie spadek stężenia GABA o 8,1% był nie znaczący. Poziom HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym nie różnił

Tabela 2a. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym w poszczególnych grupach chorych klasyfikowanych wg podziału A  
 Table 2a. GABA and HVA concentrations (nmoles/l) in CSF in various groups of patients according to classification A

Lp. No	Grupa chorych Group of patients	Liczba chorych Number of patients	GABA			HVA			GABA HVA
			$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$P_n$	$P_b$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$P_n$	$P_b$	
1.	Norma Norm	10	244,3 ± 10,9			421,5 ± 16,8			1
	a) mężczyźni men	6	241,5 ± 15,5		1a:1b > 0,05	425,2 ± 21,7			1
	b) kobiety women	4	248,0 ± 14,2			415,9 ± 26,2			1
2.	Miażdżycza mózgu Cerebral arteriosclerosis	16	175,2 ± 18,4	≤ 0,02	2:3, 4, 5 > 0,05	311,1 ± 27,9	≤ 0,02		0,96
	a) mężczyźni men	9	186,4 ± 26,5	≤ 0,02	2a:2b > 0,05	277,5 ± 38,4	≤ 0,001		1,17
	b) kobiety women	7	160,8 ± 25,1	≤ 0,01		335,2 ± 33,1	≤ 0,05		0,80
3.	Zespół parkinsonowski bez miażdżycy Parkinsonian syndrome without arterioscler.	5	189,3 ± 18,7	≤ 0,02	3:2, 4, 5, 6 > 0,05	311,4 ± 32,4	≤ 0,01		1,05
4.	Zespół parkinsonowski z miażdżycą mózgu Parkinsonian syndrome with arteriosclerosis	28	203,5 ± 13,9	> 0,05	4:5 < 0,001 4:2, 3, 6 > 0,05	271,9 ± 17,7			1,29

	a) mężczyźni men	12	218,2±19,1	> 0,05	4a:4b > 0,05	285,0±24,3	< 0,001	1,35
	b) kobiety women	16	191,6±19,2	< 0,05		261,5±24,9	< 0,001	1,22
5.	Pląsawica Huntingtona Huntington's chorea	6	141,0±26,2	< 0,001	5:4 < 0,001	269,2±47,4	< 0,01	0,90
6.	Łagodne drżenie samoistne Essential tremor	3	164,0±3,4	< 0,001	6:2, 3, 4, 5 > 0,05	262,9±71,3	< 0,01	1,09

P<sub>b</sub>, P<sub>n</sub> — objaśnienia w tabeli 1.

P<sub>b</sub>, P<sub>n</sub> — explanation in Table 1.

GABA — w stosunku do normy = 1

HVA — in relation to the norm = 1

Tabela 2b. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym w poszczególnych grupach chorych klasyfikowanych wg podziału B  
 Table 2b. GABA and HVA concentrations (nmoles/l) in CSF in various groups of patients according to classification B

Lp. No	Grupa chorych Group of patients	Liczba chorych Number of patients	GABA			HVA			$\frac{\text{GABA}^A}{\text{HVA}}$
			$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$p_n$	$p_b$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$p_n$	$p_b$	
1.	Norma Norm	10	244,3 ± 10,9			421,5 ± 16,8			1
2.	Miażdżyca mózgu Cerebral arteriosclerosis	16	175,2 ± 18,4	< 0,02		311,1 ± 27,9	< 0,02		0,96
3.	Choroba Parkinsona Parkinson's disease	12	173,2 ± 15,7	< 0,01		283,8 ± 24,3	< 0,01		1,05
4.	Miażdżyca mózgu z zespołem parkinsonowskim Cerebral arteriosclerosis with parkinsonian syndrome	21	224,4 ± 16,2	> 0,05	4:5 < 0,001	268,1 ± 20,9	< 0,001		1,43
5.	Pląsawica Huntingtona Huntington's chorea	6	141,1 ± 26,2	< 0,001		269,2 ± 47,4	< 0,01		0,9
6.	Łagodne drżenie samoistne Essential tremor	3	164,0 ± 3,4	< 0,001		262,9 ± 71,3	< 0,01		1,09

Objaśnienia w tabeli 2a.  
 Explanations in Table 2a.

się znamienne w stosunku do normy w żadnej z badanych grup. Względny wskaźnik GABA/HVA utrzymywał się na poziomie zbliżonym do 1, z wyjątkiem grupy chorych z zespołem parkinsonowskim w przebiegu miażdżycy ze wskaźnikiem 1,43.

Zawarte w tabeli 3 dane dotyczące stężeń GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z miażdżycą mózgu w zależności od stopnia zmian miażdżycowych (mała, średnia i duża miażdżycy) nie wykazały istotnych różnic w stężeniu tych substancji, a względny wskaźnik GABA/HVA był zbliżony do normy.

Tabela 3. Stężenie GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z miażdżycą mózgu w zależności od nasilenia zmian miażdżycowych

Table 3. GABA and HVA concentrations (nmoles/l) in CSF of patients with cerebral arteriosclerosis according to intensity of arteriosclerotic changes

Lp. No	Miażdżycy mózgu Cerebral arteriosclerosis	Wiek chorych Age of patients $\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	GABA $\bar{x} \pm \text{SEM}$	HVA $\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\frac{\text{GABA}}{\text{HVA}}$
1.	Mała (1–3 punkty) Mild (1–3 points)	76,5±1,9	4	140,2±38,6	285,7±23,8	0,81
2.	Średnia (4–6 punktów) Moderate (4–6 points)	63,9±7,0	8	190,7±22,5	301,5±25,2	1,09
3.	Duża (7–9 punktów) Severe (7–9 points)	71,3±3,9	4	179,2±38,1	324,2±83,8	0,95

p – różnice pomiędzy grupami statystycznie nieznamienne

The differences between the groups of patients are statistically insignificant.

Przedstawiona w tabeli 4 analiza statystyczna stężeń GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z zespołem parkinsonowskim z miażdżycą i bez miażdżycy mózgu (wg podziału A) i różnicowania choroby Parkinsona z parkinsonizmem miażdżycowym (wg podziału B), z uwzględnieniem nasilenia objawów pozapiramidowych, nie wykazały istotnych różnic. Stwierdzono natomiast wyższy względny wskaźnik stężeń GABA/HVA w grupie chorych z miażdżycą i objawami parkinsonowskimi w porównaniu z grupą chorych z zespołem parkinsonowskim bez miażdżycy (wg podziału A) i wyższy u chorych z parkinsonizmem miażdżycowym niż u chorych z chorobą Parkinsona.

Dane dotyczące stężeń GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z zespołem parkinsonowskim i miażdżycą mózgu w zależności od stopnia zmian miażdżycowych z uwzględnieniem nasilenia objawów pozapiramidowych, zawarte w tabeli 5, nie wykazują statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami. Zaobserwowano natomiast



Tabela 4. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z objawami parkinsonowskimi w zależności od nasilenia zespołu pozapiramidowego (wg podziału A i B)

Table 4. GABA and HVA concentrations (nmole/l) in CSF of patients with parkinsonian syndrome according to intensity of extrapyramidal symptoms

Grupa chorych Groups of patients	Wiek Age	Stopień nasilenia objawów neurol. Degree of neurol. symptoms	n	GABA		HVA		GABA HVA
	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	
A.								
Zespół parkinsonowski bez innych objawów Parkinsonian syndrome only	54,6±2,6	14,2±0,9	5	189,3±18,7		311,4±32,3		1,05
Miażdżyca mózgu z objawami parkinsonowskimi Cerebral arteriosclerosis with parkinsonian syndrome	71,9±1,9	17,8±1,3	28	203,5±13,9	> 0,05	271,9±17,7	> 0,05	1,29
B.								
Choroba Parkinsona Parkinsons' disease	61,2±3,1	17,4±1,6	12	173,19±15,7	> 0,05	283,8±24,3	> 0,05	1,0
Zespół parkinsonowski z miażdżycą Parkinsonian syndrome with arteriosclerosis	73,7±2,0	17,1±1,5	21	224,4±16,2		168 1±20 9		1,43

*Tabela 5. Stężenie GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z zespołem parkinsonowskim i miażdżycą mózgu w zależności od stopnia zmian miażdżycowych*

*Table 5. GABA and HVA concentration (nmoles/l) in CSF of patients with parkinsonian syndrome and cerebral arteriosclerosis according to intensity of arteriosclerotic changes*

Lp. No.	Miażdżycza mózgu Cerebral arteriosclerosis	Wiek	Stopień nasilenia	GABA	HVA	$\frac{\text{GABA}}{\text{HVA}}$
		chorych Age of patients'	obj. pozapirami- dowych Intensity of extrapyramidal symptoms			
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	
1.	Mała (1–3 punkty) Mild (1–3 points)	69,6 ± 2,8 n = 12	17,2 ± 2,1	181,1 ± 18,6	284,2 ± 22,2	1,10
2.	Średnia (4–6 punktów) Moderate (4–6 points)	68,3 ± 2,9 n = 8	16,4 ± 1,7	211,1 ± 20,1	272,0 ± 35,8	1,34
3.	Duża (7–9 punktów) Severe (7–9 points)	77,8 ± 3,1 n = 8	20,0 ± 2,3	233,1 ± 32,6	254,8 ± 35,8	1,57

Zespół pozapiramidowy: słabo nasilony — poniżej 15 punktów  
umiarkowanie nasilony 16–25 punktów  
bardzo nasilony — powyżej 25 punktów

Extrapyramidal syndrome: mild — below 15 points  
moderate — 16–25 points  
severe — above 25 points

p — statystycznie nieznamienne  
— without statistical significance.

stopniowe narastanie stosunku stężeń GABA/HVA w porównaniu z normą od 1,1 u chorych z miażdżycą małą, do 1,34 w grupie chorych z miażdżycą średniego stopnia i 1,57 u chorych z dużymi zmianami miażdżycowymi.

Analiza zmian stężeń GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z zespołem parkinsonowskim i miażdżycą mózgu w zależności od nasilenia objawów pozapiramidowych (tab. 6) nie wykazała pomiędzy badanymi grupami statystycznie istotnych różnic. Nie zaobserwowano również zależności pomiędzy wysokością wskaźnika GABA/HVA a nasileniem objawów pozapiramidowych.

W tabeli 7 zestawiono wyniki stężeń GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym w grupie chorych nie leczonych i leczonych. U chorych leczonych stwierdzono statystycznie znamienne spadki poziomu GABA (20,1%) w porównaniu do grupy chorych nie leczonych. Przyrost stężenia HVA (o 9,2%) był nieznamienne. Względny wskaźnik GABA/HVA wyniósł w grupie chorych leczonych i nie leczonych odpowiednio 1,26 i 0,91.

Tabela 6. Stężenie GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z zespołem parkinsonowskim i miażdżycą mózgu w zależności od nasilenia objawów pozapiramidowych

Table 6. GABA and HVA concentrations (nmoles/l) in CSF of patients with parkinsonian syndrome and cerebral arteriosclerosis according to intensity of extrapyramidal symptoms

Nasilenie zespołu pozapiramidowego Intensity of extrapyramidal syndrome	Wiek chorych Age of patients $\bar{x} \pm \text{SEM}$	Stopień zmian miażdżycowych Degree of arteriosclerosis $\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	GABA		HVA		GAGA HVA
				$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	
1–15 punktów points	71,3±2,5	3,9±0,4	14	211,8±19,1		259,5±26,8		1,41
16–25 punktów points	74,3±3,0	5,4±0,9	10	177,7±21,0	>0,05	233,0±32,0	> 0,05	1,31
powyżej 25 punktów above 25 points	68,0±6,2	5,5±1,7	4	232,2±33,3		297,0±38,0		1,34

Tabela 7. Poziom GABA i HVA (nmole/l) w płynie mózgowo-rdzeniowym u chorych z zespołem parkinsonowskim nie leczonych i leczonych

Table 7. GABA and HVA concentrations (nmoles/l) in CSF of non treated and treated patients with parkinsonian syndrome

Grupa chorych Group of patients	Wiek Age $\bar{x} \pm \text{SEM}$	n	GABA $\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	HVA $\bar{x} \pm \text{SEM}$	p	$\frac{\text{GABA}}{\text{HVA}}$
Nie leczeni Non treated	69,3 $\pm$ 2,0	33	201,2 $\pm$ 12,1	< 0,05	276,0 $\pm$ 15,8	> 0,05	1,26
Leczeni Treated	67,8 $\pm$ 2,3	12	160,7 $\pm$ 16,3		302,0 $\pm$ 33,3		0,91

### OMÓWIENIE

Mimo przyjętego poglądu, że poziomy GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym odzwierciedlają zawartość tych substancji w mózgowiu odnosi się wrażenie, że w badanych przypadkach stwierdzone w płynie mózgowo-rdzeniowym stężenia GABA i HVA nie obrazują w pełni istniejących zmian w układzie GABA- i dopaminergicznym w mózgowiu. W przeprowadzonych badaniach stwierdziliśmy spadek zawartości GABA i HVA zarówno w zespołach parkinsonowskich, jak i w płasawicy Huntingtona oraz u osób w podeszłym wieku z objawami miażdżycy.

Wiadomo, że w chorobie lub zespole Parkinsona, w wyniku zmian w obrębie szlaków dopaminergicznych, a przede wszystkim w warstwie zbitej istoty czarnej, dochodzi do obniżenia zawartości dopaminy na skutek zahamowania jej syntezy bądź nadmiernego rozpadu (Hornykiewicz 1966; Mc Geer 1973). Uważa się, że w płasawicy Huntingtona, w której proces uszkodzający obejmuje przede wszystkim jądro ogoniaszte i receptory GABA — dopaminergiczne warstwy siateczkowatej istoty czarnej, niedobór dotyczy głównie GABA w wyniku obniżenia jego biosyntezy na etapie katalizowanym przez dekarboksylazę glutaminianową (GAD) (Perry i wsp. 1973; Stahl, Swanson 1974; Bird 1978). Dane z piśmiennictwa na temat zachowania się poziomów GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym w zespołach parkinsonowskich oraz w płasawicy Huntingtona są na ogół zgodne co do obniżenia poziomu HVA i GABA w parkinsonizmie, a samego GABA w płasawicy Huntingtona (Johansson, Roos 1965, 1967; Glaeser, Hare 1975; Manyam i wsp. 1978; Enna i wsp. 1977; Manyam 1983), chociaż odmienne obserwacje nie należą do rzadkości. Kuroda i wsp. (1982) stwierdzili np. istotny spadek poziomu GABA w chorobie Parkinsona, natomiast w płasawicy Huntingtona jego stężenie było obniżone nieznacznie. Z kolei Schmidt i Löschner (1982) nie znaleźli obniżenia poziomu GABA w chorobie Parkinsona. Stwierdzono także spadek HVA w płasawicy Huntingtona (Curzon i wsp. 1972). Wyniki

dotyczące poziomu HVA i/lub GABA w innych chorobach OUN są również rozbieżne.

Częstość występowania obniżonego poziomu GABA i HVA w różnych chorobach układu nerwowego oraz rozbieżność wyników badań skłaniają do rozważenia, czy stężenia badanych neuroprzekazników i ich metabolitów w płynie mózgowo-rdzeniowym istotnie odzwierciedlają zmiany strukturalne i czynnościowe związane z ocenianą chorobą. Wiadomo, że na stężenie tych związków wpływa wiele czynników, do których między innymi należy płeć i wiek chorych. Tak np. Gottfries i wsp. (1971) stwierdzili wzrost poziomu HVA wraz z wiekiem, podczas gdy inni (Andersson, Roos 1969) nie znajdowali różnic w stężeniu tego związku zależnych od wieku, bądź nawet stwierdzali jego obniżenie w wieku starszym (Gottfries i wsp. 1969). Przeważa pogląd, że GABA w płynie mózgowo-rdzeniowym nie ulega zmianom zależnym od płci i wieku (Schmidt, Löschner 1982, Kuroda i wsp. 1982), niemniej niektórzy autorzy twierdzą, że obniża się jego stężenie w miarę starzenia się, szczególnie u kobiet (Hare i wsp. 1982, Manyam i wsp. 1983). Jak wykazały nasze badania, w grupie osób w średnim wieku, bez objawów uszkodzenia OUN, poziom GABA i HVA nie różniły się u kobiet i mężczyzn. U ludzi starszych z objawami miażdżycy OUN poziom obu tych związków był obniżony, niezależnie od płci.

Brak zależności pomiędzy stopniem nasilenia zmian miażdżycowych a wartościami poziomów GABA i HVA mogą sugerować rolę innego, nie naczyniopochodnego czynnika w obniżeniu stężenia tych substancji, np. proces zanikowy mózgu (Ashcroft, Sharman 1960) bądź obecności choroby współistniejącej, jak nadciśnienie tętnicze lub cukrzyca. Istnieje pogląd, że w miażdżycy mózgu z zespołem parkinsonowskim niekonieczna jest obecność ognisk naczyniopochodnych i zmian w ścianach naczyń w obrębie istoty czarnej, a nawet przyjmuje się, że okołonaczyniowe uszkodzenie tkanki, a w szczególności szlaków dopaminergicznych, może zachodzić na skutek zaburzeń w przepuszczalności małych naczyń krwionośnych, stanowiąc wczesne stadium uszkodzenia zwojów podstawy (Denny-Brown 1962).

Jest powszechnie wiadomo, że jednym z podstawowych warunków wiarygodności wyników poziomu neuroprzekazników w płynie mózgowo-rdzeniowym jest ściśle przestrzeganie szeregu zaleceń metodycznych. Dotyczy to przede wszystkim stałego czasu pobierania próbki płynu mózgowo-rdzeniowego ze względu na dobowy rytm wydzielania substancji przekazywanych, określonej porcji płynu (w różnych częściach układu płynowego są odmienne stężenia substancji neuroprzekaznikowych), ustalonej pozycji chorego podczas pobierania płynu, uprzedniego unieruchomienia pacjenta na okres kilku godzin oraz odstawienia leków (Johansson, Roos 1967, 1975; Anderson i wsp. 1981). W prowadzonych badaniach staraliśmy się zachować odpowiednie warunki pobierania płynu. Materiał

nasz może być jednak obciążony błędem wynikającym z pobierania przez pacjentów leków odwadniających, nasercowych czy przeciwcukrzycowych oraz ze względu na współistniejące choroby, jak nadciśnienie tętnicze i cukrzyca.

Ocena względnego wskaźnika stężeń GABA/HVA we wszystkich badanych grupach nie wykazała wyraźnych zmian w porównaniu z normą, z wyjątkiem grupy z parkinsonizmem miażdżycowym, w której wykryto przewagę układu GABAergicznego nad dopaminergicznym. W grupie tej stwierdzono również, że w miarę nasilenia stopnia miażdżycy narastała przewaga układu GABAergicznego. Znalezione różnice między chorobą Parkinsona a zespołem parkinsonowskim współistniejącym z miażdżycą mózgu mogą wskazywać na odrębność tych zespołów, być może związaną z różną topografią i rozległością uszkodzeń szlaków dopaminergicznych. Obserwacje morfologiczne wskazują, że w zespole parkinsonowskim z miażdżycą mózgu zmiany okołonaczyniowe (stan zatokowaty i sitowaty) nie wykazują predylekcji do istoty czarnej, lecz dotyczą głównie skorupy i gałki bladej. Stwierdzono również, że zmiany stężeń neuroprzekazników zależą również od stopnia uszkodzenia odpowiedniej struktury mózgowia (Bernheimer i wsp. 1973). Można przypuszczać, że narastanie zmian miażdżycowych prowadzi do nasilenia zaburzeń w przepuszczalności naczyń i powodując większe uszkodzenie tkanki okołonaczyniowej mózgu, może prowadzić jako dodatkowy czynnik do rozwoju zespołu parkinsonowskiego (Denny-Brown 1962).

Porównanie grupy chorych z zespołem parkinsonowskim nie leczonych z grupą chorych otrzymujących leki antycholinergiczne i pochodne L-DOPA wykazało u tych ostatnich znaczące obniżenie poziomu GABA, niewielki przyrost HVA oraz normalizację względnego wskaźnika GABA/HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obserwacje te zgodne są z wynikami innych autorów (Abbot i wsp. 1982).

#### WNIOSKI

1. Stężenia GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym są znacznie niższe u ludzi w starszym wieku z objawami miażdżycy mózgu w porównaniu do osób w wieku średnim.

2. W chorobie Parkinsona, w płasawicy Huntingtona i w łagodnym drzeniu samoistnym stwierdzono znamienne obniżenie poziomu GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych. W miażdżycy ze współistniejącym zespołem parkinsonowskim obniżenie poziomu GABA i HVA było nieznamienne.

3. W grupie chorych z miażdżycą i współistniejącym zespołem parkinsonowskim stwierdzono przesunięcie proporcji stężeń GABA/HVA w kierunku przewagi układu GABAergicznego, w pozostałych grupach chorych wskaźnik stężeń GABA/HVA był zbliżony do normy.

4. Różnice w stopniu obniżenia poziomu GABA i HVA i ich wzajemnych proporcji pomiędzy chorobą Parkinsona i miażdżycą mózgu z zespołem parkinsonowskim mogą wskazywać na odmienną topografię uszkodzeń w szlakach dopaminergicznych i różnice w ich nasileniu.

5. Nie stwierdzono zależności pomiędzy nasileniem objawów parkinsonowskich a zawartością GABA i HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym.

6. U chorych z objawami parkinsonowskimi leczonymi preparatami antycholinergicznymi lub pochodnymi L-Dopa stwierdzono znaczące obniżenie poziomu GABA, niewielki przyrost HVA oraz normalizację stosunku GABA/HVA w płynie mózgowo-rdzeniowym.

#### HOMOVANILIC ACID (HVA) AND GAMMA-AMINO BUTYRIC ACID (GABA) LEVELS IN CSF OF PATIENTS WITH EXTRAPYRAMIDAL SYNDROMES

##### Summary

GABA and HVA concentrations were measured in CSF of 12 patients with and without cerebral arteriosclerosis, in 34 patients with cerebral arteriosclerosis and parkinsonian syndrome, in 16 patients with cerebral arteriosclerosis without extrapyramidal symptoms, in 6 patients with Huntington's chorea and in 3 patients with essential tremor as well as in 10 patients without signs of organic brain damage serving as a norm.

Clinical studies comprised internal, neurological, and psychological evaluation of the patients and presence of signs of cerebral arteriosclerosis.

Statistically significant decrease of the GABA and HVA concentrations in the CSF were found in all groups of the patients with extrapyramidal syndromes with an exception of parkinsonian syndrome accompanied by cerebral arteriosclerosis. In the latter the decrease of the HVA level and the change of GABA/HVA ratio in direction of GABAergic system prevalence were stated. In the remaining patients the GABA/HVA ratio was similar to the norm. The differences of the GABA and HVA concentrations in the CSF between the patients with Parkinson's disease and the patients with arteriosclerotic parkinsonian syndrome may be connected with different topography and various intensity of lesions in both pathological entities.

Most pronounced decrease of the GABA concentration was found in Huntington's chorea, in which the level of HVA was decreased and the ratio of GABA/HVA was unchanged. No dependence was established between the intensity of extrapyramidal signs and the GABA and HVA concentration. Treatment with anti-parkinsonian drugs lead to significant decrease of the GABA concentration, to slight increase of the HVA level and to normalization of the GABA/HVA ratio.

#### ОЦЕНКА УРОВНЯ ГОМОВАНИЛИНОВОЙ КИСЛОТЫ (HVA) И ГАММА-АМИНОМАСЛОВОЙ КИСЛОТЫ (GABA) В СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ У БОЛЬНЫХ С ЭКСТРАПИРАМИДНЫМ СИНДРОМОМ

##### Резюме

Обозначался уровень GABA и HVA в спинно-мозговой жидкости (с.-м. ж.) у больных с болезнью Паркинсона (7 случаев), с артериосклеротическим паркинсоновым синдромом (39 случаев), с артериосклерозом мозга (16 случаев), хореей Гунтингтона (6 случаев), с само-

бытным доброкачественным дрожанием (3 случая) и в группе т. наз. нормы, то есть у больных без органического нарушения центральной нервной системы (10 случаев). Клинические обследования обнимали состояние внутренних органов, невропатологические и психологические исследования.

У больных с артериосклерозом мозга и во всех исследованных группах больных с экстрапиримидными расстройствами, за исключением паркинсоновского синдрома с артериосклерозом мозга, было обнаружено знаменательное статистическое понижение уровня GABA и HVA в с.-м. ж. В паркинсоновском синдроме с артериосклерозом понижается уровень HVA в с.-м. ж. и коэффициент GABA/HVA передвигается по направлению превосходства габа-эргической системы. В остальных группах больных отношение концентрации GABA/HVA приближается к норм. Разница в степени понижения уровня GABA и HVA и в соотношении их концентрации в болезни Паркинсона и артериосклеротическом паркинсоновском синдроме могут возникать из другой топографии и разного насильствия тканевых повреждений в этих болезнях. Самое большое понижение уровня GABA было обнаружено в хорее Гунтингтона. Понижению уровня GABA сопутствовало понижение концентрации HVA; отношение концентрации GABA/HVA не изменилось. Не было зависимости между насильствием пирамидных расстройств а содержанием GABA и HVA в с.-м. ж. Противопаркинсоновские лекарственные средства ведут к значительному понижению уровня GABA, небольшому увеличению HVA и нормализации отношения GABA/HVA в спинно-мозговой жидкости.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Abbot R. J., Pye I. P., Nahorski S. R.: CSF and plasma GABA levels in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1982, 45, 253—256.
2. Andersen O., Johansson B. B., Svennerholm L.: Monoamine metabolites in successive samples of spinal fluid. *Acta Neurol. Scand.*, 1981, 63, 247—254.
3. Andersson H., Roos B. E.: 5-hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid of hydrocephalic children. *Acta Paediat. Stockh.*, 1969, 58, 601—608.
4. Ashcroft G. W., Sharman D. F.: 5-hydroxyindoles in human cerebrospinal fluid. *Nature Lond.*, 1960, 186, 1050—1051.
5. Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F.: Brain dopamine and syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.*, 1973, 20, 415—455.
6. Bird E. D.: Huntington's chorea. W: Neurotransmitter systems and their clinical disorders. Red. N. J. Legg. Acad. Press, London, New York, San Francisco, 1978, 143—150.
7. Curzon G., Gumpert J., Sharpe D.: Amine metabolites in the cerebrospinal fluid in Huntington's chorea. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1972, 35, 514—519.
8. Denny-Brown D.: The basal ganglia and their relation to disorders of movement. Red. W. R. Russel. Oxford Univ. Press, 1962, 37—49.
9. Enna S. J., Wood J. H., Snyder S. H.: Gamma-aminobutyric acid GABA in human cerebrospinal fluid: radioreceptor assay. *J. Neurochem.*, 1977, 28, 1121—1124.
10. Farley I. J., Price K. S., Hornykiewicz O.: Dopamine in the limbic regions of the human brain: Normal and abnormal. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 1977, 16, 57—64.
11. Glaeser B. S., Hare T. A.: Measurement of GABA in human cerebrospinal fluid. *Biochem. Med.*, 1975, 12, 274—282.
12. Gottfries C. G., Gottfries I., Roos B. E.: Homovanilic acid and 5-hydroxyindoleacetic acid in the cerebrospinal fluid of patients with senile dementia, pre-senile dementia, and parkinsonizm. *J. Neurochem.*, 1969, 16, 1341—1345.



13. Gottfries C. G., Gottfries I., Johannson B., Olsson R., Persson T., Roos E. E., Sjöström R.: Acid monoamine metabolites in human cerebrospinal fluid and their relations to age and sex. *Neuropharmacol.*, 1971, 10, 665—672.
14. Hare T. A., Wood J. H., Manyam B. V., Gerner R. H., Ballenger J. C., Post R. M.: Central nervous system gamma-aminobutyric acid activity in man. Relationship to age, and sex as reflected in CSF. *Arch. Neurol.*, 1982, 39, 247—249.
15. Hornykiewicz O.: Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.*, 1966, 18, 925—964.
16. Johannson B. B., Roos B. E.: Acid monoamine metabolites in cerebral spinal fluid of patients with Parkinson's syndrome. *Proc. of the Eight International Congress of Neurology, Vienna, 1966*, 6/1, 141—142.
17. Johannson B., Roos B. E.: 5-hydroxyindoleacetic acid and homovanilic acid levels in the cerebrospinal fluid of healthy volunteers and patients with Parkinson's syndrome. *Life Sci.*, 1967, 6, 1449—1454.
18. Johannson B., Roos B. E.: Concentration of monoamine metabolites in human lumbar and cisternal cerebrospinal fluid. *Acta Neurol. Scand.*, 1975, 52, 137—144.
19. Kosicka B., Bugera-Piecuch T.: Stosunek stężeń DA/GABA w mózgu szczura po zatruciu chlorkiem manganowym. *Neuropat. Pol.*, 1986, (złoż. do druku).
20. Kuroda H., Ogawa N., Yamawaki Y., Nokina L., Ofuji T., Yamamoto M., Otsuki S.: Cerebrospinal fluid GABA level in various neurological and psychiatric diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.*, 1982, 45, 257—260.
21. Manyam B. V.: Low CSF gamma-aminobutyric acid level in Parkinson's disease. *Arch. Neurol.*, 1982, 39, 391—392.
22. Manyam B. V., Hare T. A.: Cerebrospinal fluid GABA measurements: Basic and clinical considerations. *Clin. Neuropharmacol.*, 1983, 6, 25—36.
23. Manyam B. V., Hare T. A., Katz L., Glaeser B. S.: Huntington's disease: Cerebrospinal fluid GABA levels in at risk individuals. *Arch. Neurol.*, 1978, 35, 728—730.
24. McGeer P. L., McGeer E. G.: Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine and GABA in human control and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J. Neurochem.*, 1976, 26, 65—76.
25. Perry T. L., Hansen S., Klester M.: Huntington's chorea: Deficiency of gamma-aminobutyric acid in brain. *N. Engl. J. Med.*, 1973, 288, 337—342.
26. Pycock C.: Other neurotransmitters in Parkinson's disease. W: *Neurotransmitter systems and their clinical disorders*. Red. N. J. Legg. Acad. Press, London, New York, San Francisco, 1978, 99—114.
27. Schmidt D., Löschner W.: Plasma and cerebrospinal fluid gamma-aminobutyric acid in neurological disorders. *J. Neurol. Neurosurg, Psychiatr.*, 1982, 45, 931—935.
28. Shoulson K., Fahn A.: Propozycja klasyfikacji międzynarodowej i terminologii oprac. przez Grupę Badawczą Chorób Pozapiramidowych Światowej Federacji Neurologii, 1977.
29. Stahl W. L., Swanson P. D.: Biochemical abnormalities in Huntington's chorea. *Neurology*, 1974, 24, 813—819.
30. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801—1805.

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

Michał Kraszpułski, Teresa Wrzolkowa: Morphometric studies of brain terminal vessels. Methodological studies . . . . .	491
Teresa Wrzolkowa, Irena Łukaszuk: Capillary vessels and pericapillary axon terminals of the subfornical organ . . . . .	499
Adam Kunicki: Relation of meningiomas to their nearest environment and its significance for recurrence of the tumor . . . . .	511
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Ewa Joachimowicz: Vascular abnormalities in the central form of neurofibromatosis . . . . .	521
Wanda Gordon-Majszak, Ryszard Pluta, Jerzy W. Łazarewicz: Effect of hyperthermia on basic parameters of peripheral arterial blood and brain lipid peroxidation in rabbit . . . . .	531
Jerzy W. Łazarewicz, Wanda Gordon-Majszak: Calcium transport and lipid peroxidation in brain cortex subcellular fractions of rabbits submitted to hyperthermia . . . . .	545
Jerzy W. Łazarewicz, Zbigniew Dąbrowiecki, Krystyna Noremberg, Anna Pastuszko, Urszula Rafałowska, Janusz Wideman: Properties of brain cortex nerve endings isolated from rabbits exposed to hyperthermia . . . . .	557
Józef Szczech, Antoni Godlewski: Appraisal of blood vessels in the rat brain following administration of nitrosourea derivatives . . . . .	573
Mieczysław Śmiałek, Hanna Królikiewicz-Sciborowska, Maria D. Skrobisz, Maria Niemczewska-Syroпольска, Małgorzata Sasinowska: Homovanillic acid (HVA) and gamma-aminobutyric acid (GABA) levels in CSF of patients with extrapyramidal syndromes . . . . .	585

## СОДЕРЖАНИЕ

Павел П. Либерски: Передаваемая спонгиозитическая энцефалопатия. Натуральные болезни и экспериментальные исследования . . . . .	431
Ирмина Б. Зельман: Морфометрический анализ процесса миелинизации в мозгу кролика „пт”. II. Мозолистое тело . . . . .	443
Мечислав Вендер, Анджей Гонджевич, Зофия Адамчевска-Гонджевич: К вопросу диагностических трудностей в диффузном склерозе мозга . . . . .	455
Мирослав Я. Моссаковски, Войцех Хильгер, Славомир Янушевски: Оценка морфологических изменений в центральной нервной системе в экспериментальном постстранимационном синдроме. Предварительное сообщение . . . . .	471
Michał Kraszpułski, Teresa Wrzolkowa: Морфометрическая оценка терминальных сосудов мозга . . . . .	491
Teresa Wrzolkowa, Irena Łukaszuk: Капиллярные сосуды и околососудистые нервные окончания подсводного органа . . . . .	499
Adam Kunicki: Отношение менингиом к ближайшей среде и его значение в возникновении рецидива опухоли . . . . .	511
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Ewa Joachimowicz: Сосудистые изменения в центральной нервной системе в неврофиброматозе . . . . .	521
Wanda Gordon-Majszak, Ryszard Pluta, Jerzy W. Łazarewicz: Влияние повышенной температуры среды на основные параметры периферической артериальной крови и пероксидацию липидов коры мозга кролика . . . . .	531
Jerzy W. Łazarewicz, Wanda Gordon-Majszak: Влияние гипертермии на транспорт кальция и содержания липидов в субклеточных фракциях коры мозга кролика . . . . .	545
Jerzy W. Łazarewicz, Zbigniew Dąbrowiecki, Krystyna Noremberg, Anna Pastuszko, Urszula Rafałowska, Janusz Wideman: Гипертермия и свойства изолированных нервных окончаний коры мозга кролика . . . . .	557
Józef Szczech, Antoni Godlewski: Оценка состояния кровеносных сосудов мозга крысы после подаяния дериватов нитрозомочевины . . . . .	573
Mieczysław Śmiałek, Hanna Królikiewicz-Sciborowska, Maria D. Skrobisz, Maria Niemczewska-Syroпольска, Małgorzata Sasinowska: Оценка уровня гомованилиновой кислоты HVA и гамма-аминомасляной кислоты GABA в спинно-мозговой жидкости у больных с экстрапирамидным синдромом . . . . .	585

SPIS TRESCI

Paweł P. Liberski: Przekazywalna encefalopatia gąbczasta. Choroby naturalne i badania eksperymentalne . . . . .	431
Anna Taraszewska, Irmina B. Zelman: Morfometryczna ocena procesu mielinizacji w mózgu królika pt. II. Spoidło wielkie . . . . .	443
Mieczysław Wender, Andrzej Goncerzewicz, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz: Przyczynek do zagadnień diagnostycznych w stwardnieniu rozlanym mózgu . . . . .	455
Mirosław J. Mossakowski, Wojciech Hilgier, Sławomir Januszewski: Ocena zmian morfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym w doświadczalnym zespole poreanimacyjnym . . . . .	471
Michał Kraszpulski, Teresa Wrzołkowa: Morfometryczna ocena naczyń terminalnych mózgu. Badania metodologiczne . . . . .	491
Teresa Wrzołkowa, Irena Łukaszyk: Naczynia włosowate i zakończenia nerwowe okołonaczyniowe narządu podsklepieniowego . . . . .	499
Adam Kunicki: Stosunek oponiaków do najbliższego otoczenia oraz jego znaczenie dla powstawania odrostów guza . . . . .	511
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Ewa Joachimowicz: Zmiany naczyniowe w ośrodkowym układzie nerwowym w nerwiakowłókniakowości . . . . .	521
Wanda Gordon-Majszak, Ryszard Pluta, Jerzy W. Łazarewicz: Wpływ podwyższonej temperatury otoczenia na podstawowe parametry obwodowej krwi tętniczej oraz peroksydację lipidów kory mózgu u królika . . . . .	531
Jerzy W. Łazarewicz, Wanda Gordon-Majszak: Wpływ hipertermii na transport wapnia i zawartość produktów peroksydacji lipidów we frakcjach subkomórkowych kory mózgu królika . . . . .	545
Jerzy W. Łazarewicz, Zbigniew Dąbrowiecki, Krystyna Noremborg, Anna Pastuszko, Urszula Rafałowska, Janusz Wideman: Hipertermia a właściwości izolowanych zakończeń nerwowych kory mózgu królika . . . . .	557
Józef Szczech, Antoni Godlewski: Ocena stanu naczyń krwionośnych mózgu szczura po podawaniu pochodnych nitrozomocznika . . . . .	573
Mieczysław Śmiałek, Hanna Królikiewicz-Ściborowska, Maria D. Skrobisz, Maria Niemczewska-Syropolska, Małgorzata Sasinowska: Poziom kwasu homowanilinowego (HVA) i kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w płynie mózgowo-rdzeniowym chorych z zespołami pozapiramidowymi . . . . .	585

CONTENTS

Paweł P. Liberski: Transmissible spongiform encephalopathies. Spontaneous diseases and experimental studies . . . . .	431
Anna Taraszewska, Irmina B. Zelman: Morphometric studies on myelin development in pt rabbit. II. Corpus callosum . . . . .	443
Mieczysław Wender, Andrzej Goncerzewicz, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz: Contribution to the problem of diagnosing of cerebral diffuse sclerosis . . . . .	455
Mirosław J. Mossakowski, Wojciech Hilgier, Sławomir Januszewski: Morphological abnormalities in the central nervous system of rats in experimental postresuscitation period . . . . .	471