

2922

18. GRUDZ 1975



STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

P. 105

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

~~Mo~~

PROCEEDINGS
OF
INTERNATIONAL DANUBE SYMPOSIUM OF NEUROLOGY,
NEUROPATHOLOGY AND CHILD NEUROLOGY
ON
„INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL CHEMICAL AND PHYSICAL
FACTORS ON THE NERVOUS SYSTEM”

Poznań, 14—16 November, 1974

TOM XIII

1975

ZESZ. 3-4

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XIII

Lipiec-Grudzień 1975

Nr 3-4

KOMITET REDAKCYJNY

Janusz Groniowski (Warszawa), *Hanna Jędrzejowska* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Szczecin), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Danuta Markiewicz* (Pruszków), *Mirosław Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmína Zelman* (Warszawa)

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaert (Antwerpia), *Werner Jänisch* (Erfurt), *Igor Klatzo* (Bethesda), *Istvan Környey* (Pecs), *William H. McMenemey* (London), *Jochen Quandt* (Bernburg-Saale), *Franz Seitelberger* (Wiedeń), *Istvan Tariska* (Budapeszt).

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, *Adam Kunicki*, *Mirosław Mossakowski*, *Ewa Osetowska*
Mieczysław Wender

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmína Zelman*
Sekretarz Redakcji: *Tadeusz Majdecki*
Sekretarz techniczny: *Władysława Smolińska*

ADRES REDAKCJI

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

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



CH. EGGERS

DURCH VERGIFTUNGEN HERVORGERUFENE HALLUZINATORISCHE
SYNDROME IM KINDESALTER

Universitäts-Kinderklinik, Heidelberg

Tempo und Intensität der Entwicklung neuer chemischer und speziell pharmakologischer Substanzen sind für die wachsende Gefährdung insbesondere von Kleinkindern durch Vergiftungen verantwortlich. In der BRD kommt es bei etwa 20 000 bis 30 000 Kindern pro Jahr zu einer Intoxikation mit Chemikalien bzw. pharmazeutischen Präparaten. Nicht selten treten bei Ingestionen von solchen Substanzen psychische Begleitsymptome auf: Störungen der Orientierung, der Gedächtnisfunktion, der Wahrnehmung, des Denkens, des Antriebs, des Gemüts und des Gefühls. Psychische Störungen bei Intoxikationen sind um so eher zu erwarten, je grösser die psychotrope Wirkung des eingenommenen Pharmakons ist. Die höchste psychotrope Wirkung kommt den sogen. Psychotomimetica zu wie (LSD, Haschisch, Psilocybin, Mescaline, Amphetamin). Die Einnahme solcher Substanzen führt in der Regel zum Auftreten von organischen Psychosen, sie sind phänomenologisch gekennzeichnet durch Störungen der Wahrnehmung (Sinnes-täuschungen, illusionäre Verkennungen), des Denkablaufs (Verlangsamung oder Inkohärenz des Gedankengangs bis zur Zerfahrenheit), des Antriebs (Initiativeverlust, Gehemmtheit, hektische Betriebsamkeit, motorische Erregungszustände), der Stimmung (ängstlich-depressiv oder euphorisch-enthemmt, zornig-erregt) und der emotionalen Steuerung (Affektlabilität, abnorme Reizbarkeit, Explosivität oder Apathie). Häufig, insbesondere im akuten Stadium, ist das Bewusstsein getrübt. Die Bewusstseinsstörung kann verschiedene Grade annehmen von der leichten Benommenheit bis zur Bewusstlosigkeit.

Eine Sonderform der exogenen, körperlich bedingten Psychosen stellt die sogen. „Halluzinose“ dar, ein Krankheitsbild, das durch das Fehlen von Bewusstseins- und Orientierungsstörungen und das Dominieren von Halluzinationen gekennzeichnet ist. Die Sinnestäuschungen beherrschen das psychopathologische Bild so sehr, dass die anderen soeben erwähnten psychotischen Symptome völlig zurücktreten. Gegenüber den sehr viel häufigeren Vergiftungs-Delirien sind Halluzinosen im Erwachsenenalter selten, sie kommen dort vor als Alkohol-Halluzinose mit Stimmenhören (sogen. Verbal-Halluzinose) — sie ist im Vergleich zum Alkohol-Delir wenig

bekannt und seltener — und als sogen. taktile Halluzinose, bekannt unter der Bezeichnung „Dermatozoenwahn“. Im Kindesalter wurde das Krankheitsbild der Halluzinose bislang nicht eigens herausgearbeitet und nicht von den übrigen exogenen Psychoseformen und insbesondere den Vergiftungsdelirien abgegrenzt.

Wir haben in den letzten Jahren an der Universitäts-Kinderklinik Heidelberg 7 Kinder mit einer halluzinatorischen Intoxikations-Psychose beobachtet, die jeweils durch das Fehlen von Bewusstseins- und Orientierungsstörungen — Achsensymptome einer deliranten Psychose — charakterisiert waren und bei denen vorwiegend optische aber auch akustische Halluzinationen im Vordergrund des psychopathologischen Zustandsbildes standen. Die Kinder im Alter von 2—9 Jahren sahen bevorzugt Tiere wie Krokodile, Schlangen, Hasen, Hunde, Elefanten sowie Würmer und Insekten, vor denen sie sich fürchteten. Auch Gegenstände wie Schiffe, Autos, Ringe, Sessel und Bälle wurden halluziniert. Teilweise sahen die Kinder Märchengestalten wie Hexen, Engel, Zwerge, maskierte Gestalten oder eine Fee. Die Stimmung war dabei stark ängstlich und bei zwei Kindern auch freudig-erregt. Andere psychotische Symptome bestanden nicht. Die Erscheinungsbilder waren flüchtig und verschwanden innerhalb weniger Stunden bis Tage.

Zwei Kinder hatten Tantum eingenommen, ein Benzylamin-Ankömmling, der entzündungshemmend, analgetisch und abschwellend wirkt, dem aber für gewöhnlich keinerlei psychotrope Wirkung zukommt. Einmal hatte es sich um eine Vergiftung mit Atropin gehandelt, einmal mit Haschisch, einmal mit dem Appetitzügler Ponderax, einem Amphetamin-Abkömmling (Fenfluramin). Bei einem 4-jährigen Jungen trat die Halluzinose eine Stunde nach der intravenösen Injektion von 1 Amp. Akineton auf, das wegen eines akuten extrapyramidal-dystonen Syndroms nach Paspertin gegeben worden war. Ein 10-jähriges Mädchen hatte Arbid Drag. eingenommen, ein Antischnupfenmittel, welches das Antihistaminikum Diphenylpyralinhydrochlorid enthält.

Zur Veranschaulichung des Krankheitsbildes sei ein Fall kurz dargestellt:

Ein 3-jähriger Junge hatte 10 Drg. Tantum, entsprechend 500 mg Benzylamin eingenommen, 3 Std. danach geriet das prämorbid gemüthafte, phantasiebegabte und tierliebe Kind in einen hochgradigen Erregungszustand mit starker Angst. Es schrie: „Ich bin von einer Schlange gebissen“, „da ist ein Krokodil“; „bringt die Tiere weg“, „da ist Blut“. Das Kind versuchte die Tiere, die es halluzinierte, totzutreten oder sich durch heftige Abwehrbewegungen vor ihnen zu schützen. Die äusserst starke motorische Unruhe mit choreatiform anmutenden Bewegungen hatte paroxysmalen Charakter, wobei die Intervalle zwischen den „Anfällen“ sehr kurz waren (Sekunden bis Minuten). Der Junge halluzinierte weiterhin „Schlangen, Krokodile, Elefanten und Hunde“, die ihn beißen wollten und sah Blut am Bett, an sich selbst, an der Mutter und am Arztkittel. Das Bewusstsein war erhalten; der Junge war voll orientiert und antwortete adäquat auf Fragen. Nach etwa 12 Std. war der Junge wieder unauffällig, die Stimmung war jedoch deutlich gehoben, heiter; der Junge war logorrhöisch, freundlich, zugewandt und lebhaft.

Es hatte sich also um eine optische Halluzinose bei einem 3-jährigen Jungen gehandelt, die sich etwa 3 Std. nach der Einnahme von 10 Drag. Tantum entwickelte und nach etwa 12 Std. mit einer Phase gehobener Stimmung spontan wieder abklang, ohne Residualsymptome zu hinterlassen. Die optischen Trugwahrnehmungen waren mit hochgradigen Angst- und Erregungszuständen verknüpft, die jedoch nicht mit Bewusstseins- oder Orientierungsstörungen einhergingen.

Wie einleitend erwähnt, sind es ganz verschieden strukturierte Pharmaka, die im Kindesalter halluzinationsauslösend sein können. Einen Überblick über die wichtigsten Pharmakagruppen, die im Kindesalter Halluzinationen hervorrufen können, gibt die Tabelle 1.

Tabelle 1. Substanzgruppen, die zum Auftreten von Sinnestäuschungen führen können:

Tabela 1. Grupy substancji, które mogą prowadzić do wystąpienia omamów

Belladonnaalkalide
 Alkaloidy belladony
Antihistaminica
Psychomimetica
Hypnotica
Tranquilisatoria
Antipsychotica (Neuroleptica, Antidepressiva)
Analgetica
Anthelminthica
 organische Lösungsmittel
 rozpuszczalniki organiczne

Halluzinosen sind also nicht auf bestimmte Pharmaka und Substanzen beschränkt. Das psychopathologische Bild ist zwar für einzelne Substanzen typisch aber keineswegs spezifisch. Die aufgeführten Substanzen können nicht nur zu Halluzinosen ohne Bewusstseins- und Orientierungsstörungen führen, sondern auch delirante Psychosen hervorrufen. Es können andererseits auch paranoide Zustände, symptomarme Verwirrheitszustände, depressive, manische, amnestische oder hyperaesthetisch-emotionale Syndrome als psychopathologische Nebenwirkungen der verschiedenen, in der Tabelle 1 aufgeführten Medikamente auftreten.

Wie kommt es nun zum Auftreten von Sinnestäuschungen unter Einwirkung dieser verschiedenen Substanzen. Zunächst ist festzustellen, dass es noch keine befriedigende generelle Theorie über die Entstehungsbedingungen von Halluzinationen gibt. Es gibt aber eine Reihe von neurophysiologischen und neurochemischen Befunden, die — vorerst noch Mosaiksteine einer möglichen Halluzinationstheorie — zum Verständnis für das Entstehen von Halluzinationen beitragen können. So lassen beispielsweise Untersuchungen von Rinaldi und Himwich (1955) sowie Bradley u. Mitarb. (1957, 1958) darauf schliessen, dass die in der Tabelle 1 zuerst erwähnten

Substanzgruppen, nämlich Belladonnaalkaloide wie Atropin und dessen Abkömmlinge und die Antihistaminica, die bei Kindern typische Halluzinosen hervorrufen können, auf die *Formatio reticularis* des Zwischen- und Mittelhirns sowie auf die zu ihr hinziehenden Kollateralen der sensorisch-afferenten Bahnen wirken. Dasselbe gilt für die wirksamen Bestandteile des Haschisch, die sogen. Tetrahydrocannabinole. Heath (1973) beobachtete bei Rhesusaffen unter Einfluss von Haschischrauch EEG-Veränderungen vorwiegend in der Septumregion, aber auch im ventro-lateralen Thalamusbereich und im Hippocampus.

Auch andere Halluzinogene wie LSD, Mescaline und Amphetamin wirken auf die mesodiencephale *Formatio reticularis*, thalamisch-hypothalamische Regionen, den Nucleus caudatus und das limbische System, wie neuere Untersuchungen von Aghajanian (1972), Heath (1973), Matveyev (1970), Neuhoff (1967), Neuhoff u. Mitarb. (1968), Rossi (1971), Stille (1972) und Stumpf u. Mitarb. (1962) gezeigt haben. Hervorhebenswert ist die Beobachtung von Heath, dass sich unter Einwirkung von Psychotomimetika bei Affen eine abnorme Spike-wave-Aktivität in der zum limbischen System gehörenden Septumregion zeigt. Diese hirnelektrischen Veränderungen waren korreliert mit einem Verhalten der Tiere, das demjenigen psychotischer Patienten glich. Nun stehen die verschiedenen Teile des limbischen Systems und des Zwischenhirns unter anderem über den limbic forebrain circuit und das medial forebrain bundle miteinander in anatomischer und damit funktionseller Verbindung. Über aufsteigende Leitungsbahnen das medial forebrain bundle erhält das limbische System im übrigen auch afferente Impulse von verschiedenen Sinnesorganen, so dass es vorstellbar ist, dass aus der Peripherie kommende sensorische Reize durch Veränderungen im Bereich des limbischen Systems zu Trugwahrnehmungen verfälscht werden könnten. Andererseits haben sowohl das limbische System, insbesondere das Septum und das Corpus amygdaloideum, sowie die thalamisch-hypothalamische Region eine besondere Bedeutung für die Affektivität, die wiederum am Wahrnehmungsvorgang entscheidend mitbeteiligt ist. Bevor der Einfluss affektiv-emotionaler Faktoren auf die Wahrnehmung und ihre Störungen diskutiert wird, muss erwähnt werden, dass dem Thalamus ausser seinen emotionssteuernden Funktionen auch eine Filterwirkung auf aus der Peripherie kommende sensible und sensorische Reize zukommt, so dass er u.a. in die Lage versetzt wird, die Sehrinde vor störenden optischen Reizen zu schützen (Pöttl 1928, Becker und Sternbach 1953). Es ist vorstellbar, dass diese Filterfunktion durch toxische, halluzinogen wirkende Substanzen beeinflusst bzw. gehemmt wird. Auf diese Weise könnte es zu einer Überflutung der Rinde mit sensorischen Reizen kommen, was wiederum das Auftreten von Trugwahrnehmungen begünstigt.

Eine Kontrollfunktion bei der Verarbeitung von Sinnesreizen kommt auch dem Corpus striatum zu. So wäre es zu verstehen, dass es insbesondere durch Halluzinogene wie Amphetamin und dessen Abkömmlinge wie z.B. Fenfluramin, die auf das dopaminerge Striatum wirken, zu einer Einbusse der Filterfunktion des Corpus striatum und dadurch zu einem Überangebot des Gehirns mit Informationen aus

den peripheren Sinnesorganen kommt und so eine Disposition zu Sinnestäuschungen entsteht.

Amphetamin setzt bekanntlich Monamine wie Dopamin aus den synaptischen Speichervesikeln frei. Dopamin strömt folglich zum postsynaptischen Rezeptor. Im Gegensatz zum Reserpin, das bekanntlich antipsychotisch wirksam ist und ebenfalls Dopamin freisetzt, verzögert Amphetamin aber gleichzeitig die Wiederaufnahme des freigesetzten Dopamins in die praesynaptische Nervenendigung, so dass Dopamin länger am Rezeptor zur Verfügung steht. Ausserdem wird durch Amphetamin die Speicherung des Dopamins in den Speichervesikeln nicht gehemmt, wie dies beim Reserpin der Fall ist, so dass das Dopamin vor dem Abbau durch die Monoaminoxidasen in den Mitochondrien der praesynaptischen Nervenendigung geschützt ist. Die andersartige Wirkung des Amphetamins gegenüber dem Reserpin liegt also in einer Verhütung des vorzeitigen Abbaus des freigesetzten Dopamins durch die Monoaminoxidasen; der neuroleptische Effekt des Reserpins beruht dagegen möglicherweise umgekehrt auf der Hemmung der Wiederaufnahme der freigesetzten Monamine in die Speichergranula, so dass sie infolgedessen von den Monoaminoxidasen in den praesynaptischen Mitochondrien desaminiert und inaktiviert werden können. Das durch Amphetamin freigesetzte Dopamin wirkt als inhibitorischer Transmitter polarisierend auf den praesynaptischen Rezeptor, wodurch es zu einer Verminderung der neuralen Impulse im Striatum kommt und dessen Funktion als Filter für sensorische Reize folglich gehemmt wird. (Die Einbusse der Hemm- und Kontrollfunktion für motorische Impulse äussert sich in einem gesteigerten Bewegungsdrang, beim Tier in typischen Automatismen und Stereotypen — „Amphetamin-Stereotypie“).

Die Frage nach den Entstehungsbedingungen von Trugwahrnehmungen während der Intoxikations-Psychose ist durch organische, speziell neurophysiologische Befunde allein nicht zu klären. Es kommen neben exogen-organischen Bedingungsfaktoren noch andere hinzu. Hierzu gehören ganz wesentlich Stimmung und Emotionalität. Dass unter dem Druck starker Affekte illusionäre Umdeutungen real vorhandener Gegenstände der Umgebung vorkommen können, ist jedem bekannt. Die Affektlage hat einen wichtigen Anteil am Wahrnehmungserleben, insbesondere der Wesens- und Ausdruckseigenschaften eines Wahrnehmungsgegenstandes. Dass es unter der Einwirkung einer gesteigerten Emotionalität, z.B. hochgradiger Angst oder auch starker depressiver Verstimmung bei Kindern zu illusionären Umdeutungen real vorhandener Gegenstände oder auch zu echten Trugwahrnehmungen kommen kann, ist dem, der mit Kindern umgeht, bekannt. Die Wahrnehmungswelt des Kleinkindes ist eine Welt des Ausdrucks, eine „physiognomische Welt“ (Werner 1959). Das geht Hand in Hand mit einem Mangel an Differenzierung, wobei die Unterschiede zwischen Vorstellung und Wahrnehmung noch weitgehend zurücktreten. Dadurch treten in dieser Altersphase leichte Phänomene auf, die dem Erwachsenen als illusionäre Verknennung oder gar als Trugwahrnehmung imponieren.

Diese entwicklungspsychologischen Tatbestände wirken synergistisch mit den

erwähnten durch die Intoxikationen bedingten neurophysiologischen Veränderungen: Es ist unsere Vermutung, dass letztere zu einer Entdifferenzierung zwischen Wahrnehmung und Vorstellung, zwischen objektivem und subjektivem Erleben und zu einem Überwiegen des gefühlhaft-subjektiven Erlebens beim Kind führen, dessen Realitätsbezug noch mangelhaft entwickelt ist. Diese Verwischung von Wahrnehmungs- und Vorstellungswirklichkeit ist für die Neigung zur Ausbildung halluzinatorischer Erlebnisse beim Kind mitverantwortlich. So werden auch das im Kindesalter so häufige Vorkommen von Fieber-Halluzinosen sowie die Tatsache verständlich, dass primär nicht halluzinogen wirksame Substanzen wie das Benzylamin im Kindesalter Halluzinationen hervorrufen können.

Ch. Eggers

ZESPOŁY HALUCYNACYJNE W WIEKU DZIECIĘCYM WYWOŁANE PRZEZ ZATRUCIA

Streszczenie

Poddano obserwacji 7 dzieci (5 chłopców i 2 dziewczynki) w wieku od 2 do 10 lat, u których w przebiegu zatrucia wystąpił zespół ostrych halucynacji wzrokowych. Zaburzenia te we wszystkich przypadkach przeminęły bez następstw w ciągu kilku godzin lub dni. Dzieci miały wzrokowe halucynacje ruchowe (szczególnie zwierzęta), były przy tym wyraźnie pobudzone lękowo i wykazywały nadmierną aktywność ruchową (sprawiającą wrażenie hyperaktywności pozapiramidowej). Nie stwierdzono u dzieci zaburzeń świadomości i orientacji. W 2 przypadkach zespół halucynacji wystąpił po zatruciu benzylaminą, w pozostałych przypadkach po zatruciu akinetonem, atropiną, arbidem, fenylfluraminą i chaszyszem (marihuaną). Omówiono neurofizjologiczne, neurochemiczne i psychologiczno-rozwojowe aspekty powstania omamów wzrokowych.

К. Эггерс

ГАЛЛЮЦИНАЦИОННЫЙ СИНДРОМ В ДЕТСКОМ ВОЗРАСТЕ, ВЫЗВАННЫЙ ОТРАВЛЕНИЯМИ

Резюме

Под наблюдением было 7 детей (5 мальчиков и 2 девочки) в возрасте от 2 до 10 лет, у которых при отравлении выступил синдром острых зрительных галлюцинаций. Нарушения эти во всех случаях прошли в течение нескольких часов или дней без последствий. У детей были подвижные зрительные галлюцинации, при этом дети были явно встревожены и обнаруживали чрезмерную двигательную активность (оставляющую впечатление экстрапирамидной гиперактивности). У детей не обнаруживалось нарушения сознания и ориентировки. В двух случаях галлюцинационный синдром появился после отравления бензиламином, в остальных случаях после отравления akinetonом, арбидом, фенилфторамином и гашишем (марижуаной). В работе обсуждаются нейрофизиологические, нейрохимические и психологически-возрастные аспекты возникновения зрительных галлюцинаций.

LITERATUR

1. Aghajanian G. K.: LSD and CNS transmission. *Ann. Rev. Pharmacol.* 1972, 12, 157.
2. Becker A. M., Sternbach J.: Über Zeitsinnstörung bei Thalamusherden. *Wien. Z. Nervenheilk.* 1953, 7, 62.
3. Bradley P. B., Elkes J.: The effects of some drugs on the electrical activity of the brain. *Brain* 1957, 80, 77.
4. Bradley P. B., Key B. J.: The effect of drugs on arousal responses produced by electrical stimulation of the reticular formation of the brain. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 1958, 10, 97.
5. Heath R. G.: Marijuana: effects on deep and surface electroencephalograms of rhesus monkeys. *Neuropharmacology* 1973, 12, 1.
6. Himwich H. E., Morillo A., Steiner W. G.: Drugs effecting rhinencephalic structures. *J. Neuropsychiat.* (Chicago), supp. 1, 1962, ad. wol. 3, 15.
7. Matveyev V. F.: Pathomorphological changes in the brain of experimental animals chronically poisoned with lysergic acid. *Zh. Nevropath. Psikhiat. (Korsakov)* 1970, 70, 1956.
8. Neuhoff V.: Die Wirkung von Lysergsäurediäthylamid auf Ganglienzellen. 1. Mitteilung. *Arzneim. Forsch. (Drug. Res.)* 1967, 17, 176.
9. Neuhoff V., Müller D., Meulen, ter V.: Die Wirkung von Lysergsäurediäthylamid auf Ganglienzellen. 2. Mitteilung. *Arzneim. Forsch. (Drug. Res.)* 1968, 18, 946.
10. Pötzl O.: Die Aphasielehre vom Standpunkt der klinischen Psychiatrie. 1. Band: Die optisch-agnostischen Störungen. In: Aschaffenburg, G., (ed.): *Handbuch der Psychiatrie. Spezieller Teil, 3. Abteilung, 2. Hälfte, 2. Bd.* Leipzig-Wien: Deuticke 1928.
11. Rinaldi F., Himwich H. E.: Drugs effecting psychotic behaviour and the function of the mesodiencephalic activating system. *Dis. Nerv. Syst.* 1955, 16.
12. Rossi V. G.: LSD — a pharmacologic profile. *Amer. J. Pharmacy* 1971, 143, 38.
13. Stille G.: Das Drogenenerlebnis als biologisches Problem. *Schweiz. med. Wschr.* 1972, 101, 1257.
14. Stumpf C., Petsche H., Gogolak G.: The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.* 1962, 14, 212.
15. Werner H.: *Einführung in die Entwicklungspsychologie.* 4. Aufl. München: John. Ambrosius Barth, 1959.

Anschrift der Verfasser: Priv. Doz. Dr. Christian Eggers, Abteilung für Kinder- und Jugendpsychiatrie. 74 Tübingen, Osianderstr. 14.

HARTMUT SCHNEIDER, R. DICHT, H. SCHACHINGER

THE NEUROPATHOLOGY OF RESPIRATORY DISORDERS OF THE PREMATURE AND MATURE NEONATE

Institut für Neuropathologie, Klinikum Steglitz
Pathologisches Institut, Klinikum Charlottenburg
Universitätskinderklinik, Freie Universität, Berlin-West

Brain lesions after perinatal asphyxia and respiratory distress syndrome have been described frequently in the neonate. One unsolved problem of the neonatal neuropathology is, whether brain damage is the cause or the result of perinatal complications. In the reciprocal action of central and cardiopulmonary disorders the manifestation of brain damage is often the final result in the course of intensive treatment.

Most publications report telencephalic lesions. The role of primary brain stem lesions in the pathogenesis of respiratory disorders remain obscure. Norman (1972) described symmetrical neuronal loss and gliosis in the reticular formation, inferior colliculi, basal ganglia and cortex in three children with low Apgar scores, respiratory depression and short survival. In 1974 Norman published unilateral encephalomalacia in cranial nerve nuclei of two babies. Essbach and Rühl (Essbach, 1961) found pericapillary hemorrhages in the reticular formation of the medulla oblongata with increasing frequency in premature and small-for-date infants.

We tried to correlate respiratory embarrassment and neuropathological findings in 53 infants with perinatal distress and death within 10 days after birth. Special regard was contributed to pathological changes in the posterior cranial fossa, i.e. lesions of the cerebellum and brain stem. Since the distinction between ischemic and artificial nerve cell changes is rather difficult and often impossible in paraffin-embedded material the microscopical studies were done on celloidin-embedded material. Frozen sections were used for impregnation techniques.

RESULTS

Table 1 shows the kind and frequency of respiratory disorders in the perinatal period. There were 20 infants with central respiratory insufficiency, apnoe, gasping or respiratory paralysis.

Table 1. Respiratory embarrassment in 53 cases of perinatal death

Kind of respiratory embarrassment	Number of cases
Central respiratory depression	20
apnea, gasping pattern	8
respiratory arrest	12
Respiratory distress syndrome	14
Artificial respiration	31

The typical respiratory idiopathic distress syndrome (RDS) developed in 14 infants. Premature infants with RDS and short survival had often intraventricular bleeding or subarachnoid hemorrhages in the posterior fossa. Selective lesions of the dorsal vagal nucleus (Buckingham et al., 1967), however, were absent in cases with RDS. Children with severe RDS and survival over several weeks also failed to show any specific changes in the brain stem nuclei.

When artificial respiration is performed the interpretation of ventilatory insufficiency may be impeded. Furtheron, the intensive treatment allows the manifestation of secondary brain lesions due to the prolonged survival of non-viable infants

Table 2. Lesions of the CNS in 53 cases of perinatal death

Type of the CNS lesion	Number of cases
Birth injury	7
(tentorial tear, subdural hemorrhage)	
Subarachnoidal hemorrhage	34
supratentorial	21
infratentorial	16
combined	18
Intraventricular hemorrhage	11
Intracerebral hemorrhage	13
(Hemorrhagic) Necrosis	23
Edema (without hemorrhage)	6
Developmental anomalies	3
no lesion	6

This may be one explanation for the fact that only 6 infants had no macroscopical lesions of the central nervous system.

Table 2 demonstrates the frequency of subarachnoid hemorrhages (SAB). There is often the combination of supra- and infratentorial SAB. The massive hemorrhage into the lateral ventricles — mostly originating from the plexus — dominates as cause of death in premature children. The symptomatology of the newborn with

intracranial hemorrhage is rather uniform and does not allow the precise localization of the hematoma (Joppich, Schulte; 1968)

The pathological processes in the posterior fossa are listed in Table 3.

Table 3. Infratentorial lesions in 53 cases of perinatal death

Type of lesion	Number of cases
Tentorial tear	6
Subarachnoidal hemorrhage	26
space occupying	15
Intracerebellar hemorrhage	5
space occupying	1
Necrosis of the brain stem	10
unilateral	2
symmetrical tegmental necrosis	8
Diffuse ischemic-anoxic lesions	16
Developmental anomalies	2

The massive bulbo-cerebellar hemorrhage is generally taken as being lethal. In our cases the massive infratentorial hemorrhage often occurs 5—8 days after birth as a final event (Fig. 1). This indicates that birth trauma plays no significant role in the pathogenesis of the bulbo-cerebellar hemorrhage. This is consistent with the fact that, on the other hand, tentorial rupture is generally followed by massive hemorrhages. Except two children with „unexpected death”, 2 resp. 26 hours after delivery, where the autopsy revealed tentorial tears, the rupture of the tentorium was survived for 3—8 days in 4 children. Only in one of these children birth trauma had been clinically evident (Fig. 2). In the other cases the tentorial tear was one of several severe lesions and anomalies (intraventricular hemorrhage, rh-incompatibility, multiple malformations, trisomie 18). Obviously, birth trauma is only one of several pathogenetic factors in the perinatal period today. Also in cases with malformations of the infratentorial structures (Arnold-Chiari-, Dandy-Walker-syndrome, ponto-cerebellar hypoplasia) the postnatal respiratory disturbances are generally missed.

Beside the hemorrhagic manifestations the ischemic-anoxic lesions of brain stem structures represents the most important group in Table 3. Unilateral lesions of the brain stem are rare (Fig. 3). The anoxic origin of lesions is presumable when severe perinatal asphyxia, low Apgar values and neurological deficits are known and neuropathological examination reveals symmetrical neuronal loss, even tissue necrosis throughout the central nervous system (Fig. 4). The term „anoxic lesion” is used in a wide sense, since several different factors lead to the final common pathway of deficiency or lack of oxygen. It was found that different pathological conditions like perinatal asphyxia, cardiac arrest, convulsions, hypoglycemia (Grif-

fiths, Laurence; 1974) or bilirubin encephalopathy (Chen, 1964) are able to produce a rather identical lesion pattern in the brain. Thereby, the nuclei of the dorsal columns and the Vth and VIIIth cranial nerves, the periaqueductal gray and inferior colliculi demonstrate a particular vulnerability. Ranck and Windle (1959) and Myers (1972) demonstrated distinct symmetrical lesions in the motor nuclei of the brain stem in the neonate monkey subjected to asphyxia resp. total oxygen lack.

The interpretation of histological findings may be difficult even in celloidin sections, when the survival of the baby is short and the cell changes not yet pronounced (Fig. 4). The peculiar vulnerability of brain stem structures in the neonatal period becomes evident after a defined anoxic incident and prolonged survival due to resuscitation. In 8 children we observed a severe postischemic encephalopathy due to temporary cardiac arrest with permanent respiratory paralysis, flaccidity, loss of brain stem and spinal reflexes (Schneider, Dicht; 1974). Autopsy revealed symmetrical necroses in the reticular formation of medulla oblongata, pons and midbrain (Fig. 5 and 6). Severe loss, even necroses were present also in the cerebellar nuclei, basal ganglia and cerebellar and cerebral cortex, but the necrotizing damage to the tegmental structures of the brain stem dominates as the most constant pattern and is responsible for the irreversible coma of the newborns.

Even if these anoxic lesions of the reticular formation are extreme, their extent and localization indicate the particular sensitivity of the tegmental structures of the brain stem in the perinatal period. Probably, the functional disintegration of the reticular neuronal network precedes any distinct structural changes and escapes the histological observation. The impairment of respiratory rhythmicity is one important consequence of the anoxic damage to the brain stem. The phylogenetically older structures of the central nervous system, e.g. the tegmentum of the brain stem, seem to be less tolerant towards anoxia in the neonatal period. The vulnerability of the reticular formation is not the expression of immaturity. In their experimental work Jilek et al. (1964) stated that „in the youngest animals the phylogenetically oldest parts of the central nervous system were damaged intensively”. It is not clear, however, whether the sensitivity of the reticular formation is caused by the higher metabolic requirement in the neonatal period or by a particular vascularisation resp. hemodynamic situation (Gilles, 1968).

CONCLUSIONS

Neuropathological studies were done in 53 infants after neonatal death (within 6—10 days after birth). The intensive treatment implicates a high incidence of secondary brain lesions due to the prolonged survival. Only 6 infants showed no significant damage to the brain. Birth trauma seems to play no significant role in the pathogenesis of the perinatal death.

The most abundant findings were subarachnoidal, intracerebral and intraventricular hemorrhages, but there is no exact correlation between localization and functional

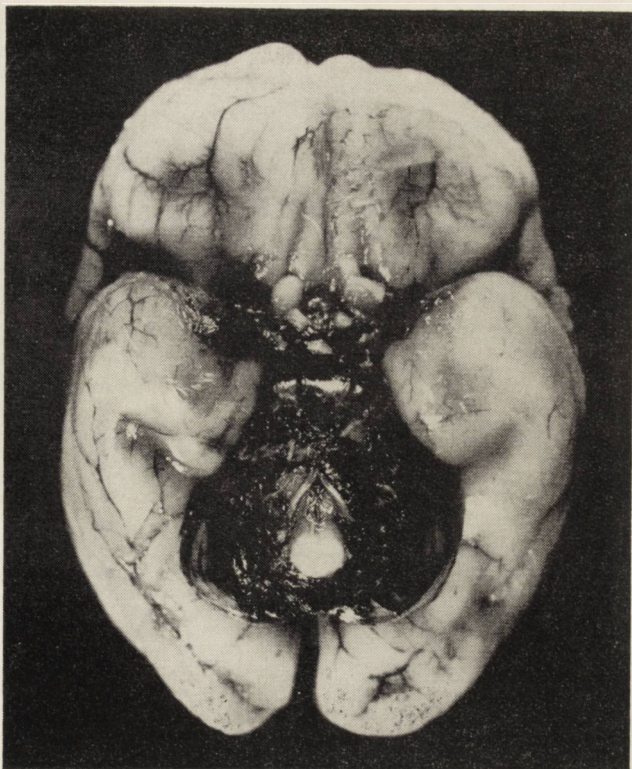


Fig. 1. Bulbo-cerebellar hemorrhage. The premature infant (30th week of gestation) developed respiratory distress and died 4 days after birth under acute respiratory paralysis. Case 222/74.

Ryc. 1. Ognisko krwotoczne opuszkowo-mózdkowe. Wcześnieśnik (30 tydzień ciąży). Zaburzenia oddechowe i zgon 4 dni po urodzeniu na skutek ostrego porażenia oddychania. Przyp. 222/74.



Fig. 2

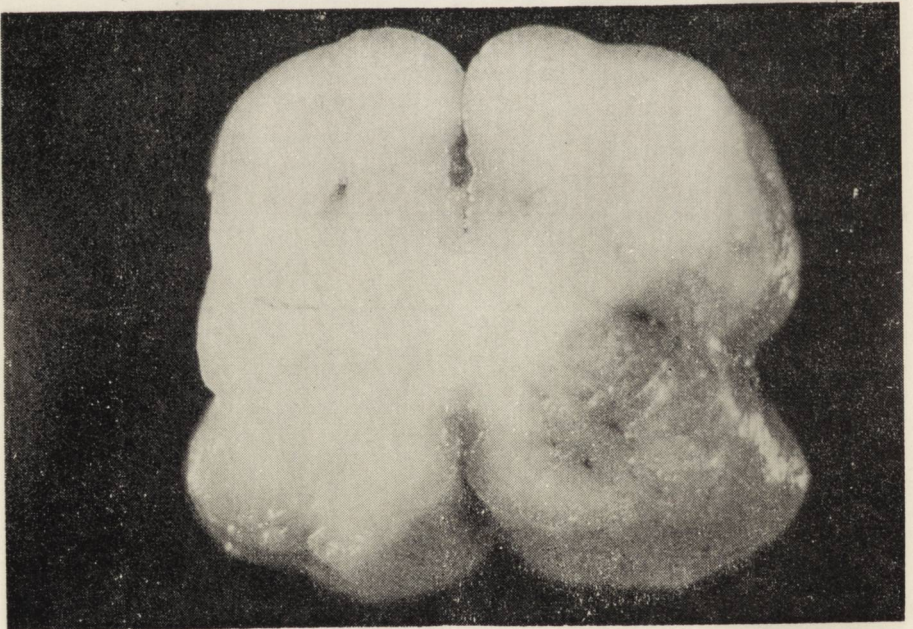


Fig. 3

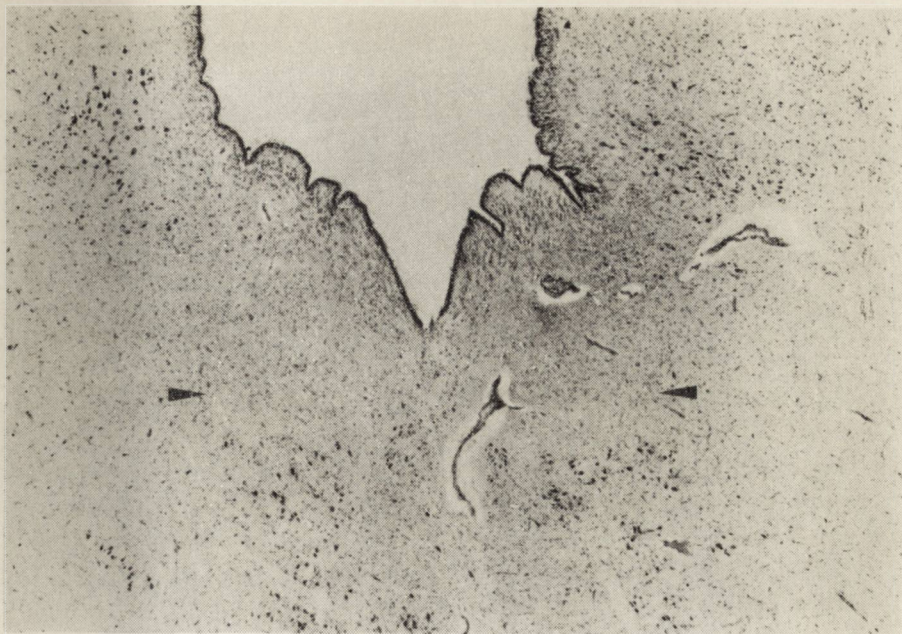


Fig. 4. Birth 14 days post-term. Severe asphyxia *intra partum* followed by *cardiac arrest*. After resuscitation permanent coma and flaccidity over 24 hours. Disappearance and pallor of the hypoglossus motoneurons (arrows). Case 112/74. Nissl $\times 40$.

Ryc. 4. Poród opóźniony 14 dni. Ciężka asfiksja porodowa z *cardiac arrest*. Po reanimacji śpiączka i wiotkość trwająca ponad 24 godziny. Opustoszenie i zblednięcie neuronów jądra nerwu podjęzykowego (strzałki). Przyp. 112/74. Nissl. Pow. $40 \times$.

Fig. 2. Massive intracerebellar hemorrhage with compression of the lower brain stem. Sepsis, coagulopathy and hyperbilirubinemia in a mature neonate. Case 75/74.

Ryc. 2. Rozległy krwotok śródmózdkowy z uciskiem dolnej części pnia mózgu. Posocznica, koagulopatia i hyperbilirubinemia u donoszonego noworodka. Przyp. 75/74.

Fig. 3. Unilateral fresh necrosis of the ventral medulla oblongata. 36th week of gestation; atresia of the bile duct. Extensor spasms, respiratory insufficiency, sepsis. Case 65/74.

Ryc. 3. Jednostronne, świeże ognisko martwicy brzusznej części rdzenia przedłużonego. 36 tydzień ciąży; niedrożność przewodu żółciowego, przykurcz prostowników, niewydolność oddechowa, posocznica. Przyp. 65/74.



Fig. 5. Mature infant with unexpected cardiac arrest 9 hours after birth. After resuscitation survival in deep coma, loss of all brain stem and spinal reflexes, resp. paralysis. Brain swelling (465 g). Symmetrical tegmental necroses in all levels of the brain stem. Case 220/74.

Ryc. 5. Donoszone dziecko z nieoczekiwanym cardiac arrest w 9 godzin po urodzeniu. Po reanimacji głęboka śpiączka, zniesienie wszystkich odruchów z pnia mózgu i rdzenia, porażenie oddechu. Obrzmienie mózgu (waga 465 g). Symetryczne ogniska martwicy w nakrywce na wszystkich poziomach pnia mózgu. Przyp. 229/74.



Fig. 6. Mature neonate. Sudden cardiac arrest 2 hours after „normal birth” Survival 5 days. Complete loss of cerebral and spinal functions with respiratory paralysis. Tegmental necrosis in the medulla oblongata with marginal gliosis and proliferation of vessels. Subtotal neuronal loss of the brain stem nuclei and inferior olives. Case 218/74. Nissl, $\times 10$.

Ryc. 6. Donoszone noworodek. Nagły cardiac arrest w 2 godziny po „normalnym porodzie”. Przeżycie 5 dni. Całkowita utrata czynności mózgowych i rdzeniowych z porażeniem oddychania. Ognisko martwicy w nakrywce rdzenia przedłużonego z glejową brzezną i rozplemem naczyń. Niepełny zanik neuronów jąder pnia mózgu i oliw dolnych. Przyp. 218/74. Nissl, pow. $10 \times$.

disturbances. Only the massive bulbo-cerebellar hemorrhage implicates an acute lethal outcome.

Most important are the anoxic-vasal lesions of the brain stem in the perinatal period. For evaluation of discrete neuronal changes the examination of celloidin-embedded material is indispensable. Some brain stem nuclei demonstrate a particular vulnerability in perinatal asphyxia; these are, first the nuclei of the dorsal columns, trigeminal and vestibular nerves and the inferior colliculi, in a second rank also the motor nuclei. In 8 infants severe asphyxia and/or total oxygen lack due to cardiac arrest produced extensive symmetrical necroses in the tegmental structures of the brain stem. The destruction of the reticular formation with respiratory paralysis and irreversible coma represents the extreme lesion of an phylogenetically old structure. Probably, milder injury to the reticular formation leads to serious respiratory disorders without distinct structural lesions.

H. Schneider, R. Dicht, H. Schachinger

NEUROPATOLOGIA ZABURZEŃ ODDECHOWYCH U NIEDONOSZONYCH I DONOSZONYCH NOWORODKÓW

Streszczenie

Przeprowadzono badanie neuropatologiczne mózgow 53 dzieci zmarłych w okresie 6—10 dni po urodzeniu, ze szczególnym zwróceniem uwagi na zmiany w obrębie tylnej jamy czaszkowej. Zdaniem autorów uraz porodowy nie ma istotnego udziału w patogenezie śmierci okołoporodowej. Tylko u 6 noworodków nie stwierdzono uszkodzenia mózgu. Najczęściej znajdowano krwotoki podpajęczynówkowe, śródmiaższowe i dokomorowe, nie stwierdzono jednak korelacji pomiędzy lokalizacją uszkodzeń i zaburzeniami oddechowymi. Najbardziej istotne znaczenie w okresie okołoporodowym mają anoksyjno-naczyniowe uszkodzenia pnia mózgu, przy czym niektóre jego jądra wykazują w tym okresie szczególną wrażliwość. Należą do nich przede wszystkim jądra kolumn grzbietowych, jądra nerwu trójdzielnego i przedśionkowego oraz wzgórków czworaczych dolnych, w następnej kolejności jądra ruchowe. U 8 dzieci z cardiac arrest obecne były rozległe, symetryczne martwice w nakrywce pnia. Destrukcja istoty siatkowatej z porażeniem oddechu i nieodwracalną śpiączką reprezentuje skrajny typ uszkodzenia tej struktury. Prawdopodobnie łagodne uszkodzenie substancji siatkowatej może prowadzić do poważnych zaburzeń oddechowych przy braku uchwytanych zmian strukturalnych.

X. Шнейдер, Р. Дихт, X. Шахингер

НЕЙРОПАТОЛОГИЯ НАРУШЕНИЙ ДЫХАНИЯ У НЕДОНОШЕННЫХ И ДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ

Резюме

Были проведены neuropatologicheckие исследования мозга 53 детей, умерших в период 6—10 дней после рождения. Особое внимание уделялось изменениям в области черепной полости. По мнению авторов родовая травма не играет существенной роли в патогенезе родовой смерти. Только у 6 детей не были об-

наружены повреждения мозга. Чаще всего выступали субарахноидальные, внутритканевые и внутримозговые кровоизлияния, однако корреляции между локализацией повреждения и нарушением дыхания не было установлено. Наиболее существенное значение в период родов имеют аноксийно-сосудистые повреждения ствола мозга, причем, некоторые его ядра проявляют в этот период особенную чувствительность. К таким принадлежат прежде всего ядра дозальных стволов, ядра тройничного и вестибулярного нервов, а также нижних бугров четверохолмия, затем следуют двигательные ядра. У 8 детей с остановкой сердца были обнаружены обширные, симметрично расположенные некрозы в покрове ствола. Крайней формой повреждения этой структуры являются разрушение ретикулярной формации, паралич дыхания и необратимая спячка. По-видимому, умеренное повреждение ретикулярной формации может привести к серьезным нарушениям дыхания при отсутствии заметных структурных изменений.

REFERENCES

1. Buckinham, S., Sommers, S.C., Sherwin, R. P.: Lesions of the dorsal vagal nucleus in the respiratory distress syndrome. *Amer. J. Clin. Path.* 1967, 48, 209—276.
2. Chem. H.: Kernicterus in the Chinese newborn. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1964, 23, 527—549.
3. Essbach, H.: *Paidopathologie*. VEB Georg Thieme, Leipzig, 1961.
4. Gilles, F. H.: Hypotensive brain stem necrosis. *Arch. Path.* 1969, 88, 32—41.
5. Griffiths, A. D., Laurence K. M.: The effect of hypoxia and hypoglycemia on the brain of the newborn human infant. *Develop. Med. Child. Neurol.* 1974, 16, 308—319.
6. Grunnet, M. L., Curless, R. G., Bray, P. F., Jung, A. L.: Brain changes in newborns from an intensive care unit. *Develop. Med. Child. Neurol.* 1974, 16, 320—328.
7. Jilek, L., Fischer, J., Krulich, L., Trojan, S.: The reaction of the brain stem stagnant hypoxia and anoxia during ontogeny. *Progr. Brain. Res.* 1964, 9, 113—131.
8. Joppich, G., Schulte, F. J.: *Neurologie des Neugeborenen*. Springer. Berlin-Heidelberg-New York, 1968.
9. Myers, R.E.: Two patterns of perinatal brain damage and their conditions and occurrence. *Amer. J. Obstet. Gynecol.* 1972, 112, 246—276.
10. Norman, M. G.: Antenatal neuronal loss and gliosis of the reticular formation, thalamus and hypothalamus. *Neurol. (Chic.)* 1972, 22, 910—916.
11. Norman M. G.: Unilateral encephalomalacia in cranial nerve nuclei in neonates: report of two cases. *Neurology*, 1974, 424—427.
12. Ranck, J. B., Windle, W. F.: Brain damage in the monkey *Macaca mulatta* by asphyxia neonatorum. *Exper. Neurol.* 1959, 1, 130—154.
13. Schneider, H., Dicht R.: Symmetrische tegmentale Nekrosen des Hirnstammes nach perinataler Asphyxie und temporären Kreislaufstillstand. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 1974, 58, 575.

Author's address: H. Schneider, Prof. Dr. med. Institut für Neuropathologie, Klinikum Steglitz, 1000 Berlin—West 45, Hindenburgdamm 30

CH. G. LIPIŃSKI, W. KRATZER

DIE MYOKLONISCHE ENCEPHALOPATHIE IM KINDESALTER. DIAGNOSTISCHE UND THERAPEUTISCHE PROBLEME

Universitäts-Kinderklinik Heidelberg
Direktor: Prof. Dr. H. Bickel

Ebenso wie der cerebrale Krampfanfall stellen Myoklonien nur ein Symptom dar. Als Ursachen findet der Pädiater häufig Stoffwechselerkrankungen. In seltenen Fällen gibt das Symptom Myoklonien den Hinweis für einen extracraniell gelegenen Tumor. Eine Mitreaktion des Nervensystems bei Neoplasmen, die ausserhalb von Cerebrum, Rückenmark und peripheren Nerven wachsen, ist im Erwachsenenalter als sogenanntes „Paraneoplastisches Syndrom“ wohl bekannt. Im Kindesalter ist es eine Seltenheit. Es lassen sich folgende Formen am ZNS unterscheiden: Encephalopathien, Myelopathien, Neuropathien und als Übergangsform Myopathien als Ausdruck neuromuskulärer Störungen (Brain, Adams; 1965; Mumenthaler, Baumberger, 1971; Roth, 1973; Thomas et al., 1972).

Es soll nun über einen Fall berichtet werden, der in die Reihe der paraneoplastischen Syndrome des ZNS eingereiht werden kann.

Fallbeschreibung: S., M., geb. 13.11.71. Die Patientin entstammt einer gesunden Familie und entwickelte sich geistig und motorisch normal. Mit 17 Monaten, 2 Wochen nach einer Erkältung, fiel den Eltern erstmals ein eigenartiges Kopfwackeln, wenig später ein Zittern der Augen auf. Da die Eltern dem Hausarzt berichteten, das Kind sei nervös und zornig, wurden die Symptome als Trotzphase gedeutet und mit einem Phenothiazin-Präparat behandelt, allerdings ohne Erfolg. Sechs Tage später traten grobe motorische Zeichen hinzu: es kam zu Gangabweichung und Fallneigung nach links. Eine Woche später wurde das Kind wegen Verdacht auf Encephalitis in einer auswärtigen Klinik aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt bestanden auffällige Zuckungen der Gesichtsmuskulatur, Blinzeln und Grimassieren. Häufiges rasches Augenrollen wurde als Nystagmus gedeutet. Jetzt traten auch Myoklonien der Extremitätenmuskulatur auf, die im Schlaf nicht sistieren. Das Kind konnte nicht mehr frei laufen. Da die erhobenen Befunde nicht zur Klärung der Diagnose beitrugen, erfolgte Verlegung in die Univ.-Kinderklinik Heidelberg.

Das Kind war inzwischen 1 1/2 Jahre alt. Bei der Aufnahme standen Opsoklo-

nien der Augen im Vordergrund. Das sind unregelmässige, sakkadierende, konjugierte Augenbewegungen, die teilweise von Lidkloni begleitet sind. Das Kind bedeckte mit den Handrücken häufig die Augen, als wollte es nichts sehen. Am gesamten Körper waren in ihrer Intensität stark wechselnde Myoklonien zu sehen. Das Kind konnte deshalb weder sitzen noch stehen. Der übrige neurologische Status bot keine Besonderheiten.

Bei der differentialdiagnostischen Überlegungen konnten folgende Erkrankungen, die mit Ataxie und Myoklonien einhergehen, ausgeschlossen werden: Meningo-encephalitis, postinfektiöse Ataxie, Intoxikationen, intracranielle Raumforderung, Epilepsie, Stoffwechselstörung oder degenerativer Prozess. Bei all diesen Diagnosen war das Symptom der Opsoklonien nicht einzureihen. Aufgrund der Anamnese, des klinischen Verlaufes und des charakteristischen Bildes wurde die Diagnose gestellt: infantile myoklonische Encephalopathie (IME), auch Dancing-eyes, Dancing-feet-Syndrom genannt (Dyken, Kolar, 1968). Eine Synopsis der Symptome gibt Tabelle 1. Auf das letztgenannte Symptom, nämlich Neuroblastom, soll jetzt

Tabelle 1. Symptomatik der IME

1. Erkrankungsalter 6.-24. Monat	6. Keine Entzündungszeichen
2. Myoklonien	7. Stationärer Verlauf
3. Opsoklonien	8. Besserung auf ACTH
4. Ataxie	9. Mentale Residualschäden
5. Irritabilität	10. Nachweis eines Neuroblastom

eingegangen werden. Seit der Erstbeschreibung des Syndroms durch Kinsbourne (1962) sind insgesamt 65 Patienten mit IME bekannt geworden. Davon 38 Fälle ohne und 27 mit einem Neuroblastom. Aus diesem Grunde wurde bei der Patientin gezielt nach einem Tumor gesucht. Die Abdomenübersichtsaufnahme sowie i.v. — Pyelogramm erbrachten normale Befunde. Aus der Thoraxübersichtsaufnahme zeigte sich erst bei genauer Inspektion eine zarte Verschattung im re. medialen Oberfeld (Abb. 1). Durch Tomo- und Cavographie bestätigte sich ein kleiner Tumor. Die mehrmaligen Urinuntersuchungen auf Katecholamine ergaben nur einmal einen geringfügig erhöhten Dopaminwert. Homovanillin- und Vanillinmandelsäure waren stets normal. Unter der Annahme eines Neuroblastom erfolgte die Operation. Dabei fand sich ein Ganglioneuroblastom im oberen Mediastinum rechts von Walnussgrösse. Postoperativ erfolgte Gabe von Cytostatica (Endoxan und Vincristin) und Behandlung mit ultraharten Röntgenstrahlen (3000 rad). Da das Kind auf der Station varicelleninkubiert wurde, konnte zunächst keine Corticoid-Behandlung eingeleitet werden. Während der folgenden 6 Wochen bestanden Myoklonien und Opsoklonien unverändert fort. Jetzt wurde die Behandlung mit ACTH (50 E Synacthen-Depot/Tag) begonnen. Schon 4 Tage später machte sich eine dramatische Besserung bemerkbar, 7 Tage später verschwanden die Opso- und Myoklonien, nach einer weiteren Woche konnte das Kind wieder, wenn auch unsicher, laufen.

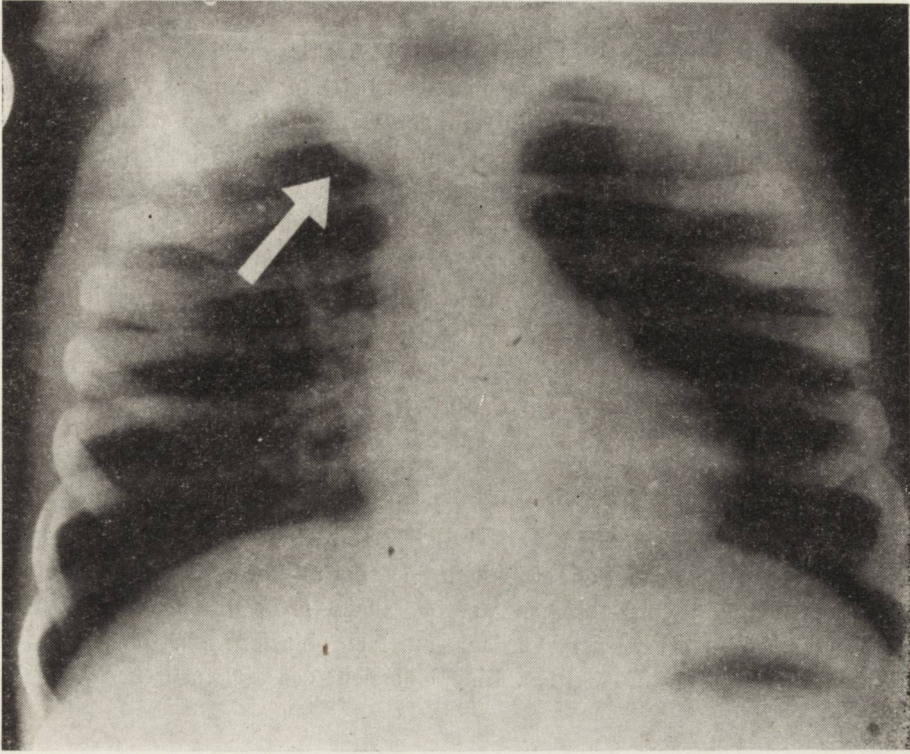


Abb. 1. Zarte Verschattung im re. medialen Oberfeld.

Ryc. 1. Delikatne zacinienie w prawym górnym polu przyśrodkowo.

2 1/2 Wochen nach Beginn dieser Behandlung konnte die ACTH-Dosis reduziert werden. Leider erkrankte die kleine Patientin kurz vor dem vollständigen Absetzen von ACTH an einer trotz intensiver antibiotischer Therapie nicht beherrschbaren Pneumonie und verstarb im Rechterzversagen.

Die Autopsie bestätigte die Diagnose: „lappenfüllende Pneumonie, kein Anhalt für Tumorrecidiv“. Die Histologie des Gehirns zeigte folgenden Befund: „Schichtungsregelmässigkeiten und disseminierte Nervenzellausfälle in der Grosshirnrinde. Striatum, Pallidum, Nucleus ruber, Substantia nigra und Nucleus dentatus ohne pathologisch verwertbaren Befund. Kleinhirnrinde regelrecht. Somit kein morphologisches Substrat der myoklonischen Encephalopathie.“

DISKUSSION

Auffällig ist das bei knapp der Hälfte der Patienten gemeinsame Auftreten von IME und Neuroblastom. Es stellt sich die Frage, warum nur bei diesen Fällen ein Tumor gefunden wird. Eine mögliche Erklärung dafür geben die Untersuchungen von Bill (1968), nämlich, dass Neuroblastome eine hohe Rate an Spontanregressio-

nen zeigen (Cushing, Wolbach, 1927). Unter 176 Fällen von Tumorregression beschreiben Everson und Cole (1966) 29 Fälle mit Neuroblastom. Beckwith und Perrin (1963) wiesen bereits auf die Tatsache hin, dass bei Säuglingen bis zum 3. Monat 40mal häufiger Neuroblastome *in situ* gefunden werden, als gemäss klinischer Statistik erwartet, d.h. bei mindestens einem von 200 Säuglingen. Die Vermutung liegt nahe, dass die meisten dieser Tumoren sich spontan zurückbilden und nie klinische Symptome hervorrufen. Vielleicht gilt auch dies für die Fälle von IME ohne Neuroblastom.

Bei der Neuroblastom-Suche ist die biochemische Diagnostik unerlässlich. Doch die biochemischen Ergebnisse können im Stich lassen. Die erhöhte Ausscheidung vom Homovanillin- und Vanillinmandelsäure kann intermittierend auftreten und bei einmaliger Untersuchung fehlen (Voorhess, 1971). Auch Dopamin kann nur geringfügig erhöht sein, wie es unser Fall zeigt. Noch grösser werden die Schwierigkeiten, wenn die Katecholamine erhöht sind und röntgenologisch kein Tumor gefunden wird. Hier kann eine Katheterisierung der *Vena cava* mit fraktionierter Blutentnahme zur Katecholaminbestimmung weiterhelfen (Larbre et al., 1972). Doch sollte davor stets eine Sonographie des Thorax und des Abdomens als harmloseste Untersuchung vorgenommen werden. Einen grösseren Eingriff stellt die Aortographie dar. Wie bei jedem Verdacht auf Neuroblastom muss eine Knochenmarkpunktion durchgeführt werden. Eine Übersicht des diagnostischen Vorgehen gibt Tabelle 2.

Tabelle 2. Diagnostik bei Verdacht auf Neuroblastom

- A. Basisuntersuchungen
 - Rö-Thorax incl. Tomographie evtl. Ösophaguspassage, Cavographie
 - Rö-Abdomen-Leeraufnahme, i.v. Pyelographie
 - Urin: VMS, HVS, Dopamin Knochenmarkpunktion
- B. bei negativem Befund Kontrolle 1-2Mo.
- C. bei ERHÖHTER Katecholaminausscheidung und NEGATIVEM Röntgenbefund
 - Sonographie
 - Aortographie
 - Cava-Katheter zur fraktionierten Best.
 - von Nor-Adrenalin-Plasmaspiegel

Da die IME im Kindesalter auftritt, kann die Therapie des begleitenden Neuroblastoms modifiziert werden. Unter einem Alter von 12 Monaten und bei abgekapseltem Tumor erfolgt nur Operation und Cytostatica-Gabe (Endoxan, Vincristin im Wechsel). Bei infiltrierenden und metastasierenden Tumoren sowie jenseits des 1. Lebensjahres gliedert sich die Behandlung in: Operation, Cytostatica-Gabe und Bestrahlung. Die IME kann mit ACTH (40—80 E/Tag) oder Dexamethason 0,3 mg/kg behandelt werden (Gross-Selbeck, Goll, 1972). Bei Besserung der klinischen Symptomatik sollte die Dosierung langsam reduziert werden. Recidive sprechen gut auf erneute ACTH- oder Steroid-Gaben an (Tabelle 3).

Tabelle 3. Schematischer Therapieplan der IME.

Therapie der IME

OHNE Neuroblastom

MIT Neuroblastom

Operation

Radiatio

Cytostatica

ACTH 40-80 E/die

ACTH 40-80 E/die

Dexamethason 0.3—1 mg/kg

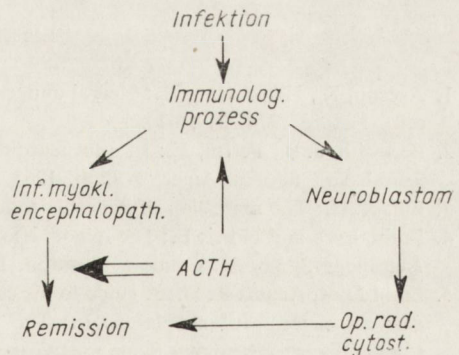
Dexamethason 0.3—1 mg/kg

Die Pathogenese der IME ist unbekannt. Entsprechend der klinischen Symptomatik können sich die ursächlichen Alterationen im Guillain-Mollaret'schen Dreieck, d.h. im rubro-dentato-olivären Bereich abspielen (Ellenberger, Netzky, 1970). Da sich bei unserem Fall keine morphologischen Veränderungen zeigten, kann angenommen werden, dass sich die pathogenetisch wichtigen Vorgänge auf biochemischer Ebene vollziehen. Es stellt sich die Frage, wie weit das Neuroblastom für das Auftreten von Myoklonien und Opsoklonien verantwortlich ist. So könnte der Tumor für die Aktivität eines myoklonieninduzierenden Systems verantwortlich sein. Interessant sind immunologische Überlegungen. Es ist denkbar, dass organspezifische Antikörper gegen Hirnsubstanz und Neuroblastomgewebe beteiligt sind (Hellström et al., 1968). So fanden z.B. Akesson und Hershman (1974) bei der Maus identische Antigene in differenzierten Neuroblastomzellen und Hirngewebe. Toh und Cauchi (1974) berichten über ein im Gehirn und Tumor sowie ein im Gehirn und Thymus gemeinsam vorkommendes Antigen.

Möglicherweise sind virale Infekte Wegbereiter. Es ist auffällig, bei den meisten beschriebenen IME-Verläufen in der Anamnese und bei Recidiven fieberhafte Infekte zu finden. Vielleicht verändert das Neuroblastom die Immunabwehr. Zur Sicherung der genannten Modelle müssen weitere Immunfluoreszenz-Untersuchungen abgewartet werden (Abb. 2).

Abb. 2. Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen bei IME und Neuroblastom.

Ryc. 2. Schemat możliwych interakcji w przebiegu dziecięcej padaczki mioklonicznej i neuroblastoma.



Insgesamt ist das Vorkommen einer IME bei der grossen Zahl von Neuroblastomen, nämlich 10—15% der kindlichen Malignome, selten. Jedoch ist wichtig, in jeder IME ein Alarmsignal zu sehen, welches zu intensiver Suche nach einem Neuroblastom zwingt.

Ch. Lipiński, W. Kratzer

DZIECIĘCA ENCEFALOPATIA MIOKLONICZNA. ZAGADNIENIA DIAGNOSTYCZNE
I LECZNICZE

Streszczenie

Obraz chorobowy dziecięcej encefalopatii mioklonicznej nie jest dobrze znany, a mioklonie oceniane są błędnie. Opóźnia to ustalenie rozpoznania i podjęcie leczenia. Objawy radiologiczne neuroblastoma mogą być dyskretne i przeoczone, zwłaszcza wtedy gdy rzutują na środkowy cień w obrębie klatki piersiowej. Zwiększone wydalenie katecholamin z moczem może występować okresowo i ograniczać się tylko do dopaminy.

W oparciu o własną obserwację omówiono problem trudności diagnostycznych i leczniczych w tym schorzeniu.

X. Липиньски, В. Кратцер

ДЕТСКАЯ МИОКЛОНИЧЕСКАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ
И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВОПРОСЫ

Резюме

Картина болезни детской миоклонической энцефалопатии изучена недостаточно, а миоклония оценивается ошибочно. Это задерживает установление диагноза и выбора лечения.

Радиологические изменения могут быть нечеткими и оставаться незамеченными, особенно когда они отражаются на средней тени грудной клетки. Увеличенное удаление катехоламинов с мочой может выступать периодически и ограничиваться только допамином. Основываясь на собственных наблюдениях авторы обсуждают проблемы диагностических и терапевтических трудностей при этом заболевании.

LITERATUR

1. Akesson, R., Herschman, H.: Neural antigens of morphologically differentiated neuroblastoma cells. *Nature* 1974, 249, 620.
2. Beckwith, J. B., Perrin, E.: In situ neuroblastomas: a contribution to the history natural of neural crest tumors. *Amer. J. Path.* 1963, 43, 1089.
3. Bill, A. H.: The regression of neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* 1968, 3, 103.
4. Brain, Lord and Norris F.: The remote effects of cancer on the nervous system. *Contemporary Neurology Symposia*. Grune a. Stratton, London 1965.
5. Brain Lord, Adams R. D.: A guide to the classification and investigation of neurological disorders associated with neoplasms. In: *The remote effects of cancer on the nervous system*. *Contemporary Neurology Symposia*. Grune a. Stratton, London 1965.
6. Cushing, H., Wolbach, S. B.: The transformation of a malignant paravertebral sympathicoblastoma into a benign ganglioneuroma. *Amer. J. Pathol.* 1927, 3, 203.
7. Dyken, P., Kolar, O.: Dancing eyes, dancing feet: infantile polymyoclonia. *Brain*, 1968, 91, 305.
8. Ellenberger, C., Netzyk, M. G.: Anatomic basis and diagnostic value of opsoclonus. *Arch. Opht.* 1970, 83, 301.

9. Everson, T. C., Cole, W. H.: Spontaneous regression of cancer. W. B. Saunders Co., Philadelphia 1966.
10. Gross-Selbeck, G., Goll, U.: Myoclonic encephalopathy. *Klin. Päd.* 1972, 184, 383.
11. Hellström, J.E., Helström, K. E., Pierce, G. E., Bell, A. E.: Demonstration of cell-bound and humoral immunity against neuroblastoma cells. *Proc. nat. Acad. Sci. Wash.* 1968, 60, 1231.
12. Kinsbourne, M.: Myoclonic encephalopathy of infants. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1962, 25, 271.
13. Larbre, F., Bethenod, M., Guibaud, P., Mamelle, J. C., Genoud, J.: Syndrome oculo-cerebello-myoclonique et neuroblastome. *Arch. Franc. Ped.* 1972, 29, 411.
14. Mumenthaler, M., Baumberger, K.: Neurologische Syndrome als Fernwirkung maligner Tumoren. *Schweiz. med. Wschr.* 1971, 101, 452.
15. Roth, J.: Die paraneoplastischen Syndrome. *Hippokrates.* 1973, 44, 18.
16. Thomas, C., Zengerling, W., Noetzel, H.: Neurologische Formen des paraneoplastischen Syndroms. Schattauer, Stuttgart, 1972.
17. Toh, B. H., Cauchi, M. N.: Brain-associated tumor antigens demonstrated by immunofluorescence. *Nature*, 1974, 250, 597.
18. Voorhess, M. L.: Neuroblastoma with normal urinary catecholamine. *J. Pediat.* 1971, 78, 680.

Anschrift d. Verfasser: Universitäts-Kinderklinik, 6900 Heidelberg 1, Hofmeisterweg 1—9.

M. SIMÁNYI

ZENTRALE UND BASALE LÄSIONEN NACH AKUTEN
SCHÄDELHIRNTRAUMENRehabilitationszentrum Meidling der Allgemeinen Unfallversicherungsanstalt Wien
Arztlicher Leiter: Prim. Dr. P. Mifka

Mit morphologischen Untersuchungen an Gehirnen nach letal verlaufenen Hirnverletzungen wurden unter Leitung von Prof. Dr. F. Seitelberger im Forschungslabor des neurotraumatologischen Rehabilitationszentrums Meidling 1968 begonnen. Das Untersuchungsgut stammt aus dem Arbeitsunfallkrankenhaus Wien XII. Ausgewertet wurden 82 Fälle (65 Männer und 17 Frauen) im Alter von 7 bis zu 84 Jahren. Die Überlebenszeit wurde mit maximal 4 Wochen begrenzt.

OBDUKTIONSGUT

Die Tabellen 1, 2 und 3 geben eine Aufschlüsselung unserer 82 Fälle nach Unfallhergang, Art der Verletzungen und Bewusstseinslage zum Zeitpunkt der Aufnahme in das Krankenhaus sowie der Überlebenszeit.

Tabelle 1. Aufschlüsselung des Obduktionsgutes nach Unfallhergang

Tabela 1. Zestawienie materiału wg przebiegu wypadku

Unfallhergang Przebieg wypadku	Alter der Patienten Wiek pacjentów			
	-20	-40	-60	über 60 Jahre ponad 60 lat
Fussgänger (von Fahrzeugen niedergestossen) Piesi (uderzeni przez pojazdy)	4	2	2	22
Mopedfahrer Motocykliści	2	8	2	3
PKW-Insassen, bzw. -Lenker Pasażerowie wzgl. kierowcy samochodów	3	4	6	—
Sturz (Höhen von 1 Meter bis zu 2 Stockwerken) Upadek (z wysokości od 1 m do 2 pięter)	2	9	6	2
Diverse (Suicide, Kranverletzungen etc.)	—	2	—	3
Rózne (samobójstwa, zranienia przez dźwig itp.)				
Gesamtzahl Ogółem	11	25	16	30

Tabelle 2. Aufschlüsselung der Fälle nach Art der Verletzung

Tabela 2. Zestawienie przypadków wg rodzaju obrażenia ciała

Art der Verletzungen Rodzaj obrażeń	Anzahl Liczba
Contusio cerebri, keine weiteren Verletzungen	10
Stłuczenie mózgu, bez innych obrażeń	10
Mehrfachverletzungen (Knochenbrüche an den Extremitäten, Thoraxverletzungen etc.)	50
Mnogie obrażenia (złamania kości kończyn, obrażenia klatki piersiowej itp.)	50
Schädelfrakturen	69
davon röntgenologisch verifiziert (Impressionsbrüche 6)	52
nur klinisch anzunehmender Schädelbasisbruch (Liquorrhoe, otogene Hämorrhagien)	17
Złamania kości czaszki	69
potwierdzone radiologicznie (wrażenie złamania 6)	52
klinicznie narastające objawy złamania podstawy czaszki (płynotok, krwotoki z uszu)	17
Epiduralhämatome	2
Krwiak nadwardówkowy	2
Subduralhämatome	9
Krwiak podwardówkowy	9
Epi- und Subduralhämatome	2
Krwiak nad- i podwardówkowy	2

Es wurden 15 Schädeltrepanationen durchgeführt, davon waren 3 Probetrepanationen.
Wykonano 15 trepanacji czaszki, z tego 3 dla kontroli jamy czaszkowej.

Aus dieser Zusammenstellung geht hervor, dass der Anteil an über 60jährigen hoch ist, die als Fussgänger von Fahrzeugen niedergestossen wurden, weiters auch der 20- bis 40jährigen, welche vorwiegend bei Mopedunfällen und durch Stürze von Gerüsten etc. Verletzungen erlitten hatten. Die Überlebenszeit betrug in 60% (n = 49) bis zu 2 Tagen, in 30% (n = 25) bis zu 2 Wochen, knapp 9% (n = 7) überlebten bis zu 3 Wochen, und nur in einem Fall wurde die Verletzung 4 Wochen überlebt.

NEUROPATHOLOGISCHE BEFUNDE

Die makroskopischen Befunde wurden in primär- und sekundärtraumatische unterteilt. Nur in wenigen Fällen konnte die Unterscheidung erst histologisch getroffen werden.

Tabelle 3. Korrelation von Bewusstseinslage zum Zeitpunkt der Aufnahme im Krankenhaus und Überlebenszeit

Tabela 3. Korelacja pomiędzy stanem świadomości w chwili przyjęcia do szpitala a czasem przeżycia

Bewusstseinslage Stan świadomości	Überlebenszeit			Czas przeżycia		
	—2 Std. godz.	2—12 Std. godz.	12 Std. —2 Tage 12 godz. —2 dni	2—14 Tage Dni	14—21 Tage Dni	21—28 Tage Dni
Koma	9	13	15	9	5	1
Śpiączka						
Sopor	—	2	2	6	—	—
Głęboki sen						
Somnolenz	1	3	—	10	2	—
Senność						
Klares Bewusstsein	—	1	—	—	—	—
Zachowana świadomość						
Koma nach luzidem Intervall	—	—	1	—	—	—
Śpiączka po okresie przejaśnienia świadomości						
Exitus während des Transportes Zgon podczas transportu	2	—	—	—	—	—
Gesamtzahl Ogółem	12	19	18	25	7	1

I. PRIMÄR-TRAUMATISCHE VERÄNDERUNGEN:

1) Oberflächliche Veränderungen:

Epi- und/oder Subduralhämatome	15
Subarachnoidalblutungen	18
Läsionen des Tractus opticus bzw. des Chiasmus	3
Kontusionen der Grosshirnrinde	36
Kontusionen der Kleinhirnrinde	8

2) Zentrale Grosshirnverletzungen:

Balken- und Fornixverletzungen	9
Stammganglienblutungen	5

3) Hirnstammverletzungen

3

II. SEKUNDÄR-TRAUMATISCHE VERÄNDERUNGEN:

Hirnödem	31
basale Druckzeichen bzw. Nekrosen	26
Kernohan's notch	6
Stauungsblutungen im Hirnstamm	36
zirkulatorisch-anoxische Veränderungen	

Auf Kontusionen der Grosshirnhemisphären sowie auf raumfordernde Blutungen soll nicht näher eingegangen werden. Sie wichen weder lokalisatorisch noch bezüglich der Häufigkeit von den in der Literatur angegeben ab; es wurden vor allem die Untersuchungen von Jellinger (1966, 1967) zum Vergleich herangezogen, da es sich um ähnliches Obduktionsgut handelt.

Kleinhirnkontusionen von oft beträchtlicher Ausdehnung wurden an 8 Gehirnen gesehen, das sind 10% der Fälle. Auch Balken- und Fornixrupturen bzw. — blutungen kamen in unserem Obduktionsgut häufig vor, nämlich in 11% der Fälle, Blutungen in den Stammganglien in 5%. Ob letztere primär oder sekundär entstanden waren, konnte nicht immer mit Sicherheit entschieden werden. Hier sind der laterobasale Anteil des Linsenkernes und in zweiter Linie der Thalamus als Prädilektionsstellen zu nennen. An 3 Gehirnen konnten wir Hirnstammverletzungen feststellen, die mit überwiegender Wahrscheinlichkeit primär entstanden sind und nur Stunden überlebt wurden. Wegen der divergenten Meinungen bezüglich der Überlebenszeit nach primären Hirnstammverletzungen soll eine kurze Kasuistik wiedergegeben werden.

4/69, 25 Jahre, Sturz aus dem 2 Stock: Multiple Schädelfrakturen, Schädelwunden, Hirnaustritt frontal; Koma, lichtstarre, mittelweite Pupillen, Reflexlosigkeit an den Extremitäten, echoencephalographisch keine Verschiebung der Mittellinienstrukturen, Spontanatmung. Überlebenszeit 2 Stunden.

Neuropathologischer Befund: Subarachnoidalblutung, rechtsbetontes Hirnödem, ausgedehnte oberflächliche Kontusionen, Zerstörung des ventralen Anteiles des Mittelhirnes, traumatische Eröffnung des III Ventrikels, Einriss der medialen Balkenlamelle im Knie, Abriss der Fornixschenkel, Blutungen im Linsenkern, primäre Blutung im Brückenfuss.

9/69, 7 Jahre, als Fussgänger von PKW niedergestossen worden, minimale Hautverletzungen an der Stirne, sonst keine äusseren Verletzungen, vorübergehend Atemstörung, Beatmung, nach einer Stunde Wiedereinsetzen der Spontanatmung. Nach Angiographie Entleerung eines Subduralhämatoms links parietal. Keine Besserung der Bewusstseinslage, lichtstarre, maximal weite Pupillen, Streckkrämpfe. Überlebenszeit 15 Stunden.

Neuropathologischer Befund: Hochgradige supratentorielle Volumsvermehrung, temporale Druckfurchen, Druckblutung am rechten Gyrus hippocampi, kleine Rindenkontusionen in der 3. Frontalwindung links, kleine Blutungen in Balken und Fornix, Stauungsblutungen im Hirnstamm, primär-traumatische Blutung im Dach der 4. Ventrikels.

1/74, 18 Jahre, PKW-Insasse (hintere Sitze): Keine äusseren Verletzungen, Sopor, bis Koma, Spontanatmung, nach 3 Stunden assistierte Beatmung notwendig, lichtstarre, weite Pupillen, keine Bulbusbewegungen, Reflexlosigkeit an den Extremitäten. Überlebenszeit 15 Stunden.

Neuropathologischer Befund: Volumsvermehrung, zu Gunsten der rechten Seite, temporale Einklemmung mit Drucknekrose rechts, Rindenkontusionen und Blutungen rechts frontoorbital und temporopolar, Stauungsblutungen in den Linsenkernen, im linken Nucleus amygdale und im rechten Ammonshorn, ausgedehnte schichtförmige Blutung im rechten Thalamus, grosse, unregelmässige zentrale Blutung im Pons, primär-traumatische Läsion des Tectum.

Im Rahmen der sekundär-traumatischen Veränderungen steht das generalisierte Hirnödem an erster Stelle. Es war überwiegend schon makroskopisch eindeutig diagnostizierbar. Als Folge der durch das Hirnödem hervorgerufenen intracraniellen Volumsvermehrung waren zumeist ausgeprägte Druckzeichen, gelegentlich auch Blutungen oder Drucknekrosen am Uncus gyri hippocampi sowie sekundäre Schädigungen des Ammonshornes entstanden; vereinzelt kamen auch tentorielle dorsale Druckfurchen am Kleinhirn vor, sogenannte untere Tentoriumhernien. Bei 7 Gehirnen bestanden als Folge einer seitenbetonten Raumforderung am Pons oder am Pes pedunculi der Gegenseite ein Kernochan's notch — eine Nekrose oder Blutung, hervorgerufen durch Druck gegen freien Rand des Tentoriums. Ferner sind die einklemmungsbedingten zirkulatorisch-anoxischen Veränderungen zu nennen, die mit Ödem, Erbleichungsherden, Erweichungen sowie Nekrosen einhergehen. Stauungsblutungen im Hirnstamm mit oft ausgedehnten Zerstörungen des Gewebes wurden an 32 Gehirnen festgestellt, das ist bei 39% der letal verlaufenen Verletzungen.

HISTOLOGISCHE BEFUNDE

An feingeweblichen Veränderungen stellten sich vorwiegend perivaskuläre Blutungs- und Nekroseherde sowie Marknekrosen verschiedener Grösse dar. In einer Vielzahl von Fällen war ein ausgeprägtes Hirnödem zu sehen. Bereits bei Überlebenszeiten von einer Stunde zeigten sich vereinzelt reaktive Veränderungen der Astroglia, weiters ischämische Nervenzellschädigungen und anoxisch bedingte Rindenerbleichungsherde; bei etwas längeren Überlebenszeiten waren diese Veränderungen wesentlich deutlicher ausgeprägt. Weiters war zu beobachten, dass sich Stauungsblutungen im Hirnstamm frühestens nach 12 Stunden, vor allem aber nach 20 bis 48 Stunden, ausgebildet hatten. Bei längerer Überlebenszeit, frühestens nach 48 Stunden, häufiger nach 8 bis 15 Tagen, zeigten sich Veränderungen der Neuroaxone. Es handelt sich hier um diskontinuierliche Auftreibungen von Axonabschnitten und um nachfolgenden scholligen Zerfall. Neuroaxonschollen lagen vereinzelt oder als dichter Saum um Nekrosen der Marklager. Diese Veränderungen entsprechen offenbar den axonalen Reaktionen im Rahmen der Wallerschen Degeneration und sind durch läsionsbedingte Neuritunterbrechungen hervorgerufen. Purkinjzellschädigung oder-verlust sowie akute Körnerschichtnekrosen im Kleinhirn waren nicht selten zu sehen und zeigten keine Abhängigkeit von der Dauer der Überlebenszeit.

DISKUSSION

Ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Befunden zeigt, dass in unserem Obduktionsgut der Anteil an Kleinhirnkontusionen mit 10% aller Fälle und mit 22% bezogen auf jene Gehirne, die makroskopisch kontusionelle Schädigungen erkennen liessen, auffallend hoch ist, zumal der erste Wert auf die Gesamtzahl der obduzierten Gehirne bezogen ist, also auch auf jene Fälle, die ausser einem generalisiertem Hirnödem keinerlei lokale oder sekundäre Veränderungen aufwiesen. Prädilektionsorte der durchwegs bereits makroskopisch erkennbaren Kleinhirnkontusionen waren die hintere Zirkumferenz und die Basis der Kleinhirnhemisphären. Im Schrifttum werden kontusionelle Schädigungen des Kleinhirns auch in grossen Kollektiven in wesentlich geringerer Zahl beschrieben.

Gelegentlich wird die Meinung vertreten, dass traumatische Schädigungen des Hirnstamms innerhalb weniger Minuten, also noch an der Unfallstelle, zum Tode führen. Krauland (1968), Mayer (1967, 1968) und Peters (1966) stimmen darin überein, dass bei Überlebenszeiten von mehreren Tagen ausschliesslich sekundäre Hirnstammläsionen vorliegen. Die längste uns bekannte Überlebenszeit nach primärer Hirnstammverletzung wird von Jellinger (1966) berichtet. Er konnte einen Riss des Velum medullare posterius nach einem Trauma nachweisen, das 185 Tage überlebt wurde. Es bestand vom Unfall an tiefes Koma ohne Tendenz zur Aufhellung der Bewusstseinslage. Einen weiteren Fall mit länger Überlebenszeit in tiefem Koma (68 Tage) beschreibt Wojahn (1963). Bei autoptisch gesicherten primären Hirnstammverletzungen werden in der Literatur sonst durchwegs kurze Überlebenszeiten und keine Besserung der Bewusstseinslage angeführt. Die von uns vorgestellten Fälle mit primären Hirnstammläsionen zeigten ebenfalls keine Aufhellung des Komats, die Überlebenszeiten betragen 2 bis 15 Stunden. Auf Grund der oben ausgeführten Beobachtungen fordern unter anderen Jellinger (1966, 1967), Krauland (1968), Peters (1966) und Mayer (1967), dass die klinische Diagnose „Hirnstammkontusion“ weitgehend vermieden werden sollte. Morphologisch ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen Primär- und Sekundärschäden nicht immer möglich, zumal auch hier mit fliessenden Übergängen zu rechnen ist. Krauland (1968) und Meyer (1967) weisen darauf hin, dass es in der Umgebung von primärtraumatischen Hirnstammläsionen zu zirkulatorischen Störungen kommt, die eine sichere Differenzierung vielfach unmöglich machen. Sekundäre Hirnstammschäden lagen in unserem Obduktionsgut in 39% vor. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von Gerhard und Brölsch (1970) sowie Jellinger (1966, 1967) weitgehend überein, die 43% angeben. Minauf und Schacht (1966) beschreiben sekundäre Hirnstammläsionen nur bei 15,6%, Meyer (1967) bei 60%. Beim Vergleich dieser Zahlen ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Einzugsgebiet für Schwerverletzte oft sehr unterschiedlich ist.

Systematische histologische Untersuchungen von Gehirnen Verletzter, die ein schweres Hirntrauma, vor allem eine traumatische Hirnstammschädigung Jahre

überlebt hatten und aus anderer Ursache verstorben waren, wurden bisher nur selten durchgeführt. Peters (1966) fand in einem Material von 200 Fällen keine Anzeichen für eine erlittene Hirnstammschädigung. Allerdings erfolgten diese Untersuchungen an durchwegs Rehabilitierten, die nach dem Unfall wieder in den Arbeitsprozess eingegliedert werden konnten. Somit ist anzunehmen, dass es sich zumindest überwiegend nicht um Schwerstfälle gehandelt hat. In einem grossen Gesamtmaterial konnte Strich (1961, 1956) in 20 Gehirnen von Verletzten mit monatelangen Überlebenszeiten bei schwerster Bewusstseinsstörung mit der Marchi-Färbung kleinste Läsionen der weissen Substanz des Hirnstammes nachweisen, in Routinefärbungen Gliasterne. Ähnliche Befunde berichtet Oppenheimer (1968). Eine Unterscheidung von Folgen primärer oder sekundärer Gewebläsionen wurde von den oben genannten Autoren nicht diskutiert.

M. Simányi

CENTRALNE I PODSTAWNE USZKODZENIA MÓZGOWIA PO OSTRYCH URAZACH CZASZKOWO-MÓZGOWYCH

Streszczenie

Wyniki badania obejmującego 82 mózgi zmarłych na skutek urazu czaszki wykazują na ogół zgodność z danymi uzyskanymi na większym materiale. Jedynie stłuczenia mózdzku występują w badanym materiale w znacznie większym odsetku. Brak szczegółów dotyczących przebiegu wypadku oraz liczne obrażenia nie pozwalają często na ustalenie mechanizmu działania czynnika uszkadzającego. Pierwotne zranienia pnia mózgu stwierdzono w 3 przypadkach z przeżyciem nie przekraczającym kilku godzin. Spośród wtórnych zmian urazowych 39% stanowiły makroskopowo widoczne uszkodzenia pnia. Rzadko opisywaną zmianą pourazową, obserwowaną w przypadkach z przynajmniej kilkudniowym przeżyciem, są sferoidalne rozdęcia aksonów. Występują one w otoczeniu martwic w istocie białej w obrębie uszkodzonych włókien osiowych jako produkt zwyrodnienia Wallera.

M. Симани

ЦЕНТРАЛЬНОЕ И БАЗАЛЬНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ОСТРЫХ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВЫХ ТРАВМАХ

Резюме

Результаты исследования 82 мозга людей, умерших от черепной травмы, обнаруживают в основном согласованность с результатами, полученными на большем количестве материала. В исследуемом материале лишь ушибы мозжечка встречались в значительно большем проценте случаев. Отсутствие подробностей, касающихся самого несчастного случая, а также многочисленные ушибы редко позволяют установить механизм действия повреждающего фактора. Первичные ранения ствола мозга были обнаружены в трех случаях с переживанием, не превышающим несколько часов. Среди вторичных травматических изменений 39% составляли видимые макроскопически повреждения ствола. Редко описываемым посттравматическим изменением, наблюдаемым в случаях с переживанием по крайней мере в несколько дней, были сфероидальные вздутия аксонов. Выступают они в окружении некрозов в белом веществе в области поврежденных осевых волокон как продукт дегенерации Валлера.

LITERATUR

1. Gerhard, L.; Brölsch, Ch.: Veränderungen am basalen Schläfenlappen und Gyrus hippocampus beim Schädelhirntrauma. *Acta neuropath. (Berl.)*. 1970, 15, 20—33.
2. Jellinger, K.: Zur Pathogenese und klinischen Bedeutung von Hirnstammschäden nach gedeckten Schädel-Hirntrauma. In: *Klinische Erfahrung bei Hirnstammprozessen. Acta 25. Conv. Neuropsychiat. Hung. Budapest* 1966, 303—322.
3. Jellinger, K.: Häufigkeit und Pathogenese zentraler Hirnläsionen nach stumpfer Gewalteinwirkung auf den Schädel. *Wien. Z. Nervenheilk.* 1967, 25, 223—249.
4. Krauland, W.: Morphologische Aspekte der traumatischen Hirnschädigung. *Wien. Med. Wschr.* 1968, 118, 742—746.
5. Mayer, E. Th.: Zentrale Hirnschäden nach Einwirkung stumpfer Gewalt auf den Schädel. Hirnstammläsionen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 1967, 210, 238—262.
6. Minauf, M.; Schacht, L.: Zentrale Schäden nach Einwirkung stumpfer Gewalt auf den Schädel. II. Mitt.: Läsionen im Bereich der Stammganglien. *Arch. Psychiat.* 1966, 208, 162.
7. Oppenheimer, D.R.: Microscopic lesions in the brain following head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1968, 31, 299—306.
8. Strich, S. J.: Diffuse degeneration of cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1959, 19, 143—185.
9. Strich, S. J.: Shearing of nerve fibres as a cause of brain damage due to head injury. *Lancet* 1961, 2, 443—448.

Anschrift der Verfasserin: Dr. Margarete Simányi, Psychiatrisches Krankenhaus, Baumgartnerhöhe 1, A-1145 Wien, Österreich.

M. RADOMSKA

DIE BEDEUTUNG DES SCHÄDELHIRNTRAUMAS FÜR DAS MANIFESTWERDEN DER SOGENANTEN SPONTANEN NERVENSYSTEMERKRANKUNGEN

Neurologische Klinik der Medizinischen Akademie, Łódź, Polen

Leiter: Prof. Dr A. Prusiński

Das kasuistische Schrifttum betreffs des Einflusses von Umweltschädlichkeiten auf die Pathogenese der traditionell als idiopathisch angesehenen Krankheiten ist umfangreich. Als Folge eines erlittenen Schädelhirntraumas wird das Manifestwerden verschiedener neurologischer Erkrankungen beschrieben, nämlich Myopathien (Ambler, 1973; Gajowa, Hulanicka, 1963; Moses, Heler, 1965), neuraler Muskelschwund (Sułat, 1963), Wilsonsche Krankheit (Erbslöh, 1963; Wald, 1962), Syringomyelie (Mielerowicz, 1957), multiple Sklerose (Sułat, 1963) und andere (Brzecki, Pawlak, 1973; Gajowa, Hulanicka, 1963; Sułat, 1963); auch die Kompensation angeborener Missbildungen war erwähnt (Bryc, 1964; Dymecki, Kozłowski, 1960). Das Wesen des mutmasslichen Einflusses von Trauma auf das Auftreten der angeführten Erkrankungen bleibt bisher ungeklärt; es wird vermutet, dass es zu posttraumatischen Veränderungen in der Hypothalamusfunktion sowie der zentralvegetativen oder innersekretorischen Regulation kommt. Das Problem, welcherlei Rolle das Schädelhirntrauma beim Manifestwerden sogenannter idiopathischer Krankheiten spielt, besitzt eine besondere Bedeutung bei der gerichtsärztlichen und Invaliditätsbegutachtung. Der Begutachtungsaspekt — ein sehr wichtiger, unserer Meinung nach, gibt uns Anlass zur Mitteilung eigener Beobachtungen hinsichtlich ursächlicher Zusammenhänge zwischen Schädelhirntrauma und einer besonderen Apoplexieform, bestimmten metabolischen und degenerativen Prozessen in Nervensystem und der multiplen Sklerose.

Im Jahre 1891 bezeichnete Bollinger als *Apoplexia tarda* akute vasogene Störungen in Gehirn, die nach mehrtägigem, symptomlosem Intervall nach einem Schädelhirntrauma auftraten (zit. nach Köbcke 1944). Bei der Diagnosestellung ist die Ausschliessung eines posttraumatischen intrakranialen Hämatoms die *Conditio sine qua non*.

Unsere Beobachtungen betreffen 2 Kranken mit *Apoplexia tarda* nach Bollinger, bei beiden war der klinische Verlauf fast identisch.

Der Kranke M. S., 57 Jahre alt, Tischler von Beruf (Krankengeschichte Nr. 16847), erlitt bei einem Sturz von bedeutender Höhe ein Kopftrauma ohne Bewusstseinsverlust. Zwei Tage später trat plötzlich eine linksseitige Hemiparese auf. Die Karotis-Angiographie zeigte atheromatische Veränderungen der Gehirngefäße ohne Gefäßstammdislokation. Klinische Beobachtung und zusätzliche Untersuchungen gestatten den Ausschluss posttraumatischer Kompressionskomplikationen. Nach konservativer Behandlung verminderte sich die Parese der linken Extremitäten.

Viele Autoren bezweifeln die nosologische Besonderheit der Bollingerschen *Apoplexia tarda*, aber Attinen (1959) wies beim Vergleich von Angaben der Versicherungsanstalten mit eigenen Untersuchungsergebnissen nach, dass apoplektische Insulte bedeutend häufiger bei Personen mit vorangegangenem Schädelhirntrauma auftreten und dass dieser Unterschied statistisch signifikant ist. Der Pathomechanismus der Gefäßveränderungen bei der *Apoplexia tarda* ist nicht völlig abgeklärt. Aus der Sicht allerjüngsten Beobachtungen scheint die posttraumatische Karotis-Thrombose von entscheidender Bedeutung zu sein. Man nimmt an, dass die Beschädigung der Karotis-Intima, also der Ausgangspunkt der Thrombose, öfters infolge scheinbar ganz bedeutungsloser Kopftrauma entstehen kann (Leischner, 1973; Peters, 1973). Die klinischen Symptome von Gehirndurchblutungsstörungen werden wahrscheinlich durch den Bau des Willisschen Gefäßskranzes und die Möglichkeiten eines Kollateralkreislaufes bestimmt (Engelhardt, 1972).

Die nächste, ebenfalls an der Literatur reiche Problem stellt der ursächliche Zusammenhang zwischen Schädelhirntrauma und Manifestwerden von metabolischen und degenerativen Krankheiten des Nervensystems dar. Mehrmals wurde das Auftreten der Wilsonschen Krankheit kurz nach Schädelhirntrauma festgestellt (Erbslöh, 1963, Sulat, 1963). Unsere eigene Beobachtungen betreffen folgenden Fall:

Der Kranke R. D., 28 Jahre alt, Landarbeiter (Krankengeschichte Nr 19366), erlitt ein schweres Schädelhirntrauma mit mehrstündigem Bewusstseinsverlust. Sechs Tage darauf stellte sich ein Steifefühl in den Fingern und eine Behinderung bei präzisen Bewegungen ein und später, in Laufe einiger Monate, eine progrediente Verlangsamung der Bewegungen und Sprache. Nach weiteren 3 Monaten wurde der Kranke erneut auf den Kopf geschlagen; sein Zustand verschlechterte sich zusehends: psychische Störungen traten auf, verallgemeinerte Muskelstarre, Extremitätentremor, Kayser-Fleischer's Ring, wesentliche Kupferstoffwechselstörungen sowie eine Senkung der Zäkuloplasminspiegels im Serum. Kontrastuntersuchungen (Karotis-Angiographie, Ventrikulographie) liessen die Ausschliessung posttraumatischer Kompressionskomplikationen zu und zeigten Merkmale bedeutenden Gehirnschwundes auf.

Einen ähnlichen Fall beobachtete vorhin in unserer Klinik Sulat (1963). Bei unseren 2 weiteren Patienten mit Wilsonschen Krankheit nahmen die Störungen nach einem Schädelhirntrauma erheblich zu (Radomska, 1970). Wie bekannt, beruht die Wilsonsche Krankheit auf genetisch bedingten, metabolischen Störungen, besonders des Kupfermetabolismus. Experimentell wurde der Beweis erbracht,

dass der Kupferstoffwechsel durch die Hypophyse gesteuert wird; bei Tieren kam es nach Hypophysektomie zu Kupferspeicherung in der Leber; dem konnte durch Somatotropinverabreichung vorgebeugt werden (O'Reilly, 1967). In dem von uns geschilderten Fall könnte als pathogenetischer Faktor eine posttraumatische Schädigung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse in Frage kommen.

Als Beispiel für das Manifestwerden einer degenerativen Krankheit — der Syringomyelie nach Schädelhirntrauma kann folgender, von uns beobachteter Fall dienen:

Der Kranke J. P., 36 Jahre alt, einfacher Arbeiter (Krankengeschichte Nr. 22620), erlitt bei einem Verkehrsunfall ein Kopftrauma mit Bewusstseinsverlust und nachfolgender purulenter Meningitis. Nach einigen Monaten trat bei ihm eine Parese der oberen Extremitäten mit Dyssoziationsdysästhesien, progredienten trophischen Haut- und Knochenveränderungen der Hände sowie Interpalmar-muskelschwund auf. Die Röntgenuntersuchung wies ausser Dolichocephalus keine Dysraphiezeichen nach. Vor dem Unfall war der Patient nie ernstlich krank; er diente seinerzeit beim Militär. In der Familie wurden keinerlei neurologische Störungen oder Missbildungen festgestellt.

Die Bedeutung des Schädelhirntrauma für das Manifestwerden der Syringomyelie betonen unter anderen Mielerowicz (1957), Williams (1969), Williams und Turner (1971). Der hydrodynamischen Theorie von Gardnerr (1965) gemäs wird die Syringomyelie durch Liquorkreislaufstörungen infolge Liquorraumsperrung in der hinteren Schädelhöhle verursacht, oft in Koinzidenz mit Missbildungen des Schädel-Wirbel-Grenzgebietes. Nach Williams (1969) führen zur Höhlenbildung Druckoszillationen des zerebro-spinalen Liquors bei zeitweiser Erhöhung des Venendruckes. Letztere kommt durch Kompression der Jugularvenen zustande, was zum Beispiel während Anstrengungen der Fall ist. In Krankekgut unserer Klinik kam die Syringomyelie in 85% der Fälle bei physisch Arbeitenden vor, was sich mit den Beobachtungen von Hertel (1974) deckt. Appleby (1968) berichtet über einen Kranken, bei dem die Syringomyelie infolge Verschlusses der Foramina des IV Ventrikels durch Arachnoidea-Adhäsionen entstanden ist. Ein derartiger Pathomechanismus ist auch bei unserem Kranken recht wahrscheinlich in Hinblick auf das überstandene post-traumatische Meningitis.

Ein stets zur Diskussion stehendes Thema stellt der Einfluss eines Schädelhirntraumas auf einen Schub der multiplen Sklerose dar. Und das wäre der diesbezügliche eigene Fall:

Der 23-jährige Student H. J. erlitt bei einem Autounfall ein Kopftrauma mit mehrstündigem Bewusstseinsverlust, ohne Schädelknochen- und Wirbelsäuleschädigung. Einige Tage lang hatte er Kopfschmerzen und Schwindel, nachher traten progrediente Pyramiden- und Zerebellarsymptome sowie Miktionschwierigkeiten auf. Die neurologische Untersuchung ein Jahr nach dem Unfall erwies horizontalen Nystagmus, skandierende Sprache, Ataxie der oberen Extremitäten, Aufhebung der Bauchdeckenreflexe, spastische Parese der unteren Extremitäten, Sphinkterfunktions-

störungen. Es muss betont werden, dass der Beschädigte 3 Wochen vor dem Unfall, in Rahmen der Bemühungen um eine Kraftfahrergenehmigung neurologisch untersucht worden ist und keinerlei neurologische Abweichungen festgestellt worden sind.

Über ähnliche Fälle des Manifestenwerdens der multiplen Sklerose nach Schädelhirntrauma berichtete aus unserer Klinik Sułat (1963). Die Ätiologie der multiplen Sklerose bleibt weiterhin unklar. In letzter Zeit wird sie als eine Autoaggressionskrankheit betrachtet. Es ist bekannt, dass ein Hirntrauma zum Erscheinen von gegen das Gehirngewebe gerichteten Antikörpern in Blut führen kann (Gannuszkina, 1970; Kuźniecowa et al., 1974). Die Vermutung liegt nahe, dass bei dem geschilderten Kranken eine konstitutionelle Prädisposition vorausgesetzt — das Trauma eine abnorme immunologische Reaktion und diese eine Schädigung des Nervensystems in Form von Demyelinisation hervorgerufen haben.

Die dargestellten Fälle veranlassten uns nachzuprüfen, wie oft gewissen sogenannten idiopathischen Nervensystemerkrankungen Schädelhirntraumata vorangehen. Entsprechende Angaben sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen (Tabelle 1).

Tabelle 1. Die spontanen Nervensystemerkrankungen und die Schädelhirntraumata.

Tabela 1. Samoistne choroby układu nerwowego a urazy czaszkowo-mózgowe

Erkrankung	Zahl der in den Jahren 1963—1973 in der Klinik behandelten Kranken	Zahl der Kranken mit Kopftrauma
Schorzenie	Liczba chorych leczonych w Klinice w latach 1963—1973	Liczba chorych z urazami głowy
Morbus Wilsoni	14	3 (21,4%)
Syringomyelia	76	24 (31,5%)
Myopathiae	42	17 (16,6%)
Sclerosis lateralis amyotrophica	81	15 (18,5%)
Sclerosis multiplex	100*	5 (5,0%)

* Schicksalsmässig ausgewählte Gruppe
Grupa wybrana losowo

Aus der Tabelle erhellt, dass bei den metabolischen und degenerativen Krankheiten des Nervensystems der zeitliche Zusammenhang mit einem Kopftrauma auffallend häufig ist und von 16,6% bis 31,5% beträgt. Am seltensten tritt er bei der multiplen Sklerose auf, bei der ja auch die geringste Wahrscheinlichkeit eines ursächlichen Zusammenhanges gegeben zu sein scheint.

Zum Schluss möchte ich die Grundsätze darlegen, nach denen wir uns in der Klinik bei der Feststellung eines ursächlichen Zusammenhanges zwischen dem Manifestwerden einer sogenannten idiopathischen Erkrankung und einem erlittenen Schädelhirntrauma richten. Einen wahrscheinlich Zusammenhand anerkannten

wir in denjenigen Fällen, in denen eine zeitliche Beziehung zwischen Manifestwerden der Erkrankung und schweren Kopftrauma bestand und in denen ausserdem die Anamnese keinen Anhalt für ein früheres Vorhandensein von Nervensystemstörungen bot. Selbstverständlich, kann in diesen Fällen eine zufällige Koinzidenz niemals mit vollkommener Sicherheit ausgeschlossen werden, aber im Hinblick auf posstraumatische Homeostasestörungen, könnte dem Beschädigten durch eine entschiedene Ablehnung der pathogenetischen Rolle des Traumas Unrecht getan werden. Es scheint, dass die Anerkennung einer teilweisen Invalidität in diesen Fällen das Richtige wäre.

M. Radomska

WPLYW URAZU CZASZKOWO-MÓZGOWEGO NA UJAWNIANIE SIĘ TZW. SAMOISTNYCH CHORÓB UKŁADU NERWOWEGO

Streszczenie

Autorka przedstawia przypadki późnego udaru Bollingera oraz choroby Wilsona, jamistości rdzenia i stwardnienia rozsianego, w których choroba ujawniła się po ciężkim urazie czaszkowo-mózgowym. W pracy podkreślono praktyczne znaczenie, zwłaszcza dla orzecznictwa lekarskiego, problemu związku przyczynowego tzw. chorób samoistnych z urazem czaszkowo-mózgowym.

M. Радомска

ВЛИЯНИЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ТАК НАЗЫВАЕМЫХ ИДИОПАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Резюме

Автор представляет случаи позднего удара Боллингера, болезни Вильсона, синингомиелии и рассеянного склероза, в которых болезнь проявилась после тяжелой черепно-мозговой травмы. В работе подчеркивается практическое значение — особенно для врачебной экспертизы — проблемы причинной связи идиопатических болезней с черепно-мозговыми травмами.

LITERATUR

1. Ambler Z.: Manifestace dystrofické myotonie po úrazu hlavy. Česk. Neurol. 1973, 36, 151—155.
2. Appleby A., Foster J. B., Hankinson J., Hudgson P.: The diagnosis and management of the Chiari anomalies in adult life. Brain 1968, 91, 131—140.
3. Attinen E. E.: Medico-legal-aspects of head injury. Lancet 1959, 2, 950—956.
4. Bryc R.: Ocena następstw urazu w przebiegu naczyniaka jamistego mózgu. Arch. Med. Sąd. 1965, 17, 175—178.
5. Brzecki A., Pawlak L.: Zespół „sztywnego człowieka”. Pol. Tyg. Lek. 1973, 28, 1898—1900.
6. Dymecki J., Kozłowski P.: Homolateralny szmer wewnątrzczaszkowy w przypadku naczyniaka mózgu. Pol. Tyg. Lek. 1960, 15, 1037—1039.

7. Engelhardt P.: Über traumatische Carotisthrombosen. *Nervenarzt* 1972, 43, 527—530.
8. Erbslöh F.: Der Syringomyeliekomplex. In: *Differentialdiagnose neurologischer Krankheitsbilder* — von G. Bodechtel. Kapitel V, s. 715—726 G. Thieme, Stuttgart 1963.
9. Hertel G.: Die Bedeutung schwerer körperlicher Arbeit für die Manifestation der Syringomyelie. 2-nd *Industrial and Environmental Neurology Congress*, Prague 25—27.IX.1974.
10. Gajowa T., Hulanicka K.: Urazy czaszki w materiale Kliniki Neurologicznej we Wrocławiu. VI Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologów i Neurochirurgów, Łódź 4—7.XII.1963.
11. Gannuszkina J. W.: Znaczenije autoantigennosti elementow nierwnoj tkanii pri sosudistych i trawmaticzeskich porażenijach mozga. *Žurn. Niewropat. Psichiat. Korsakowa* 1970, 70, 172—177.
12. Gardner J. W.: Hydrodynamic mechanism of syringomyelia; its relationship to myelocoele. *J. Neurol. Neurosurg. Psichiat.* 1965, 28, 247—259.
13. Köbcke H.: *Das Schädel — Hirn — Trauma*. G. Thieme, Leipzig 1944.
14. Kuźniecowa N. J., Dokuczajewa O. N., Łukaczew G. Ja.: Niekotoryje dannyje kliniki immunologicznego obsledowanija bolnych w otdalennom pieriodie czierepno-mozgowej trawmy. *Žurn. Niewropat. Psichiat. Korsakowa* 1974, 74, 757—763.
15. Leischner K.: Die neurologische Symptomatik im Verlauf und im Spätstadium cerebraler Arterienverschlüsse. 15. Tagung Gesellschaft für Hirntraumatologie und klinische Hirnpathologie. Bad Homburg 4—5.V.1973.
16. Mielerowicz A. E.: O znaczeniji trawmaticzeskich faktorow w razwitii siringomiellii. *Žurn. Niewropat. Psichiat. Korsakowa* 1957, 57, 600—604.
17. Moses L., Heler C.: Ocular myopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1965, 59, 1051—1057.
18. O'Reilly S.: Problems in Wilson disease. *Neurology* 1967, 17, 137—143.
19. Peters G.: Pathomorphologie der posttraumatischen Carotis- und Basalithrombosen. 15. Tagung Gesellschaft für Hirntraumatologie und klinische Hirnpathologie, Bad-Homburg 4—5.V.1973.
20. Radomska M.: Wpływ urazów czaszki na ujawnianie się i przebieg choroby Wilsona. VIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Neurologicznego, Wrocław 10—12.IX.1970.
21. Sułat H.: Badania kliniczne nad przewlekłymi postępującymi mózgowymi zespołami po zamkniętych urazach czaszki. Praca na stopień doktora medycyny. Akademia Medyczna, Łódź 1963.
22. Wald I.: Badania kliniczne, genetyczne i doświadczalne nad zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym. Rozprawa habilitacyjna. Akademia Medyczna, Łódź 1962.
23. Williams B.: The distending force in the production of „Communicating syringomyelia”. *Lancet* 1969, 2, 189—193.
24. Williams B., Turner E.: Communicating syringomyelia presenting immediately after trauma. *Acta Neurochir. (Wien)* 1971, 24, 97—106.

Anschrift der Verfasserin: Klinika Neurologiczna A.M., Kopcińskiego 22, 90-153 Łódź.

H. GROSS, H. PFOLZ

NEUROPATHOLOGISCHE BEFUNDE UND KLINISCHES KORRELAT BEI ALKOHOLENCEPHALOPATHIEN

Ludwig Boltzmann Institut zur Erforschung der Missbildungen des Nervensystems
Leiter: Primarius Dr H. Gross

Die Klinik kennt beim chronischen Alkoholismus akut auftretende Psychosen, und zwar im Sinne eines akuten exogenen Reaktionstypus nach Bonhoeffer, von denen die wichtigsten das Delirium tremens, die Alkoholhalluzinose und die Polioencephalopathia haemorrhagica superior Wernicke sind.

Der Neuropathologe unterscheidet beim chronischen Alkoholismus uncharakteristische Störungen und hirnlokalisatorische Veränderungen, die aber auch bei anderen Krankheiten zu finden sind. Die Wernicke'sche Erkrankung und das Marchiafava-Bignami-Syndrom sind dem Neuropathologen seit langem bekannt. Letzteres hat aber in unseren Populationen klinisch kaum eine Bedeutung. Zu diesen Syndromen kann ein weiteres, nämlich das der zentralen pontinen Myelinolyse (zpMI) hinzugesellt werden, weil es nach unseren Erfahrungen sowohl klinisch als auch neuropathologisch von den anderen klar abzugrenzen ist. In der uns zugänglichen Literatur sind bis 1973 103 Fälle von zpMI publiziert worden. Die Zahl der beobachteten Fälle ist jedoch sicherlich grösser (persönliche Mitteilungen von Bischoff, Müller, Krücke u.a.).

Seitelberger hat kürzlich über 25 Fälle referiert, wobei ein Teil der Fälle bereits 1962 und 1968 von Seitelberger u. Gross publiziert wurden. Aus demselben Material bearbeitete 1973 Okeda 23 Fälle nach ausschliesslich neuropathologischen Gesichtspunkten. In der Hauptsache beschäftigen sich die Arbeiten mit neuropathologischen Fragen, jedoch wurde nicht nur vom Erstdarsteller Adams (1959), sondern auch von anderen Autoren die klinische Symptomatologie berücksichtigt. 41% der bisher dargestellten Fälle sind chronische Alkoholranke. Auch bei jenen 2 Fällen, die bereits zu Lebzeiten als zpMI verifiziert werden konnten (Boudin et al. 1963, Paguirigan u. Lefken 1969), handelte es sich ebenfalls um Alkoholranke.

Wenn Colmant (1965) der Meinung Ausdruck verleiht, dass die Diagnose bei der Wernicke'schen Erkrankung nur bei einem kleinen Teil der Patienten klinisch möglich ist und weiterhin die Domäne des Morphologen bleiben wird, so schien dies auch im Hinblick auf das Gesagte für die zpMI zu gelten. Die umfassendste

Darstellung klinischer Probleme findet sich bei Jacob u. Spalke (1971), die eine Störung des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes als vordergründig betrachten. Diese und auch andere Autoren sind der Ansicht, dass vorzüglich Pankreo- und Hepatopathien beim chronischen Alkoholismus sowie ein Mal-Absorptionssyndrom für das Auftreten einer zpMI verantwortlich zu machen sind. Nach oben zitierten Autoren kommt es aber auch bei kachektischen Zuständen, bei akuten und permanenten Elektrolyt- und Wasserhaushaltsstörungen zu diesem Krankheitsbild. Der Prozess, der nach Seitelberger auch apoplektiform in Erscheinung treten kann, endet innerhalb von ein bis zwei Wochen tödlich. Die klinische Symptomatologie ist uneinheitlich und erklärt sich aus einer möglichen Überlagerung von schweren Allgemein- und lokalen Krankheitserscheinungen sowie einer Überlappung der gesamten Symptomatologie von seiten des Lokalbefundes der zpMI. Kardinalsymptome sind eine Einengung der Bewusstseinstätigkeit bis zum Koma, pseudobulbärparalytische Erscheinungen, Hirnnerven- und Extremitätenpareesen sowie eine eventuell auftretende Hybernatriämie und Hypokaliämie.

Wir glauben, insoferne die Berechtigung zu besitzen, das klinische Syndrom der zpMI gegenüber anderen klinischen Syndromen beim Alkoholismus chronicus insbesondere der Wernicke'schen Encephalopathie abzugrenzen, weil wir bei 3 von den von uns morphologisch nachgewiesenen 15 Fällen bereits zu Lebzeiten die Diagnose der zpMI stellen konnten. Da wir jetzt naturgemäss diesem Syndrom schon auf Grund der neuropathologischen Befunde ein besonderes Augenmerk zuwenden, so ist uns bei den letzten Fällen, die auf unserer eigenen Abteilung beobachtet wurden, im Gegensatz zu früher eine Fehldiagnose kaum mehr unterlaufen.

Wir haben 204 Gehirne von Patienten untersucht, die in unserem psychiatrischen Krankenhaus mit der Diagnose einer akuten oder chronischen Alkoholpsychose verstarben. Der Anteil der Fälle mit zpMI betrug daher 7,5%. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Jellinger, dessen Material allerdings nicht ausschliesslich einem psychiatrischen Krankengut entstammt. Da die zpMI vom morphologischen Standpunkt ausreichend bearbeitet ist, so erübrigt sich eine Darstellung, in extenso. Wie in der Literatur beschrieben, sind auch unsere Befunde bei der zpMI bezüglich Lokalisation, Ausdehnung und Quantität sehr unterschiedlich. Die symmetrischen, oft schmetterlingsförmigen, asymmetrischen, aber auch einseitig gelegenen Entmarkungsherde finden sich vorzüglich im Brückenfuss, reichen manchmal bis in das Mittelhirn oder auch in die Brückenhaube, wobei die Pyramidenbahnareale eher selten erfasst sind. Von anderen, insbesondere degenerativen Entmarkungsprozessen ist die zpMI eindeutig zu differenzieren. Im Herdbereich kommt es zu einem gliösmesodermalen Abbau, der letztlich zu einer Pseudomalazie führt, wobei das nervöse Parenchym in auffallender Weise verschont zu bleiben pflegt.

Der umfassenden klinischen Darstellung der zpMI und der Gegenüberstellung und differentialdiagnostischen Abgrenzung zur Wernicke'schen Encephalopathie sei zunächst eine Fallbeschreibung vorangestellt.

Fall Nr. 7/2/72 (siehe Abbildung): Der 46 Jahre alt gewordene Patient hatte

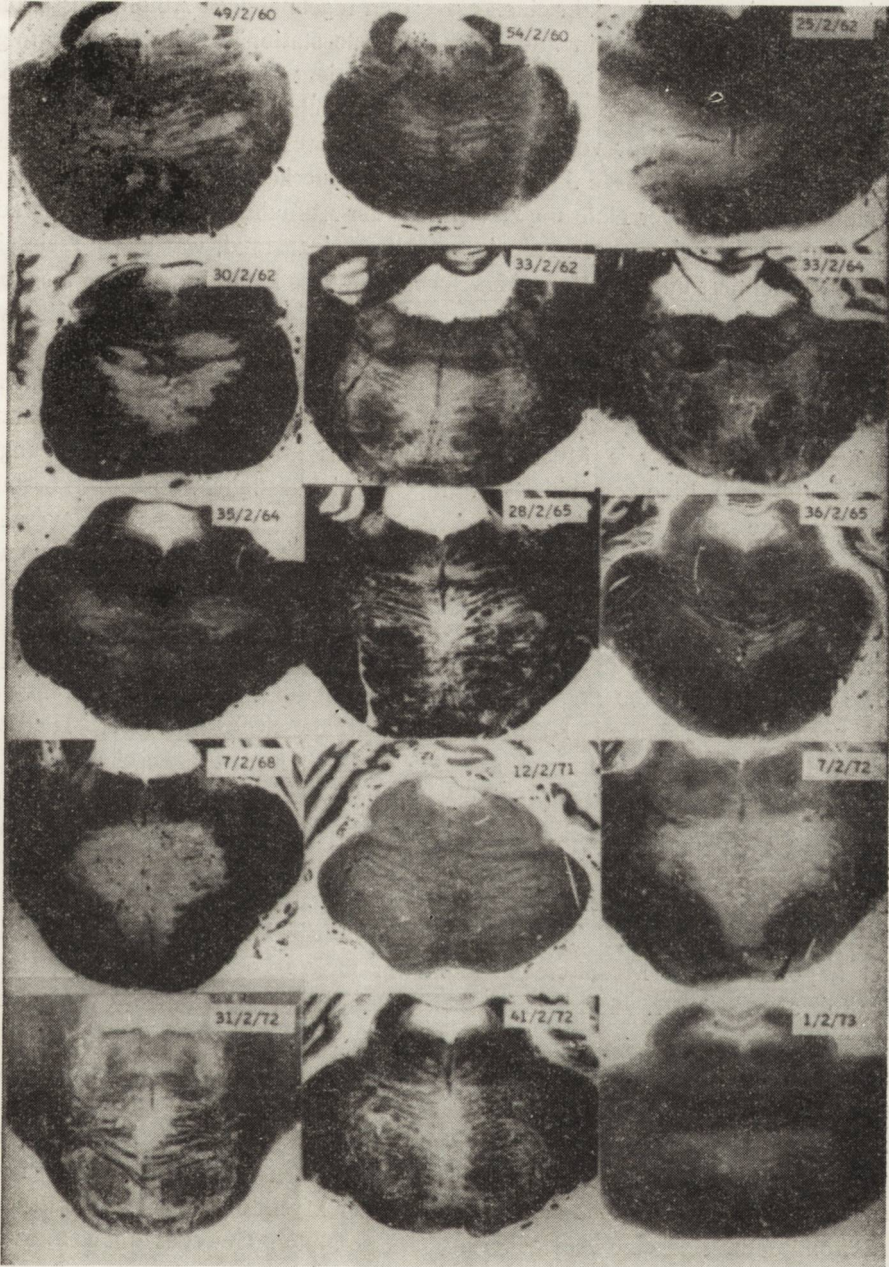


Abb. 1. Zentrale pontine Myelinolyse (eigene Fälle). Markscheidenfärbung nach Heidenhain und Klüver-Barrera.

Ryc. 1. Demielinizacja środkowa mostu (własne przypadki). Barwienie na osłonki mielinowe metodą Heidenhaina i Klüver-Barrera.

seit dem zwanzigsten Lebensjahr einen exzessiven regelmässigen Alkoholmissbrauch betrieben, und zwar mit Wein und Bier. Die erste stationäre Einweisung erfolgte 2 Jahre vor dem Tode. Bereits damals war der Patient kachektisch und bot neben einer arteriellen Hypotonie ausgeprägte Zeichen eines chronischen Alkoholismus. Die stationäre Behandlung war vollkommen frustan gewesen. In der Folge blieb der Patient arbeitsunfähig, wurde 5 Wochen vor der neuerlichen Einweisung bettlägrig und nahm immer weniger Nahrung zu sich. Bei der Aufnahme zeigte der hochgradig kachektisch Kranke einen stark reduzierten Allgemeinzustand, war bewusstseinseingengt, desorientiert und konnte zur Zwischenanamnese kaum brauchbare Angaben machen. Die mnestischen Leistungen waren hochgradig reduziert. Der Patient war völlig adynamisch und nicht imstande sich zu erheben. Neurologisch fanden sich mangelhaft reagierende Pupillen, ein Horizontalnystagmus, eine angedeutete zentrale Facialisparesie rechts, eine bulbäre Sprach- und Schluckstörung sowie eine schlaffe Paraparesie der Beine. Die Muskulatur war diffus atrophisch, die Bewegungen erheblich ataktisch. Eine Sensibilitätsprüfung war nicht möglich. Somatisch bestand ausserdem eine schwere Exsiccose und Anämie infolge einer hämorrhagischen Colitis, ferner eine Fettleber und ein Harnwegsinfekt. Das Kalium im Serum war erhöht, die übrigen Elektrolyte zeigten Normwerte. Das EEG wurde als diffus abnorm interpretiert, da sich, soweit bei den schlechten Aufnahmebedingungen beurteilbar, ein thetagestörter Alphanrhythmus mit rechtsbetonten Thetaeinstreuungen fand. Terminal traten eine Pneumonie und Dekubitalulcera auf. Der Patient verstarb nach zwanzigtägigem Krankenhausaufenthalt trotz intensiver Therapie. Obwohl die Durchuntersuchungen keineswegs als komplett anzusehen sind, da unter anderem Liquorbefund und diesbezügliche eiweisselectrophoretische Untersuchungen und Verlaufskontrollen der Elektrolytuntersuchungen fehlen, haben wir uns auf Grund der noch zu beschreibenden Kriterien entschlossen, diesen Fall bereits klinisch im Sinne einer zpMI zu interpretieren.

Der pathologisch-anatomische Befund bestätigte die klinischen Diagnosen. Die Leber imponierte dem Morphologen nicht nur makroskopisch, sondern auch histologisch als Fettleber. Im histologischen Bild konnte die fibröse Umwandlung festgestellt werden.

Neuropathologisch fand sich eine diffuse leichtgradige Grosshirnatrophie (Hirngewicht 1100 Gramm). Im zentralen Brückenbereich konnte auf Grund der Konsistenzänderung und der verwaschenen Struktur bereits makroskopisch die Diagnose der zentralen pontinen Myelinolyse gestellt werden. Auf den Markscheidenbildern war ebenfalls schon makroskopisch die Ausdehnung der Myelinolyse genau zu erkennen. Im Zellbild fand sich eine Auflockerung des gesamten Gewebes mit vermehrten Makrophagen, zum Teil mit Lipoidmaterial angereichert, daneben Fettkörnchenzellen sowie eine diffuse, eher nicht lokalisierte Veränderung der Makroglia. Das Parenchym war ausser im Zentrum der Läsion erhalten.

Wenn wir nun die klinische Symptomatologie dieses Falles mit der unserer anderen 14 Beobachtungen zusammenfassen, so ergibt sich folgendes für die zpMI beim

chronischen Alkoholismus typisches Bild: sämtliche Patienten sind chronische Trinker, die eher regelmässig gleichmässige Alkoholmengen zu sich nehmen.

Ein eigentliches Delirium tremens ist nirgends vermerkt, soweit diesbezügliche Angaben überhaupt vorliegen. Das mittlere Lebensalter betrug im statistischen Mittelwert 51,5 Lebensjahre mit einer Standardabweichung von 8,2 Jahren. Soweit — wie bei 7 Fällen — die Dauer des Alkoholmissbrauches exakt zu bestimmen ist, betrug sie im statistischen Mittelwert 17,5 Jahre mit einer Abweichung von 11,2 Jahren. Sieben Mal bestand eine Frühinvalidität, bei weiteren drei Kranken ein erheblicher sozialer Abstieg, und fünf waren stärker verwahrlost. Sämtliche Fälle imponierten daher bei der Aufnahme als hochgradig körperlich und psychisch verwahrloste Trinker. Sie schienen für den Psychiater nicht besonders eindrucksvoll, weil weder psychische noch neurologische Symptome vordergründig waren. Am ehesten erinnert dieses Bild an ein adynamisch dahinliegendes Rückendelir. Die Kranken zeigen eine mehr minder eingeschränkte Bewusstseinslage, sind desorientiert, vollkommen apathisch, auf Fragen kaum konzentrierbar, zeigen erheblich verminderte mnestiche Fähigkeiten und schenken den Vorgängen bei der Untersuchung kein Augenmerk. Sie liegen in Rückenlage dahin und vollführen nur gelegentlich Unruhebewegungen. Die für das Delirium tremens charakteristische Plussympptomatik fehlt. Es besteht keine triviale Verwirrtheit oder stärkere psychomotorische Unruhe. Die Patienten sind kaum suggestibel und konfabulieren nicht oder nur selten. Auch die Angst ist gering. Sichere halluzinatorische Erlebnisse waren nur bei 2 Fällen nachweisbar. Die neurologische Symptomatik ist durch die mangelnde Mitarbeit der Kranken sowie durch die Bewusstseinsstörung in ihrer vollen Ausprägung kaum oder erst nach wiederholten Untersuchungen zu erfassen. Die Symptome korrespondieren mit der Ausdehnung der Läsion. In 9 der 15 Fälle wurden Pupillenstörungen (Anisocorie, mangelhafte Lichtreaktion oder Entrundung der Pupillen) erhoben, achtmal eine bulbäre Sprache, einmal eine Augenmuskellähmung und dreimal eine Facialisparesie. Bei praktisch allen Kranken bestand ein der Polyneuropathie ähnliches Bild mit fehlenden oder abgeschwächten Reflexen an den Beinen; alle waren mehr oder minder ataktisch. 85% konnten sich aus der Rückenlage nicht erheben. Sämtliche Kranke waren mit Harn und Stuhl inkontinent und intensiv pflegebedürftig. In somatischer Hinsicht stand der reduzierte Allgemeinzustand mit Zeichen der Exsiccose im Vordergrund. Knapp 40% waren bereits bei der Aufnahme schwer kachektisch. Die Blutdruckwerte lagen etwas unter der Norm mit einem systolischen Mittelwert von 122,6 mm Hg und einem diastolischen von 75,8 mm Hg.

Soweit wir über serologische Untersuchungen verfügen, bestand bei allen Patienten eine zumindest mittelgradige Anämie. Die erhobenen Liquorbefunde ergaben keine Abweichungen von der Norm. Da bei fast allen Fällen Elektrolytuntersuchungen fehlen, so können wir darüber keine Aussage machen. In 75% der Fälle bestand ein schwerer Leberzellschaden entweder in Form einer Steatose oder Cirrhose. Bei mehr als der Hälfte fand sich eine Myocarddegeneration.

Die Aufenthaltsdauer betrug im Durchschnitt 22,4 Tage. Der Exitus letalis erfolgte an einer hypostatischen Pneumonie.

Therapeutisch konnte gerade in den letzten Jahren bei diesen Fällen durch eine gezielte Infusionstherapie und Ausgleich der Elektrolytentgleisungen ein gewisser Fortschritt erzielt werden. Wenngleich es uns jetzt noch kaum gelingt, Patienten, die mit einem solchen Syndrom zur Aufnahme kommen, durchzubringen, so ist es durch eine entsprechende Therapie doch möglich, den Krankheitsverlauf zu verzögern. In 4 Fällen, die anfangs eine der zpMI ähnliche Symptomatik zeigten, ist es uns gelungen, eine Besserung des Zustandsbildes zu erreichen, so dass diese Kranken nicht nur überlebten, sondern bis auf einen sogar wieder gehfähig wurden und als Restsymptomatik ein einer Pseudotabes ähnliches Bild mit höhergradiger Demenz besteht.

Zum neuropathologischen Befund ist auf Grund des oben erwähnten kaum etwas hinzuzufügen. Bemerkenswert ist eine bei allen Fällen anzutreffende Grosshirnatrophie, die mit einem mittleren Hirngewicht von 1141, 2 Gramm doch signifikant unter dem Hirngewicht unserer anderen obduzierten Alkoholiker liegt. Nur bei einem Fall, der auch klinisch Augenmuskelparesen aufwies, fand sich in den Prädilektionsstellen eine allerdings erst in Entwicklung begriffene Wernicke'sche Encephalopathie. Sonst waren wesentliche, auf den Alkoholismus beziehbare Läsionen nicht nachweisbar. Differentialdiagnostisch muss das klinische Syndrom der zpMI in erster Linie von der Encephalopathia haemorrhagica superior Wernicke abgegrenzt werden. Eine tabellarische Übersicht soll dies veranschaulichen, wobei sich allerdings zwischen der zpMI und der Wernicke'schen Erkrankung zumindest auf Grund der literaturmässigen Beschreibung doch des öfteren mehr als bei uns Überschneidungen ergeben können. Es ist somit darauf hinzuweisen, dass die Wernicke'sche Encephalopathie ein eher psychoorganisch — neurologisches und das Syndrom der zpMI ein somatisch — neurologisches Krankheitsgeschehen beinhaltet. Beim Delirium tremens, das als funktionelles Geschehen keine hirnlokalisatorisch umschriebenen Läsionen aufweist, stehen psychotische und vegetative Symptome im Vordergrund (siehe Tabelle).

Ein besonders charakteristisches Syndrom bei der zpMI scheint unseres Erachtens das Merkmal der Adynamie und „des sich aus der Rückenlage Nicht-erhebenkönnens“, welches bei den anderen Krankheitsbildern meist überhaupt nicht oder höchstens im Terminalstadium zu finden ist. Es handelt sich hier offenbar um ein komplexes Syndrom, das in erster Linie der körperlichen Erschöpfung, in zweiter Linie der Ataxie beziehungsweise der Polyneuropathie und wahrscheinlich in letzter Linie einer Abulie zuzuschreiben ist. Sind diese Merkmale beim chronischen Alkoholismus mit einer Hirnstammsymptomatik ohne Augenmuskelparesen, mit einer Bewusstseinsstörung ohne psychotische Plussymptomatik korreliert, so wird man auch beim Fehlen entsprechender Laborbefunde immer an eine zpMI denken müssen. Den somatischen Gegebenheiten, insbesondere den Störungen im Elektrolyt- und Wasserhaushalt kommt ebenso wie den Störungen der Leberfunktionen

Tabelle 1. Differentialdiagnostische Kriterien bei Delirium tremens, Encephalopathia Wernicke und zentraler pontiner Myelinolyse

Tabela 1. Kryteria różnicowo-diagnostyczne delirium tremens, encefalopatii Wernickego i demielinizacji środkowej mostu (central pontine myelinolysis)

Symptomatik objawy	Delirium tremens	Ecephalo- pathia wernicke	Central pon- tine myelinolysis
Frühinvalidität wczesne inwalidztwo	+—	++	+++
Verwahrlosung zanik odpowiedzialności	+—	++	+++
Vorangegangenes delirium przebyte delirium	++	+	+—
Triviale verwirrtheit splątanie	+++	++	—
Halluzinationen halucynacje	+++	++	+—
Konfabulationen konfabulacje	+++	++	+—
Pupillenstörung zaburzenia źrenic	—	+++	+++
Augenmuskelparesen porażenie m. ocznych	—	+++	—
Bulbäre zeichen objawy opuszkowe	—	+—	+++
Ataxie ataksja	—	+++	+++
Schlaffe paresen porażenia wiotkie	—	—	++
Polyneuropathie polyneuropatie	+—	+—	+++
Vegetative symptomatik objawy wegetatywne	+++	+	+
Adynamie bezsilność	+—	+—	+++
„Nicht erheben können“ niemożność „zebrania się”	+—	+—	+++
Kachexie, dekubitus wyniszczenie, odleżyny	+—	+—	+++
Anämie niedokrwistość	+—	+—	+++
Akuter verlauf przebieg ostry	+++	++	+—
Mortalität śmiertelność	+—	+—	+++

und Anämie eine sehr grosse Bedeutung zu, doch sind gerade diese Befunde, wie zumindest aus der Literatur hervorgeht, noch keineswegs so einheitlich und eindeutig, um daraus mehr als richtungweisende Schlüsse ziehen zu können.

H. Gross, H. Pfolz

WYNIKI NEUROPATHOLOGICZNE I KORELACJA KLINICZNA W ENCEFALOPATII ALKOHOLOWEJ

Streszczenie

Autorzy przedstawili wyniki badania neuropatologicznego 15 przypadków przewlekłego alkoholizmu, w których stwierdzono uszkodzenie mieliny w środkowej części mostu (central pontine myelinolysis). Ścisłe zdefiniowanemu obrazowi morfologicznemu odpowiada zespół kliniczny, który zdaniem autorów jest możliwy do zróżnicowania z innymi zespołami klinicznymi, występującymi w przebiegu przewlekłego alkoholizmu.

Х. Гросс, Х. Пфольц

НЕВРОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И КЛИНИЧЕСКАЯ КОРРЕЛЯЦИЯ ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Представлены результаты невропатологического исследования 15 случаев хронического алкоголизма, в которых было обнаружено повреждение миелина в средней части моста (так называемое central pontine myelinolysis). Четко определенной морфологической картине соответствовал неврологический симптом, который можно, по мнению авторов, отличить от других клинических симптомов, проявляющихся в течение хронического алкоголизма.

LITERATUR

1. Adams R. D., Victor M., Mancall E. L.: Central pontine myelinolysis. Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.) 1959, 81, 154—172.
2. Boudin G., Labet R., Lyon G., Burnet P.: La myélinolyse de la protuberance. Presse méd. 1963, 71, 2080—2082.
3. Colmant H. J.: Encephalopathien bei chronischem Alkoholismus; Stuttgart: Enke, 1965.
4. Colmant H. J.: Pathomorphologie des chronischen Alkoholismus. Internist 1968, 9, 256—260.
5. Jacob H., Spalke G.: Klinik und Neuropathologie zentralnervöser Komplikationen nach akuten Elektrolyt- und Wasserhaushaltsstörungen unter besonderer Berücksichtigung der zentralen pontinen Myelinolyse. Fortschr. Neurol. Psychiat. 1971, 39, 169—191.
6. Jellinger K.: Persönliche Mitteilung.
7. Goebel H.H., Herman-Ben Zur P.: Central pontine myelinolysis. Brain 1972, 95, 495—504.
8. Gross H., Kaltenbäck E., Pfolz H.: Das klinische Syndrom der zentralen pontinen Myelinolyse beim chronischen Alkoholismus. Vortrag im Verein für Psychiatrie und Neurologie. 1974—10—28, Wien.

9. Okeda R.: Centrale pontine Myelinolyse. *Acta neuropath. (Berl)*. 1974, 27, 233—246.
10. Paguirigan A., Lefken E. B.: Central pontine myelinolysis. *Neurology (Minneap.)* 1969, 19, 1007—1011.
11. Seitelberger F., Gross H.: Zur Neuropathologie des Alkoholismus. In: Kryspin-Exner, Arbeitstagung über Alkoholismus. Wien: Schreib- und Karteibüro E. Werner 1962.
12. Seitelberger F., Gross H.: Zur organischen Hirnschädigung des Alkoholkranken. In: Kryspin-Exner u. Olteanu: Klinik und Therapie des Alkoholismus. Wien: Wiener Med. Akad. 1968.

Anschrift der Verfasser: Prim. Dr H. Gross, Ludwig Boltzman-Institut, Psychiatrisches Krankenhaus der Stadt Wien, Baumgartner Höhe 1, A-1145 Wien, Österreich.

H.A.F. SCHULZE

QUANTITATIVE METHODEN DER HIRNRINDENARCHITEKTONIK ZUR
ERFASSUNG VON FOLGEZUSTÄNDEN EXOGENER EINWIRKUNGEN
AUF DAS ZENTRALNERVENSYSTEM

Nervenklinik der Humboldt Universität zu Berlin, DDR
Lehrstuhl für Neurologie: Prof. Dr. H. A. F. Schulze

Die architektonische Hirnforschung hat in ihrer klassischen Zeit einen gewaltigen Anteil zur Vervollständigung unserer Kenntnisse vom strukturellen Aufbau des menschlichen Gehirns erbracht. Das Lebenswerk der Vogts oder Brodmanns wäre heute wohl kaum nachvollziehbar. Von Anfang an hat die „topistische Hirnforschung“ — und gerade mit dieser Bezeichnung hat Oskar Vogt (1921) dies nachdrücklich zum Ausdruck gebracht — die dialektische Einheit von Struktur und Funktion im Auge gehabt und sich damit in den Dienst einer klinischen Betrachtungsweise gestellt.

Während die areale Gliederung der Hirnrinde eine abgerundete Darstellung erfahren hat, kann von einer gleichermassen umfassenden Entwicklung der Pathoarchitektonik nicht die Rede sein. Zwar gründet sich z.B. unsere heutige Nosologie der striären Erkrankungen auf Ergebnisse der architektonischen Hirnforschung und haben auch auf diesem Gebiet umfangreiche Bearbeitungen durch C. und O. Vogt (1922, 1936, 1938) wesentliche Fortschritte gebracht — ich erinnere nur an „die Topistik des Nervensystems und ihre klinische Bedeutung“ (1921), die „Erkrankungen der Grosshirnrinde im Lichte der Topistik, Pathoklise und Pathoarchitektonik“ (1922), und „Sitz und Wesen der Krankheiten im Lichte der topistischen Hirnforschung und des Variierens der Tiere“ (1936, 1938) — die weitere Entwicklung war aber schon aus Gründen des für derartige Untersuchungen notwendigen, unverhältnismässig grossen Zeitaufwandes stark behindert und eingeschränkt. Voraussetzung zur Abgrenzung qualitativer und quantitativer Veränderungen der architektonischen Gliederung ist die Kenntnis der normalen Variationsbreite. Dafür fehlen entsprechende absolute Messwerte weitgehend. Rein deskriptive Vergleiche sind aber gleichermassen unbefriedigend wie anfechtbar, wenn es sich nicht um eindeutig pathologische Veränderungen handelt. Nun belegen aber neuere Untersuchungsergebnisse eindeutig, dass durch äussere Einwirkungen bedingte Veränderungen im Verhältnis von Struktur und Funktion, z.B. durch Afferenzausschaltung,

zumindest solange Wachstums- und Reifungsvorgänge noch nicht abgeschlossen sind, also während der Entwicklung, in gewissem Umfang aber auch nach Abschluss der Entwicklung z.B. im Bereich der Synapsen bestimmter Neuronensysteme, sich quantitativ auf morphologische Merkmale auswirken können. Hier verwischen sich die Grenzen zwischen normaler und pathologischer Anatomie.

Afferenzausschaltungen bzw. — einschränkungen kommen nicht nur durch zerebrale Läsionen zustande, sondern auch durch äussere z.B. physikalische Einflüsse. So konnten wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren zeigen, dass sich die Sehrinde von neugeborenen Mäusen, die im Dunkeln aufgezogen wurden, quantitativ-architektonisch von der Sehrinde anderer Mäuse unterscheidet, die bei normalen Helligkeitsverhältnissen oder in einer weiteren Vergleichsgruppe unter ständiger Lichteinwirkung aufgewachsen waren. Mein Mitarbeiter Egert hat kürzlich darüber berichtet (1969, 1974). Bei Anwendung der Nissl-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass die architektonische Schichtengliederung bei grösserer Lichteinwirkung differenzierter und die Zahl der Ganglienzellen pro Volumeneinheit geringer war. Winkelmann (1974) konnte mit der Golgi-Rapid-Methode zeigen, dass sich in der *Area striata* der Ratte nach Koagulation des *Corpus geniculatum laterale* nach 28 Tagen an den Hauptdendriten der Pyramidenzellen der Lamina V eine Spinesverminderung um 20% und bei Aufzucht von Ratten in völliger Dunkelheit nach 50 Tagen eine Spinesreduktion um nahezu 50% ergaben. „Im *Corpus geniculatum laterale* betrug der Spinesverlust nach Dunkelauzucht ebenfalls nahezu 50%, nach Enukleation wurden die Spines im kontralateralen *Corpus geniculatum laterale* ebenfalls um 50% vermindert“. Nach Extirpation der ipsilateralen Area 17 sank die Spineszahl im *Corpus geniculatum laterale* über 30% ab“.

In den meisten Fällen ist es unmöglich, absolute Zellzahlen zu ermitteln. Wir bedienen uns deshalb für derartige Untersuchungen der Treffermethode, bei der ein Zählokular mit sog. Trefferpunkten verwendet wird. Das von uns verwendete Okular hat ein kreisförmiges Auswertungsfeld mit 6 durch kurze Schnittlinien unterbrochenen Geraden, so dass sich 25 Trefferpunkte ergeben. Gezählt wird das Zusammentreffen der zu zählenden Gewebsanteile mit den Trefferpunkten. Bei gleichbleibendem Gewebsvolumen, das sich unter Berücksichtigung des Tiefenschärfebereiches der Schnittdicke mittels Objekt- und Okularmikrometer ermitteln lässt, können sowohl die numerischen Werte von Ganglienzellen oder deren Bestandteilen, wie z.B. Zellkernen als Koeffizienten wie der Grauzellkoeffizient, d.h. Volumen eines Griseums durch Nervenzellvolumen, Gesamtkernkoeffizient, Gliakernkoeffizient oder auch Verhältniszahlen wie Ganglienzellvolumen zu Gliakervolumen oder Nervenzellvolumen zu Nervenzellkernvolumen, d.h. also die Kernplasmarelation erfasst werden.

Vergleichszählungen bei verschiedenen Untersuchungsgruppen setzen selbstverständlich die Einhaltung gleicher Bedingungen voraus. Auf diese Weise können durch Umwelteinflüsse bedingte quantitative Veränderungen der Hirnarchitektur und darüber hinaus Vulnerabilitätsunterschiede im Sinne der Vogtschen Patho-

klisenlehre oder auch von Gefäßversorgungsbedingungen abhängige Auswirkungen festgestellt werden, vor allem auch dann, wenn histopathologische Befunde im üblichen Sinne nicht eindeutig abgrenzbar sind. Die zur statistischen Sicherung notwendige Auszählung einer grossen Zahl von Gesichtsfeldern und der erhebliche Aufwand von Rechenarbeit haben in der Vergangenheit abschreckend gewirkt. Die moderne Technik hat aber in dieser Beziehung spürbare Erleichterung gebracht. Die Anwendungsmöglichkeiten und die Modifizierbarkeit der Methodik sind vielfältig. Bei vielen Fragestellungen kommt es ja lediglich auf statistisch signifikante Unterschiede an, die auch durch relative Werte gesichert werden können.

In letzter Zeit sind auch von anderen Autoren biometrisch-statistische Untersuchungen wieder häufiger herangezogen worden, um derartige Fragen zu beantworten. Lassen Sie mich das anhand einiger weniger Beispiele zeigen. Franke (1974) untersuchte „in den letzten 5 Jahren den *Gyrus frontalis medius* von über 1000 verstorbenen präsenilen und senilen Patienten mit der Methode von Braumnühl an 20 μm dicken Gefrierschnitten qualitativ und quantitativ auf senile Drusen“. Er fand u.a. positive Korrelationen der Drusenhäufigkeit zu alterspsychiatrischen Erkrankungen, die sich weiter differenzieren liessen. Tennstedt und Poppe (1974) verwendeten für biometrische Untersuchungen bei Hirnatrophien ein Okularnetz-mikrometer. Die an Nissl-Schnitten aus dem Ammonshorn ermittelten Indices für Nerven- und Gliazellen ergaben im Vergleich zwischen *Morbus Pick* und *Morbus Alzheimer* signifikante Unterschiede aller Quotienten in sämtlichen Areae der Ammonshornformation. Mit der gleichen Methodik können ohne weiteres Auswirkungen exogener Faktoren auf das ZNS untersucht werden. Frotscher (1974) wies mit synapsoarchitektonischen Untersuchungen nach, dass Afferenzausschaltungen durch operative Unterbrechung interneuronaler Verbindungen während der frühen postnatalen Entwicklungsphasen zu schweren Differenzierungsstörungen des Neurons führen. Auch solche Befunde lassen sich mit der Treffermethode vergleichend quantitativ auswerten.

Ich hoffe, mit diesen Beispielen gezeigt zu haben, dass quantitativ-architektonische Auswertungen von Hirnserienschnitten für bestimmte Fragestellungen, besonders auch zur Erfassung von Langzeiteinwirkungen von Umweltfaktoren auf das Zentralnervensystem nach wie vor von Bedeutung sind. Ich danke den zitierten Autoren für die Erlaubnis, ihre Ergebnisse zu erwähnen.

H. Schulze

ZASTOSOWANIE ILOŚCIOWYCH METOD BADANIA ARCHITEKTONIKI KORY MÓZGOWEJ DLA OCENY WPLYWU CZYNNIKÓW EGZOGENNYCH NA OŚRODKOWY UKŁAD NERWOWY

Streszczenie

Nawiązując do faktów historycznych, przedstawiono zakres możliwości i metody badań ilościowych architektoniki kory mózgowej. Wskazano na szczególne zastosowanie tych metod dla oceny wpływu czynników zewnętrznych prowadzących do zmiany specyficznych stosunków

objętościowych komórki i jej poszczególnych elementów strukturalnych. Wykazano między innymi, że zastosowanie metody losowej dla ilościowej oceny skrawków seryjnych ma istotne znaczenie dla określonych zagadnień, szczególnie dla oceny długotrwałego działania czynników zewnątrzpochodnych na ośrodkowy układ nerwowy.

X. Шульце

ПРИМЕНЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ
АРХИТЕКТониКИ КОРЫ МОЗГА ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ЭКЗОГЕННЫХ
ФАКТОРОВ НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

Резюме

Основываясь на исторических фактах представлены спектр возможностей и методы количественного исследования архитектоники мозговой коры. В работе указывается особенно на применение этих методов для оценки влияния экзогенных факторов, ведущих к изменениям специфических объемных соотношений клетки и её отдельных структурных элементов. В частности отмечается, что применение вероятностного метода для количественной оценки серийных срезов имеет существенное значение для определенных проблем, особенно для оценки длительного воздействия экзогенных факторов на центральную нервную систему.

LITERATUR

1. Egert M.: Quantitativ-architektonische Veränderungen der Sehrinde von Mäusen bei unterschiedlichen Lichteinwirkungen auf das Sehorgan. Diss. Berlin, 1969.
2. Egert M.: Funktionelle Aussagemöglichkeiten auf Grund zyto- und angioarchitektonischer Untersuchungen der Area Striata im Tierexperiment. In: H. A. F. Schulze „Zerebrovasculäre Insuffizienz“. VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1974.
3. Franke M.: Senile Drusen und alterndes Gehirn. Vortrag 4. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR. 10—12. X.1974. Mühlhausen-Pfafferode.
4. Frotscher M.: Zur Entwicklung und Regeneration zentraler Neurone im Cortex cerebri bei Rattus norvegicus B. Diss. Berlin, 1974.
5. Schulze H. A. F.: Die Notwendigkeit einer topistischen Aphasieforschung und die Abhängigkeit der Rechenstörungen vom prämorbidem Rechentyp. Psychiat. Neurol. med. Psychol. 1959, 11, 50—57.
6. Schulze H.A.F.: Über die Zuordnung experimenteller und klinischer Befunde zu rindenarchitektonischen Einheiten. Psychiat. Neurol. med. Psychol. 1960, 12, 297—305.
7. Schulze H. A. F.: Klinische und hirnarchitektonische Gesichtspunkte zur Frage der Hemisphärendominanz.. Zbl. Neurochir. 1962, 22, 234—245.
8. Schulze H. A. F.: Die Bedeutung der klinischen Neuroanatomie als eigene Arbeitsrichtung. Dtsch. Ges. Wes. 1960, 15, 1359—2364.
9. Schulze H. A. F.: Quantitative Untersuchungen zur Frage der individuellen Variation und der Hemisphärendifferenzen der corticalen Areale des unteren Parietallappchens. J. f. Hirnforsch. 1962, 5, 345—376.
10. Schulze H. A. F.: Von der topistischen Hirnforschung zur dynamischen Lokalisationslehre. Psychiat. Neurol. med. Psychol. 1971, 23, 4—7.
11. Tennstedt W., Poppe W. Biometrische Untersuchungen bei Hirnatrophien. Vortrag 4 Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR, 10—12.X.74, Mühlhausen-Pfafferode.

12. Vogt O.: Die Topistik des Nervensystems und ihre klinische Bedeutung. Verh. d. Schwed. Ges. d. Ärzte, 1921.
13. Vogt C. u. O.: Erkrankungen der Grosshirnrinde im Lichte der Topistik, Pathoklise und Phatarchitektur. J. f. Psychol. u. Neurol. 1922, 28, 1—171.
14. Vogt C. u. O.: Sitz und Wesen der Krankheiten im Lichte der topistischen Hirnforschung und des Variierens der Tiere. J. f. Psychol. un. Neurol. 1936, 47, 237—457 u. 1938, 48, 169—324.
15. Winkelmann E.: Zur funktionellen Morphologie von Neuronen des visuellen Systems in tierexperimentellen Untersuchungen. In: H. A. F. Schulze. „Zerebrovasculäre Insuffizienz“, VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1974.

Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. sc. med. Heinz Schulze. Nervenklinik, Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin. DDR-104 Berlin, Schumannstr. 20—21.

W. MÜLLER

UNTERSUCHUNGEN ZUR STRAHLENSCHÄDIGUNG DES ZENTRALNERVENSYSTEMS

Pathologisches Institut der Universität zu Köln
Direktor: Prof. Dr R. Fischer

Die Strahlenschäden des Gehirns sind vielfach untersucht worden. Sie stellen ein Muster der verschiedensten histologischen Manifestationen dar (Rubinstein 1972). Am Parenchym finden sich neben Entmarkungsherden und Nekrosen mit oder ohne Verkalkungen ausgeprägte rosenkranzartige Axonschwellungen als Ausdruck degenerativer Veränderungen. Im Folgenden wird an Hand von 3 Fällen über derartige Axonschwellungen sowie Verkalkungsareale in Nekrosen berichtet.

Bei 2 Fällen handelt es sich um ein nicht operiertes jeweils links bzw. rechts frontales Glioblastom. In einem Fall wurden 5800 r HD, im anderen 7700 r HD verabfolgt. Im ersten Fall war der Tod zwei Monate, im zweiten drei Monate nach der letzten Bestrahlungsserie eingetreten. In beiden Fällen fanden sich neben Tumorresten ausgedehnte Nekroseherde, die z.T. sehr reichlich mit Kalk durchsetzt waren. Ausserdem bestanden mottenfrassartige Entmarkungsherde mit kleineren Nekrosen. Im 3. Fall war die hintere Schädelgrube nach Teilentfernung eines Medulloblastoms mit 8000 r bestrahlt worden. Die Patientin verstarb 2 Monate nach der letzten Strahlenapplikation. Im Bereich des Grosshirns fanden sich in den basalen Anteilen beider Temporallappen sowie frontobasal mit kleineren Nekrosen durchsetzte Entmarkungsherde.

Bereits in der HE-Färbung fallen meist subcortical bzw. in der Balkenstrahlung gelegene Axonaufreibungen auf, die z.T. kometenförmig, keulenartig oder kugelförmig erscheinen. Bei entsprechender Schnitorientierung sind ausgeprägt rosenkranzartige Axonanteile festzustellen. In der Markscheidenfärbung ergibt sich, dass diese Aufreibungen nur noch teilweise mit einem Markmantel umhüllt sind. Bei der Luxolfärbung treten in diesen geschwollenen Axonanteilen häufig blaue Partikel in Erscheinung, die mit Säurefuchsin-haltigen Farbgemischen, wie etwa bei den Färbungen nach Masson oder Pasini, intensiv rot tingiert sind. Elektronenmikroskopisch* erweisen sich diese Gebilde als geschwollene, überwiegend er-

* Herrn Prof. Dr. H. E. Schaefer (Path. Inst. Köln) danken wir für die elektronenmikroskopische Untersuchung.

heftig geschädigte Mitochondrien. Der Lipidnachweis am Paraffinschnitt erbrachte sogutwie keine Anfärbung; die zur Orientierung für den Nachweis von Proteinen ausgeführte Amido-Schwarz-Färbung und Millon-Reaktion liessen auf einen nur geringen Anteil an Proteinen schliessen. Besonders evident hingegen sind diese Areale mit der PAS-Reaktion darzustellen. Die veränderten Axonabschnitte liegen meist palisadenartig angehäuft als bandartige Figuren in den Läsionen. Der starke Ausfall der PAS-Reaktion deutet auf einen hohen Gehalt an Mucopolysacchariden. Zur weiteren Charakterisierung diente eine Reihe von histochemischen Methoden, deren Ergebnis in Tabelle 1 zusammengefasst ist. Daraus geht hervor, dass die hier vorliegenden Kohlenhydrate einen reichlichen Anteil an sauren Mucopolysacchariden enthalten. In der Fluorochromierung mit Flavophosphin pH 1,5 nach Modis und Batschwarowa (1969) erscheinen die betroffenen Gebiete leuchtend gelblich angefärbt. Auch dieser Test spricht für das Vorliegen saurer Mucopolysaccharide. Bei Toluidinblaufärbung zeigt sich eine deutliche Metachromasie, die nach Einwirkung von Hyaluronidase fast völlig verschwindet. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die Axonschwellungen überwiegend aus Kohlenhydraten aufgebaut sind, an deren Zusammensetzung saure Mucopolysaccharide beteiligt sind.

Auch in den kalkhaltigen Nekrosen ergeben die Methoden zum Nachweis saurer Mucopolysaccharide einen deutlichen positiven Ausfall (s. Tab. 1). Die bereits in der HE-Färbung schwarzblau tingierten Kalkkugeln sind mit Alcianblau deutlich angefärbt. Neben kugelförmigen trifft man auch noch entsprechend gefärbte längliche Gebilde an. In den Randgebieten dieser Nekrosen sind neben den Kalkeinlagerungen in unterschiedlicher Menge Makrophagen vorhanden, die in ihrem Cytoplasma Einschlüsse aus sauren Mucopolysacchariden enthalten.

Bei Anwendung der Kossa-Reaktion zum Nachweis verkalkter Gewebsanteile erscheinen jedoch nicht nur die eindeutig verkalkten Nekrosegebiete, sondern auch die geschwollenen Axone positiv. Da die Reaktion nach Kossa kein Calciumnachweis im strengen Sinne ist, sondern lediglich das Vorliegen gehäufte Phosphatgruppen anzeigt, wandten wir noch den Calciumnachweis von Voigt (1957) mit Naphthalhydroxamsäure an. Bei dieser Reaktion weisen calciumhaltige Gewebsanteile kleine gelb bis braun gefärbte Kristalle auf, die im polarisierten Licht hell aufleuchten. Mit dieser Methode wird aber auch deutlich, dass sich Calcium nicht nur an den Axonschwellungen selbst, sondern auch in der unmittelbaren Umgebung nachweisen lässt.

Verkalkung und Eisenhaltigkeit des Gewebes gehen häufig bekanntlich Hand in Hand. Vielfach stellt das Eisen den Vorläufer für eine Verkalkung dar. Infolgedessen versuchten wir auch bei unseren Objekten Eisen nachzuweisen. Sowohl die aufgetriebenen Axonanteile als auch feinere Axonabschnitte sind mit der Turnbullblau-Methode deutlich positiv. In der verkalkten Arealen zeigt sich der gleiche Ausfall, neben den Kalkkugeln sind auch die länglichen Gebilde eisenpositiv. Die

Tabelle 1. Ergebnisse der färberischen und histochemischen Untersuchungen an Axonschwellungen und Konkrementen in Nekrosen nach Röntgenbestrahlung. Sofern im Text keine besonderen Hinweise angegeben werden, wurden die Methoden nach Romeis (1948) und Pearse (1960) angewandt

Tabela 1. Wyniki reakcji barwnych i odczynów histochemicznych obrzmię aksonalnych i złogów w martwicach po napromienianiu promieniami rtg. O ile w tekście nie podano specjalnych wskazań, zastosowano metodykę wg Romeisa (1948) i Pearse'a (1960)

Methoden- Odczyn	Axonschwellungen Obrzmięcia aksonów	Kalkkonkremente Złogi wapnia
Haemalaun	+	+
hematoksylina		
PAS-Reaktion		
Reakcja PAS	+	+
Diastase-PAS		
Diastaza-PAS	+	+
Sudan schwarz B		
Sudan czarny B	∅	∅
Amido-Schwarz		
Czerń amidowa	(+)	(+)
Millon		
Reakcja Millona	(+)	(+)
Alcianblau		
Błękit alcjanyowy	+	+
Hale		
Reakcja wg Hale	+	+
Toluidinblau-Metachromasie		
Bł. toluidyny-metachromazja	+	+
Hyaluronidase-Toluidinblau-Metachromasie		
Hialuronidaza-Bł. toluidyny-metachromazja	∅—(+)	∅—(+)
Flavophosphin pH 1,5		
Flawofosfina pH 1,5	+	+
Kossa-Reaktion		
Reakcja Kossa	+	+
Naphtalhydroxamsäure		
Kwas naftalo-hydroksamowy	+	+
Eisen-Nachweis (Turnbull-Blau)		
Błękit Turnbulla (na żelazo)	+	+

Makrophagen in diesen Bezirken enthalten wie beim Nachweis für saure Mucopolysaccharide ebenfalls eisenhaltige Einschlüsse.

Auf die hier beschriebenen Veränderungen, nämlich verkalkte Axone und Axonkugeln nach Röntgenstrahleneinwirkung, wurde bereits von verschiedenen Autoren hingewiesen. Schlote (1961) brachte dieses Phänomen ursächlich mit einer Inhibition des Inhaltes der Auftreibungen mit Bestandteilen einer eiweißreichen Exsudat-

flüssigkeit in Verbindung. Nach den soeben vorgelegten Untersuchungen ist der Mechanismus der Verkalkung jedoch auf andere Weise zu erklären.

Er entspricht wie bei jeder ortho-oder pathologischen Verkalkung dem Prinzip der Calciumbindung an eine Matrix aus sauren Mucopolysacchariden (Lit.s.Graumann 1974, Schiffer und Fabiani 1970). Erst deren Eigenschaft als Kationenaustauscher ermöglicht die Eisenaufnahme und Mineralisation der degenerativ veränderten Axone. Da wir in den verkalkten Nekrosegebieten alle Übergänge von noch relativ unversehrt als Umriss erscheinenden Axonen bis zu den massenhaft vorhandenen kugelförmigen Konkrementen erkennen können, möchten wir annehmen, dass zumindest zu einem nicht unerheblichen Anteil diese Konkremente Reste zerfallener Axone darstellen.

Ungeklärt freilich muss vorerst die Frage nach der Herkunft der sauren Mucopolysaccharide bleiben. Es ist unwahrscheinlich, dass die zugrundegehenden Markscheiden als Quelle in Frage kommen. Die intakte Markscheide enthält offenbar nach biochemischen Analysen keine sauren Mucopolysaccharide. Das Axon selbst kommt als Lieferant ebensowenig in Verdacht. Am wahrscheinlichsten ist noch die Annahme, dass an das markscheidenfreie, gewissermassen nackte Axon vermehrt saure Mucopolysaccharide gebunden werden, die aus den extrazellulären Spalträumen stammen (Margolis 1967), wo ihnen als Glykokalix aufgrund ihrer physiko-chemischen Eigenschaften eine wesentliche Rolle bei der Elektrolytverteilung zukommt (s. Bennet 1969).

W. Müller

BADANIE USZKODZEŃ POPROMIENNYCH OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Streszczenie

W martwicach po napromienianiu promieniami rtg, charakteryzujących się obecnością wapnia i zmian aksonalnych, ujawniono obfite złogi kwaśnych mukopolisacharydów. Związkiem tym przypada prawdopodobnie w omawianym procesie patologicznym funkcja podłoża wiążącego wapń.

В. Мюллер

ИССЛЕДОВАНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ

Резюме

После облучения рентгеновскими лучами в некрозах, характеризующихся присутствием кальция и аксональными изменениями, были обнаружены обильные залежи кислых мукополисахаридов. Эти соединения выполняют, по-видимому, в обсуждаемом процессе функцию связывания кальция.

LITERATUR

1. Bennett H. St.: The cell surface: components and configurations. In: *Handb. of Molecular Cytology*, North Holland Publ. Comp. Amsterdam-London 1969, pp. 1261—1293.
2. Graumann W.: Polysaccharide. In: *Handb. d. Histochemie*, Bd. II/2- Gustav Fischer Verlag: Stuttgart 1964.
3. Margolis R. U.: Acid Mucopolysaccharides and Proteins of Bovine whole Brain, White Matter and Myelin. *Biochim. Biophys. Acta* 1967, 141, 91—101.
4. Modis L. and Batschwarowa M.: Fluorescence histochemical investigations of connective tissue. *Acta Morph. Acad. Hung.* 1969, 17, 235—240.
5. Rubinstein L. J.: *Tumors of the Central Nervous System*. AFIP 1972.
6. Schiffer D., Fabiani A.: *Patologia dei Tumori Cerebrali*. Il pensiero scientifico ed.: Roma 1970.
7. Schlote W.: Morphologische und histochemische Untersuchungen an retrograden Axonveränderungen im Zentralnervensystem. *Acta Neuropath.* 1961, 1, 135—158.
8. Voigt G. T.: Ein neuer histotopochemischer Nachweis des Calciums (mit Naphtalhydroxamsäure). *Acta histochem.* 1957, 4, 122—133.
9. Pearse A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. Little, Brown and Co., Boston 1953.
10. Romeis B.: *Mikroskopische Technik*. Leibniz Verlag, München 1948.

Anschrift d. Verfassers: Prof. Dr. Dr. W. Müller, Patholog. Institut d. Univ. D-5 Köln 41 Jos.-Stelzmann Str. 9.

E. KLAGGE

PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN BEI ELEKTRISCHER VERLETZUNG
DES NERVENSYSTEMS

Nervenklinik der Medizinischen Akademie, Erfurt, DDR
Direktor: Prof. Dr. R. Heidrich

Grundlage für die Aufklärung der Wirkungsweise des elektrischen Stromes bei Elektrounfällen und speziell für die damit verbundene elektrische Verletzung des Nervensystems muss eine Anordnung darstellen, die es gestattet, die in der Praxis bei Elektrounfällen des Menschen auftretenden Grössen, den Strom und die Spannung sowie die Einwirkungsdauer eindeutig nachzubilden. In unseren Untersuchungen und Tierexperimenten zur Applikation elektrischer Reizspannung bzw. Reizströme haben wir eine solche Anordnung zugrunde gelegt.

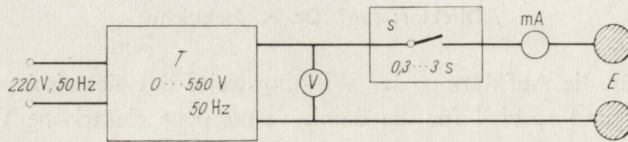
Man kann bei elektrischen Unfällen grundsätzlich zwei verursachende Stromarten unterscheiden: 1) Gleichstrom bzw. Gleichspannung und 2) Wechselstrom bzw. Wechselfpannung. Gleichstrom wird dadurch gekennzeichnet, dass die Stromrichtung stets die gleiche ist; sie hat eine positive und eine negative Polarität, die sich nicht umkehrt oder verändert. Wechselstrom hat die Eigenschaft, dass er seine Grösse und Richtung periodisch und meist sinusförmig ändert. Die Anzahl der in einer Sekunde ausgeführten Schwingungen stellt die Frequenz dar und wird in Hz angegeben. In der Elektrotechnik und Elektronik findet man heute elektrische Ströme bzw. Spannungen mit einer breiten Frequenzpalette. Der Frequenzbereich, den wir heute in der Technik antreffen, reicht von Bruchteilen eines Hz über niederfrequente Schwingungen und hochfrequente Schwingungen (kHz- und MHz-Bereich) bis zu höchstfrequenten Schwingungen mit ca. 1000 Mio. Schwingungen in der Sekunde, also 1000 MHz, das sind sogenannte Mikrowellen.

Hinsichtlich der Spannungshöhe kann man die in der Technik gebräuchlichen Starkstromanlagen einteilen in solche mit Niederspannungen bis 1 kV, Mittelspannungen bis 50 kV und Hochspannungen bis 750 kV. Im internationalen Verbundnetz der RGW-Länder zum Beispiel werden Spannungen verwendet von 220 kV (Polen, DDR, CSSR) und 380 kV (Sowjetunion, Ungarn). Darüber hinaus findet man Spannungen von 750 kV zum Beispiel in der Sowjetunion, in Kanada und Schweden, meist für Fernleitungen mit über 1000 km Reichweite.

Wir haben uns bei unseren Versuchen auf die gebräuchlichsten Spannungen

orientiert, und zwar auf den technischen Wechselstrom, vorwiegend im Bereich um 220 V/50 Hz, weil erfahrungsgemäss an derartigen Anlagen die häufigsten Unfälle zu verzeichnen sind. Nun kann ein Elektrounfall nur dann auftreten, wenn 2 Punkte berührt werden, zwischen denen eine elektrische Spannung besteht. Wir haben die beiden spannungsführenden Punkte in unseren Experimenten so nachgebildet, dass wir an den Extremitäten des Versuchstieres in verschiedenen Kombinationen Reizelektroden angelegt und dann einen Stromstoss appliziert haben. Mit dieser Anordnung sind Verhältnisse geschaffen, die eine praxisnahe Beziehung aufweisen, denn man ist damit in der Lage, Elektrounfälle beim Menschen auf das verwendete Analogiemodell zurückzuführen.

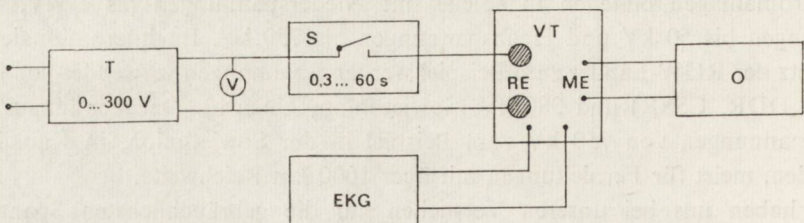
In einer ersten experimentellen Studie haben wir dazu folgendes Schaltschema zugrunde gelegt (Abb. 1).



Der elektrische Reizstromkreis besteht aus einem Trennregeltransformator, der die Einstellung der Reizspannungen in einem Bereich von 0 ... 400 V gestattete, den Messinstrumenten für die Reizspannung (V), und den Reizstrom (mA) und einem Zeitschalter (S). Die Versuchstiere bildeten den Abschluss der elektrischen Reizeinrichtung an der Stelle E. Hier befinden sich 2 Metallbecher von ca. 10 cm Tiefe, die mit wässriger NaCl-Lösung gefüllt waren und in die 2 Extremitäten des Tieres eingetaucht wurden. Damit bildeten die Versuchstiere einen Teil des elektrischen Stromkreises; das biologische Objekt stellt also für den Stromfluss eine besondere Art von Elektrolyt dar.

Nach Einstellung der Reizspannung konnte der Stromkreis über die Zeitschaltuhr geschlossen werden. Die Vorwahl der Stromflusszeiten war möglich zwischen 0,3 und 30 sec. Der Stromfluss bzw. die Stromstärke war an einem Milliampere-meter ablesbar. Unmittelbar vor der Verletzung wurde mit einer Messbrücke der elektrische Widerstand des Stromkreises ermittelt, um einen Anhaltspunkt über die Grösse der Übergangswiderstände und Gewebswiderstände zu besitzen.

Eine weitere Aufgabenstellung stand im Zusammenhang mit der Einschätzung der bei Elektrounfällen zerebral auftretenden Spannungen bzw. Ströme. Dazu haben wir in einer anschliessenden Versuchsserie den Messplatz zur Reizung und Registrierung der applizierten Grössen erweitert und modifiziert (Abb. 2).



Die Versuchstiere (VT) wurden an 2 getrennte Stromkreise, den Reizstromkreis und den Messstromkreis angeschlossen. Der Reizstromkreis bestand aus einem Spannungsregler (T), der eine Einstellung der Spannung von 0... 300 V/50 Hz gestattete, einem Spannungsmesser (V) zur direkten Ablesung der eingestellten Reizspannung, einem Zeitschalter (S), an dem die Einwirkungszeit der Reizspannung eingestellt wurde, — also die Reizdauer-, und schliesslich noch im Reizstromkreis die Reizelektroden (RE), die je nach Applikation ausgebildet waren entweder als Flachelektroden zur zentralen Reizung oder als 2 mit NaCl-Lösung gefüllte Metallbecher für periphere Reizung. Diese Metallbecher wurden dann an die jeweils verwendeten Extremitäten des Tieres angeschlossen. Der Messkreis bestand aus einem Oszillographen (O) und den zugehörigen Messelektroden (ME). Zusätzlich zum Versuchsaufbau wurde während der Versuchsdauer laufend das EKG mitgeschrieben und kontrolliert.

Um die Wertigkeit der Einflussparameter zu bestimmen, wurden in dem Versuchszyklus sowohl die Reizdauer als auch die Reizspannung in weiten Grenzen verändert; die Reizdauer von 300 msec. bis 60 sec., die Reizspannung von 30 bis 300 V. Der Vorteil der verwendeten Anordnung besteht in der trägheitslosen, sofortigen oszillographischen Spannungsmessung.

Ehe nun im folgenden auf die klinischen und pathologischen Ergebnisse und Aspekte eingegangen wird, möchte ich die elektrophysikalischen Gesichtspunkte kurz zusammenfassen: Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, zur Aufklärung der intrazerebralen Veränderungen beizutragen, die bei Elektrounfällen auftreten. Die durchgeführten Studien bezogen sich vorwiegend auf den Fall, dass eine Berührung der Extremitäten mit spannungsführenden Teilen vorliegt. Es wurden verschiedene Berührungsvarianten zwischen Vorder- und Hinterextremitäten mit einer entsprechenden Anzahl von Reizspannungsstössen durchgemessen. Der intrazerebral angeschlossene Messkreis lieferte die Bestätigung, dass ein Teil der angelegten Reizspannung im Gehirn vorhanden ist und sich somit ein dem Gewebswiderstand entsprechender Strom einstellt. Generell konnte festgestellt werden, dass die zerebral gemessenen Spannungen jeweils etwa einige Prozent der an den Extremitäten angelegten Reizspannungen betragen, wobei allgemein ein Messelektroden-abstand von 2 cm zugrunde gelegt wurde.

Durch Vergleiche zwischen zerebralem und peripherem Verletzungstyp konnten wir ebenfalls bestätigen, dass die geometrischen Lageverhältnisse zwischen den Reizpunkten und den Messtellen eindeutig auf das sich einstellende Spannungsgefälle abgebildet wurden.

E. Klagge

FIZYCZNE PODSTAWY USZKODZENIA UKŁADU NERWOWEGO PRĄDEM
ELEKTRYCZNYM

Streszczenie

Na modelu naśladowującym warunki występujące w patologii ludzkiej próbowano wyjaśnić mechanizm powstawania uszkodzeń mózgu w przypadku urazów elektrycznych. Wykazano, że poziom napięcia w mózgu stanowi kilka procent napięcia przyłożonego obwodowo, przy czym geometryczna zależność pomiędzy miejscem działania prądu i miejscem pomiaru wskazuje jednoznacznie na uwarunkowanie zmian.

E. Клягге

ФИЗИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ
ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ТОКОМ

Резюме

На модели, имитирующей условия при человеческой патологии, была сделана попытка выяснить механизм возникновения повреждений при электрических травмах. Было обнаружено, что уровень напряжения в мозге составляет несколько процентов от напряжения, приложенного периферически, причем, геометрическая зависимость между местом воздействия тока и местом измерения однозначно указывает на способ формирования этих изменений.

LITERATUR

1. Autorenkollektiv: Physik — Fundament der Technik. Fachbuchverlag, Leipzig, 1973.
2. Osypka P.: Messtechnische Untersuchungen über Stromstärke, Einwirkungsdauer und Stromweg bei elektrischen Wechselstromunfällen an Mensch und Tier. Braunschweig. Diss. 1963.
3. Reinhardt R.: Die Elektrotechnik. Fachbuchverlag, Leipzig, 1954.

Anschriфт der Verfasser: Dr.-Ing. Eckehart Klagge, Nervenlinik der Medizinischen Akademie Erfurt, DDR — 50 Erfurt, Nordhäuserstr. 74.

R. HEIDRICH

AUSWIRKUNGEN DES ELEKTRISCHEN STROMES
AUF DAS NERVENSYSTEM

Nervenklinik der Medizinischen Akademie, Erfurt, DDR

Direktor: Prof. Dr. R. Heidrich

Die möglichen Auswirkungen des elektrischen Stromes auf das zentrale und periphere Nervensystem sind sehr vielfältig. Sie reichen von relativ schnell sich zurückbildenden peripheren Schädigungen einzelner Nerven (meist im Bereich der Verletzung als Neuralgien), von ebenso rasch abklingenden Störungen des Rückenmarkes, von chronischen spinalatrophischen Bildern, von epileptischen Anfällen über Hirnblutungen sowohl extra — als auch intrazerebraler Lokalisation bis hin zu schwersten Verschorfungen der Kalotte und des Gehirns. Über solche Schädigungen nach Blitzschlag wie auch technischer Elektrizität liegt seit Jahrzehnten ein nicht mehr überschaubares Schrifttum vor, wobei einer Reihe von Publikationen nur noch historischer Wert beigemessen werden kann, weil den meisten Arbeiten aus früherer Zeit die heute zu fordernden physikalischen Daten fehlen.

Die eigenen Untersuchungen zu dieser Problematik waren von Anfang an eingeschränkt auf die Frage, ob auch der nur peripher angreifende elektrische Strom im Gehirn Schädigungen verursachen kann und ob im Gehirn dabei Spannungen gemessen werden können.

Wir hatten 1951 einen 25 jährigen Kranführer zu begutachten, der über beide Hände durch ein defektes Kabel mit einem Drehstrom von 380 V in Berührung gekommen war. Es hatte sich eine sofortige Lähmung der linken Körperhälfte eingestellt. Anschliessend wurde er für kürzere Zeit bewußtlos. Die schlaffe Lähmung hatte sich nach 3 Wochen zurückgebildet. Im Pneumenzephalogram zeigte sich ein Hydrocephalus internus mittleren Grades der bei einer Nachbegutachtung 6 Jahre später in Form und Ausprägung unverändert geblieben war.

Bis 1956 konnten wir 10 Patienten, die ein Elektrotrauma erlitten hatten, untersuchen. Einige davon wiesen auch einen Hydrocephalus internus auf.

Für uns stellte sich nun die Frage, wie es zu dieser Hirnkammererweiterung gekommen war. Immerhin hätten diese Erweiterungen auch schon vor dem Elektrotrauma bestanden haben können. Wir begannen mit einer Reihe von Tierversuchen. Es wurden Katzen mit einem üblichen Wechselstrom von 220 V und 0,3 A verletzt.

Einige der verletzten Tiere zeigten nach dem Elektrotrauma eine Erweiterung der Seitenventrikel. Das war aber auch der Fall bei einigen Kontrolltieren, die parallel zur verletzten Serie mituntersucht wurden. Es wurde deshalb der Seitenventrikel-Inhalt von 30 ausgewachsenen Katzen auf bestimmte Weise errechnet. Dieser Seitenventrikel-Inhalt wurde mit dem von 48 verletzten Katzen verglichen. Letztere zeigten eine deutliche Erweiterung über den Mittelwert der unverletzten Katzen hinaus, was statistisch abgesichert werden konnte. Diese Erweiterungen waren etwa 20 Tage nach der Verletzung zu beobachten. Um weitere Einblicke in die Pathogenese der Wirkung des elektrischen Stromes auf das Gehirn zu gewinnen, wurden Hunde so operiert, daß das meningeale Gefäßsystem sichtbar blieb. Wurde nun der elektrische Strom bei bitemporaler Lage der Elektroden durch das Gehirn geleitet, zeigte sich bei einer Reihe der Versuchshunde eine allgemeine Abblassung der Hirnoberfläche. Das trat auch ein, wenn der elektrische Strom zwischen beiden vorderen Extremitäten bzw. zwischen hinteren und vorderen Extremitäten floß.

Um schließlich herauszufinden, ob bei diesen Versuchen im Gehirn Spannungen zu messen sind, wurden nun Meßelektroden bei den operierten Hunden intrazerebral gesetzt. Tatsächlich konnten nun bei allen Variationen des Stromflusses (bitemporaler Stromfluß, Stromfluß zwischen vorderen und hinteren Extremitäten etc.) stets in beiden Hirnhälften Spannungen von etwa 1—6 V abgenommen werden bei Reizspannungen von 100—300 V.

Damit ist bewiesen, daß in dem applizierten Reizspannungsbereich stets intrazerebral entsprechende elektrische Spannungen gemessen werden können. Hirnkammererweiterungen und auch die möglichen Liquorveränderungen im Sinne von Albuminerhöhungen, die wir ebenso beobachten konnten, dürften auf Gefäßschädigungen durch den elektrischen Strom mit Ausbildung eines mehr oder minder starken Hirnödems zu erklären sein.

R. Heidrich

DZIAŁANIE PRĄDU ELEKTRYCZNEGO NA UKŁAD NERWOWY

Streszczenie

Autor przedstawia problem uszkodzeń mózgu spowodowanych obwodowym działaniem prądu elektrycznego. W oparciu o wyniki własnych obserwacji sugeruje, że wodogłowie wewnętrzne, obserwowane u ludzi i zwierząt doświadczalnych rażonych prądem elektrycznym, jest spowodowane uszkodzeniem naczyń i obrzękiem mózgu.

Po obwodowym zadziałaniu bodźca elektrycznego występuje przepływ prądu przez półkule mózgu, który można oznaczyć u zwierząt doświadczalnych umieszczając elektrody bezpośrednio w tkance.

Р. Хайдрих

ДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ТОКА НА НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

Резюме

Автор представляет проблему повреждений мозга, вызванных периферическим воздействием электрического тока. Основываясь на результатах собственных наблюдений автор приходит к выводу, что внутренняя водянка, наблюдающаяся у людей и животных, подверженных воздействию электрического тока, вызвана повреждением сосудов и отеком мозга. Прохождение тока через полушария у животных, подвергнутых периферическому воздействию тока, обнаруживается с помощью электродов, помещенных непосредственно в мозг.

LITERATUR

1. Heidrich, R.: Schädigung des Nervensystems durch Elektrizität. Dtsch. Ges. Wesen 1954, 7, 206.
2. Heidrich, R.: Elektrotraumatischer Hydrocephalus. Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.) 1954, 6, 93.
3. Heidrich, R.: Experimentelles zum elektrotraumatischen Hydrocephalus. Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.) 1955, 7, 239
4. Heidrich, R.: Hydrocephalus nach Elektrotrauma. Elektromedizin 1959, 4, 104.
5. Heidrich, R.; Klagge, E; Koch, K.; Leder, H.: Einwirkungen elektrischer Reizspannungen auf das Gehirn. Eine Tierexperimentelle Studie. Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.) 1973, 25, 712—725.

Anschrift des Verfassers: Prof. Dr. R. Heidrich. Nervenlinik der Medizinischen Akademie, 50 Erfurt, DDR, Nordhäuser Strasse 74.

R. KÜSTNER

NEUROPATHOLOGISCHE BEFUNDE NACH ELEKTROTRAUMEN BEI HUNDEN

Nervenklinik der Medizinischen Akademie, Erfurt, DDR
Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Heidrich

Die Intensität und Beurteilung neuropathologischer Veränderungen nach Einwirken von elektrischem Strom auf das Nervensystem wird auffallend unterschiedlich in der Literatur beschrieben. Da verschiedene Parameter sicherlich Auswirkungen auf Art, Ausgestaltung und Ausmass der morphologischen Veränderungen haben, sind die von verschiedenen Untersuchern erhobenen Befunde nicht immer prinzipiell vergleichbar. Die wesentlichsten einflussnehmenden Faktoren sind die Grösse der elektrischen Energie, die Dauer der Einwirkung, die Häufigkeit der Einwirkung, der zeitliche Abstand zwischen Stromeinwirkung und Tod bzw. Untersuchung, der zeitliche Abstand bei mehrfachen Stromeinwirkungen, die Art der Stromeinwirkung (zentrale oder periphere Verletzung) sowie zusätzliche Faktoren (Hitzeinwirkung bei Verbrennung, zusätzliche Traumen, Störungen von Atmung und Kreislauf).

In Zusammenhang mit sofort oder sehr bald eingetretenem Tod nach Elektrotraumen werden Gewebskontinuitätstrennung, kleinere und grössere Blutungen in die Hirnhäute, in das Hirngewebe und um die Gefässe, Gefässveränderungen und -zerreissungen, Ödem des Hirngewebes sowie Nervenzellveränderungen und gliöse Reaktionen beschrieben (Koeppen und Panse 1955).

Bei peripherer Zufuhr des elektrischen Stromes sind Veränderungen noch umstritten (Alexander 1942).

Hartelius (1953) fand an mit Elektrokrämpfen behandelten Katzen reversible Veränderungen mit Erweiterung der perivaskulären Räume, Gliavermehrung und Nervenzellveränderungen sowie irreversible Schäden in Form von Schwundzellen, Neuronophagien und gefässbedingten ischämischen Vorgängen.

Rowland et al. (1960) fanden bei experimentell erzeugten Hirnschädigungen an Katzen, dass die Schwelle für morphologisch fassbare Veränderungen schätzungsweise hundertmal höher liegt als die physiologische Reizschwelle. Incze (1936) untersuchte Ratten- und Kaninchengehirne bei verschiedenen Spannungen und Stromdurchflusszeiten. Histologisch fand er Blutungen und Veränderungen der

Gefäßwand und Gliazellen. Die kürzeste Zeit, bei der es nach Stromdurchfluss zu histologischen Veränderungen kam, betrug 7 Sekunden, bei noch kürzerer Durchströmung konnte er keine morphologischen Veränderungen feststellen.

Die von uns morphologisch untersuchten Gehirne von Hunden stammen aus der Versuchsserie von Heidrich et al. (1973). Die Hunde wurden in Narkose und Relaxation verschiedenen Elektrotraumen ausgesetzt. Da die Versuchstiere sofort nach Versuchsende getötet wurden, sind morphologisch nur die akuten Veränderungen nach elektrischer Stromeinwirkung zu erwarten gewesen. Den Untersuchungen liegen die Auswertungen von 12 Gehirnen zu Grunde. Bezüglich der Versuchsanordnung verweise ich auf die Arbeit von Klagge (1975) an gleicher Stelle. Die Gehirne wurden in üblicher Weise in Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und Färbungen nach Nissl, van Gieson, Goldner, Azan und Haematoxylin-Eosin angefertigt.

Bei den peripher mit 50 bis 300 Volt Wechselstrom verletzten 7 Tieren wurden im Gehirn Spannungen von 0,5 bis 6 V gemessen. Bei den transzerebral mit 50 bis 300 Volt Wechselstrom verletzten 5 Tieren wurden im Gehirn 5 bis 90 V gemessen. Die Stromdurchflusszeiten und die Zahl der Reizungen waren unterschiedlich (Tabelle 1 und 2).

Tabelle 1. Periphere Reizung

Tabela 1. Drażnienie obwodowe

Hund Pies	N	t	U ₁ V	U ₂ V
1	6	0,6 ... 10	100	2
2	10	0,6 ... 5	100 ... 300	—
3	10	0,3	100 ... 200	0,5 ... 6
4	9	0,3	100 ... 200	0,5 ... 6
5	9	0,3	100 ... 300	0,5 ... 6
6	5	0,6	50 ... 300	1,0 ... 3
7	5	0,6	100 ... 300	—

Zeichenerklärung: N = Anzahl der Versuche

t = Stromdurchflußzeit in Sekunden

U₁ = Angelegte Reizspannung in Volt

U₂ = Intrazerebral gemessene Spannung in Volt

Oznaczenia: N = liczba doświadczeń

t = czas przepływu prądu w sekundach

U₁ = zastosowane napięcie pobudzające w Voltach

U₂ = zmierzone napięcie śródmózgowe w Voltach

Tabelle 2. Transcerebrale Reizung

Tabela 2. Drażnienie śródmózgowe

Hund Pies	N	t	U ₁ V	U ₂ V
1	9	0.6 ... 10	5 ... 300	—
2	11	0.6 ... 8	100 ... 300	6,5 ... 21
3	7	0,6 ... 3	100 ... 300	—
4	6	0.6 ... 2	50 ... 300	14,0 ... 90
5	6	0.6 ... 2	50 ... 300	5,0 ... 23

Zeichenerklärung: N = Anzahl der Versuche

t = Stromdurchflußzeit in Sekunden

U₁ = Angelegte Reizspannung in Volt

U₂ = Intrazerebral gemessene Spannung in Volt

Oznaczenia: N = liczba doświadczeń

t = czas przepływu prądu w sekundach

U₁ = zastosowane napięcie pobudzające w Voltach

U₂ = zmierzone napięcie śródmózgowe w Voltach

Morphologisch fanden wir bei den Tieren mit peripherer Verletzung im Gehirn kleine Kugelblutungen subkortikal, subependymal, im Marklager und im Hirnstamm. Auch kleinere Verletzungen des Ependyms konnten gesehen werden. Bei den transzerebral verletzten 5 Tieren konnten wir ebenfalls kleinere Blutungen im Marklager subependymal und subkortikal sehen. 3 Tiere wiesen grössere, schon makroskopisch deutlich sichtbare Blutungen im Marklager auf. Weiterhin zeigten alle 5 Tiere subarachnoideale Blutungen über einer oder beiden Grosshirnhemisphären unterschiedlichen Grades.

Die Gehirne der Kontrolltiere zeigten keine Blutungen, sondern lediglich eine etwas vermehrte Blutstauung in den Gefässen. Auffällige Gefässwandveränderungen haben wir an unseren Versuchstieren nicht beobachten können. Mit der Aussage über ein Hirnödem möchten wir sehr zurückhaltend sein. Bei mehreren Präparaten sahen wir vor allem perivaskulär gelegene Gewebsauflockerungen, die auf ein Hirnödem schliessen lassen könnten. Zur genaueren Klärung dieser Frage wäre eine elektronen-mikroskopische Untersuchung angezeit, die bei dieser Versuchsserie jedoch nicht vorgesehen war.

Da wir bei allen Tieren die Versuche in Narkose mit Relaxation durchführten und wir bei der elektrischen Reizung nur stark mitigierte oder überhaupt keine Krämpfe auftreten sahen, glauben wir nicht, dass die intrazerebralen Blutungen Folge von Blutdruckanstieg, zum Beispiel durch den Krampf, sein könnten. Die während der Versuche abgeleiteten Elektrokardiogramme zeigten in allen Fällen präfokal Herzrhythmusstörungen, meistens Herzkammerflimmern. Morphologisch fassbare Folgen davon wären aber nach den bisherigen Erfahrungen erst nach einer gewissen Überlebenszeit zu erwarten.

R. Küstner

WYNIKI BADAŃ NEUROPATHOLOGICZNYCH PO URAZACH ELEKTRYCZNYCH U PSÓW

Streszczenie

Badano zmiany morfologiczne w mózгах psów, u których wywołano uraz przez transcerebralne lub obwodowe zadziałanie prądem elektrycznym. Po obwodowym działaniu prądu stwierdzono w mózгах zwierząt krwotoczki koliste podkorowo, podwyściółkowo, w istocie białej i w pniu mózgowym. Po transcerebralnym działaniu prądu, poza krwotoczkami kolistymi, stwierdzono u wszystkich zwierząt krwotoki podpańczynówkowe, a ponadto u 3 psów większe krwotoki śród-mózgowe.

Р. Кюстнер

РЕЗУЛЬТАТЫ НЕВРОПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ ТРАВМЕ У СОБАК

Резюме

Исследовали морфологические изменения в мозге собак, которым наносили травму центральным и периферическим воздействием электрического тока. После периферического воздействия электрического тока в мозге животных были обнаружены сферические кровотоки в подкорке, субэпендиме, в белом веществе и в стволе мозга. После центрального воздействия тока кроме кровотоков у всех животных обнаруживались ещё субарахноидальные кровотечения и кроме того у 3 собак были более крупные внутримозговые кровотечения.

LITERATUR

1. Alexander L.: Electrical Injuries of the Nervous System. Arch. Neurol. Psychiatr. (Chic.) 1942, 47, 179—186.
2. Hartelius H.: Cerebral changes following electrically induced convulsions. Acta psychiat. (Dän.) Suppl. 77, Kopenhagen: Munksgaard 1953.
3. Heidrich R., Klagge E., Koch K., Leder H.: Einwirkungen elektrischer Reizspannungen auf das Gehirn. Eine tierexperimentelle Studie. Psychiat. Neurol. med. Psychol. (Lpz.) 1973, 25, 712—725.
4. Incze J.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des elektrischen Stromes auf das Gehirn. Zbl. Path. 1936, 66, 264.
5. Klagge E.: Physikalische Grundlagen bei elektrischer Verletzung des Nervensystems. Neuropat. Pol. 1975, 13.
6. Koeppen S. und Panse F.: Klinische Elektropathologie. Thieme, Stuttgart 1955.
7. Rowland V., McIntyre M. J. and Bidder T. G.: The production of brain lesion with electric currents. J. Neurosurg. (Springfield) 1960, 17, 55—69.

Anschrift des Verfassers: Dr. R. Küstner, Nervenklinik der Medizinischen Akademie, 50 Erfurt, DDR, Nordhäuser Strasse 74.

HENRYK SOWIŃSKI

HISTOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE ORGAN
AND PATHWAYS OF HEARING INDUCED BY EXPERIMENTAL
ACOUSTIC TRAUMA

Autonomus Division of Pathology of the Central Nervous System and Sensory Organs, Medical
Academy, Poznań
Head: Doc. dr M. Kozik

The harmful effect of noise on hearing has long been known. Impairment of hearing is often noted in people professionally exposed for many hours daily to industrial noise or repeated noise of explosive character. This problem is well known from the clinical point of view. But morphological and histochemical changes appearing in the hearing organ owing to acoustic trauma are little known and rarely investigated for obvious reasons (Wolff, 1942; Bredberg, 1968). Relatively few papers deal with morphological and histochemical changes appearing in the inner ear after a strong acoustic stimulus applied to animals, mostly in laboratory conditions (Hamberger, Hyden, 1945; Perlam, 1948; Conti, Borgo, 1964; Guttmacher et al., 1973). Morpho-histochemical examinations of the inner ear of animals exposed to industrial or explosive noise from firearms ear few (Hammer, 1956; Chodynicky, Finkiewicz, 1968; Poche et al., 1969).

In the available literature only a few reports were found on the subject of changes appearing in further neurons of the hearing pathway, caused by a strong acoustic stimulus (Tarmas, Horodyski, 1974).

In view of the more and more frequent exposure to acoustic trauma it seemed justified to investigate the effect of noise on the inner ear and the pathway of hearing of experimental animals.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on guinea-pigs of either sex weighing from 350—550 g with a normal Preyer's reflex. One group of animals was kept for 14 months in a factory-hall in which the white noise was 95—100 dB. The noise was continuous

with one 12-hour weekly break and it was produced by electric engines. The second group of the animals was exposed to impulse acoustic stimuli. For part of the animals of this group an acoustic stimulus about 110 dB was given at 3 sec intervals three times. The remaining animals were exposed to 120 explosive stimuli within 24 seconds of about 130 dB. The third group consisted control animals. The intensity of noise was measured by means of a Brüel and Kjaer noise level indicator.

After various periods of exposure to industrial noise or to the effect of an explosive acoustic stimulus the animals were sacrificed in shallow ether or peritoneal Sodium-Amytal anesthesia and their inner ears and brains were taken for histochemical and morphological examination. Unfixed material was taken for examination of oxidative enzymes. After fixation of the material in Baker's solution at $+4^{\circ}\text{C}$, activity of esterases and phosphatases was studied. Investigation of dehydrogenases in the cochlea included two procedures. The first consisted in incubation of the whole cochlea in the respective substrate, fixation in neutral formalin and decalcification. In the other method the cochlea was first decalcified in 10% EDTA solution (Balogh, 1962) in phosphate buffer at $+4^{\circ}\text{C}$. Polyvinylpyrrolidone (5%) was added to the decalcifying solution. After 7—8 days the decalcified cochlea was cut in a cryostat into 10-micron sections and histochemical reactions were performed for the following enzymes: succinate dehydrogenase (E.L.1.3.99.1.), lactate dehydrogenase (E.L.1.1.1.27), isocitric dehydrogenase (E.L.1.1.1.41), DPNH-dehydrogenase (E.L.1.6.99.3), alpha-glycerophosphate dehydrogenase (E.L.1.1.1.8), beta-hydroxybutyric dehydrogenase (E.L.1.1.1.30).

The slices were incubated at 37°C for 20—30 minutes with the use of basic incubation medium for dehydrogenases according to Pearse and Hess (1961) with the addition of suitable substrates. Acetylcholinesterase activity in the cochlea was investigated after Balogh and Namura (1964). The material for morphological investigations was embedded in paraffin.

The activities of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase were examined in the brain by the method of Koelle in the modification of Gerebtzoff (1953) and the activities of TPP-ase by the method of Novikoff and Goldfischer (1961), ATP-ase according to Wachstein and Meisel (1957), acid and alkaline phosphatase after Gomori (1953).

The activity of enzymes and morphological changes were estimated in the hair cells of the Corti organ, in the spiral ganglion cells, in the nuclei of the cochlear nerve, in the posterior colliculi, in the medial geniculate bodies and in the hearing area of the cerebral cortex.

RESULTS

I. The cochlea. After a 3-month exposure to noise a decreased activity of dehydrogenases in the outer hair cells was observed, but in the inner hair cells and in the spiral ganglion cells only a slight decrease in oxido-reducing enzymes activity was



Fig. 1. Succinate dehydrogenase activity in the outer and inner hair cells of the Corti organ in a control guinea-pig.

Ryc. 1. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach słuchowych zewnętrznych i wewnętrznych narządu Cortiego kontrolnej świnki morskiej.



Fig. 2. Succinate dehydrogenase activity in hair cells of Corti organ in a guinea-pig after 6-month exposure to industrial noise

Ryc. 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach słuchowych narządu Cortiego świnki morskiej po 6 miesiącach ekspozycji na hałas przemysłowy.

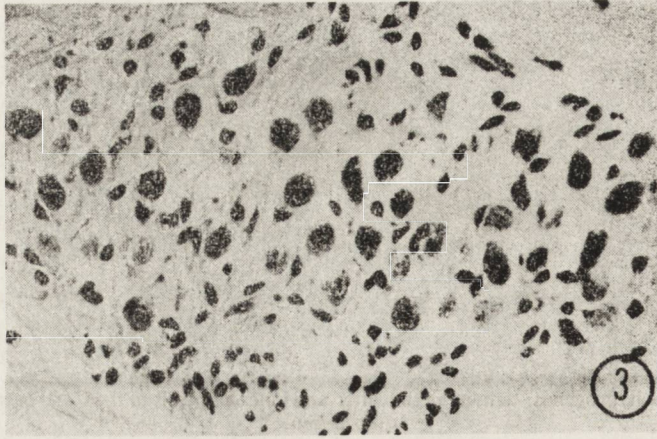


Fig. 3. Morphological changes in the spiral ganglion cells of guinea-pig after a year's stay in conditions of industrial noise. H.-E. staining.

Ryc. 3. Zmiany morfologiczne w komórkach zwoju spiralnego świnki morskiej po rocznym pobycie w warunkach hałasu przemysłowego. H.-E.

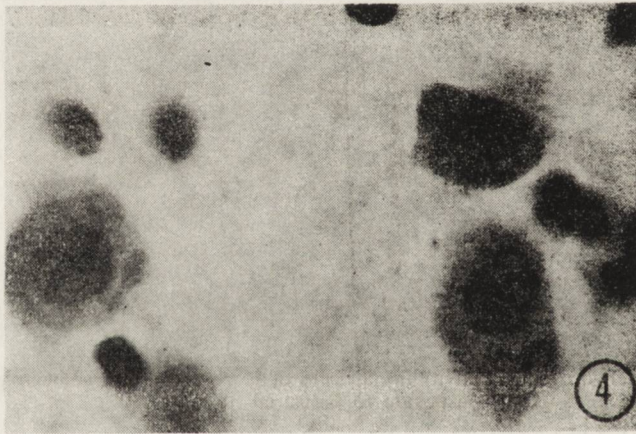


Fig. 4. Ventral cochlear nucleus cells of guinea-pig after 8-month exposure to industrial noise. H.-E. staining.

Ryc. 4. Komórki brzuszego jądra nerwu ślimakowego świnki morskiej po 8 miesiącach narażenia na hałas przemysłowy. H.-E.

found. These changes appeared in the upper part of the basis and in the second and the bottom part of the third bend of the cochlea.

After 6-month exposure the activity of dehydrogenases in the outer hair cells was considerably decreased or even completely lacking. The decrease of enzyme activity in the inner hair cells was smaller. Spiral ganglion cells showed a considerable fall in enzyme activity.

After a year or longer exposure there was a lack of activity of dehydrogenases in the outer and inner hair cells in the middle bends of the cochlea. In the bottom part of the basic and in the upper bends of the cochlea a substantial decrease of enzyme activity was observed. In these experimental conditions the majority of the spiral ganglion cells showed a decline activity of the studied dehydrogenases. Only in relatively few spiral ganglion cells was a weak diffuse reaction for respiratory enzymes observed. A relatively low sensitivity to long continued noise of DPNH-dehydrogenase was observed. The activity of this enzyme could be encountered in the structure of the inner ear even after a year's exposure of animals to industrial noise.

In animals exposed to an explosive acoustic stimulus the activity of dehydrogenases in the outer and inner hair cells and in those of the spiral ganglion a great decrease was observed after several days.

Acetylcholinesterase. A strong activity of this enzyme in the control animals appeared in the nerve endings of the outer and inner hair cells and within the spiral bundle. In the spiral ganglion cells acetylcholinesterase activity in normal conditions is very low.

After exposure of animals to industrial or explosive noise acetylcholinesterase activity continued as long as intact Deiter's cells existed — despite the damage of hair cells.

Morphological changes. The animals exposed to industrial noise showed morphological changes after about 6 months. They regarded the cell nucleus of at first the outer and afterwards the inner hair cells. The cell nuclei were swollen and stained slightly with hematoxylin. At this time small changes in the spiral ganglion cells were observed consisting in reduction of the Nissl substance. In further periods of exposure pycnosis and chromatolysis of the cell nuclei of the hair cells were observed. The most pronounced morphological changes appeared in the first internal row of outer hair cells. In the spiral ganglion cells the changes were eccentric setting of the nucleus, its hyperchromasia, pycnosis, chromatolysis and folding of nuclear membrane. Loss of numerous spiral ganglion cells was also observed.

II. Hearing pathway. Nuclei of the cochlear nerve. After the appearance of changes in the spiral ganglion cells morphological and histochemical damage in the cochlear nuclei cells were also observed, especially in the ventral cochlear nucleus. The activity of dehydrogenases in the ventral cochlear nucleus falls distinctly, but in the dorsal one only a slight decrease of enzyme activity appeared.

The activity of acetylcholinesterase and TPP-ase became weaker, but the activity of acid phosphatase in a few cells increased distinctly. This type of changes was chiefly observed in the ventral cochlear nucleus. In the dorsal one no essential differences of enzyme activity were observed between experimental and control animals. The activity of butyrylcholinesterase, of ATP-ase and of alkaline phosphatase did not change after acoustic trauma either in the dorsal or ventral cochlear nuclei.

The morphological changes appeared on the area of the ventral cochlear nucleus. In the cytoplasm of neurocytes of this nucleus vacuolization as well as diminution of Nissl substance were observed. The cell nuclei were often shifted eccentrically and stained hyper- or hypochromatically.

Posterior colliculi. In the cells of posterior colliculi no essential differences in the activity of the enzymes between experimental and control animals were observed. In the experimental animals only in a few cells weaker staining of cell nuclei with alkaline pigments and reduction of Nissl substance were seen. Similar changes were also observed in single cells of control animals.

Medial geniculate bodies and the hearing area of the cerebral cortex. No differences were observed in the activity of the enzymes or morphological changes between the animals exposed to industrial or impulse noise and the control animals.

DISCUSSION

The results of the morphological and histochemical study concerning the influence of noise on the inner ear and acoustic pathway, indicate distinct lesions of cells in the inner ear and cochlear nuclei following acoustic stimuli, both acute and chronic. The observed fall of dehydrogenase activity in the inner ear structures is in agreement with the findings of other authors (Del Bo, Ottaviani, 1960; Quade, Geyer, 1973). Stack and Webster (1971) however, could find no decrease of oxidative enzymes activity in the inner ear under the influence of acoustic stimuli.

Industrial noise may lead to histoenzymatical changes in the inner ear after various time intervals of exposure, depending on the nature of the acoustic agent and conditions of its action. In the present study a distinct fall of dehydrogenase activity was seen after 10—12 week exposure of animals to noise. Chodyncki and Finkiewicz (1968) reported reduction of succinate and lactate dehydrogenase activity after 18—20 weeks of exposure, but the noise intensity and daily time of exposure were lower than in our study. After acoustic trauma morphological changes in the inner ear were most frequently seen in the outer hair cells and most pronounced in their innermost row. Inner hair cells were damaged much later. Similar relationships were found by other authors (Beaglay, 1965; Stockwell et al., 1969). The greatest morphological changes were noticed in monkeys in the external row of outer hair cells following exposure to impulse noise (Jordan et al., 1973).

As regards the morphological changes in further neurons of the acoustic pathway following noise action, the results of the present study are at variance with the data

of Tarmas and Horodyski (1974) obtained for rabbits. The mentioned authors observed lesions in both cochlear nuclei with almost the same frequency, damage of ventral nucleus being slightly more common. Moreover, they noticed changes in the posterior colliculi. In the present study, cell lesions of the ventral nucleus were much more distinct and more frequent than those in the dorsal nucleus. Cells of the posterior colliculi only occasionally showed slight deviations from the normal picture.

CONCLUSIONS

1. Long-lasting industrial noise and strong impulse noise result in a decrease of dehydrogenase activity of hair cells of the Corti organ, spiral ganglion cells and cochlear nuclear cells, especially on the ventral side.
2. Morphological lesions were most pronounced in the flat hair cells, spiral ganglion and cochlear nuclei cells, especially ventral one.
3. Chronic industrial noise and intensive impulse noise do not result in morphological and histochemical changes in the posterior colliculi cells, medial geniculate body cells and hearing area of the cerebral cortex.

H. Sowiński

ZMIANY HISTOCHEMICZNE I MORFOLOGICZNE W NARZĄDZIE SŁUCHU I DRODZE SŁUCHOWEJ W NASTĘPSTWIE DOŚWIADCZALNEGO URAZU AKUSTYCZNEGO

Streszczenie

Przeprowadzono badania morfologiczne i histochemiczne narządu słuchu świnek morskich, z których jedna grupa przebywała w hali fabrycznej do 14 miesięcy, gdzie panował biały hałas o natężeniu 95—100 dB. Drugą grupę zwierząt poddano działaniu krótkotrwałych, impulsowych bodźców akustycznych o natężeniu 110 dB i 130 dB.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że długotrwały hałas przemysłowy i silny hałas impulsowy powodują osłabienie aktywności dehydrogenaz oraz zmiany morfologiczne w komórkach słuchowych narządu Cortiego, komórkach zwoju spiralnego i komórkach jąder nerwu ślimakowego, zwłaszcza w jądrze brzuszonym. W dalszych odcinkach drogi słuchowej i polu słuchowym kory mózgowej nie obserwowano zmian histochemicznych ani morfologicznych.

Г. Сови́ньски

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И MORFOЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ОРГАНЕ СЛУХА И В СЛУХОВОМ ПУТИ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АККУСТИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ

Резюме

Были проведены гистохимические и морфологические исследования на морских свинках, из которых одна группа находилась в заводском цехе до 14 месяцев, в условиях белого шума интенсивностью 95—100 дБ. Вторая группа животных подвергалась кратковременному воздействию акустических стимулов интенсивностью 110 и 130 дБ.

В результате проведённых исследований было обнаружено, что продолжительный промышленный шум и сильный импульсный шум вызывает снижение активности дегидрогеназ, а также морфологические изменения в клетках ядер нерва улитки, особенно в вентральном ядре. В дальнейших отрезках слухового пути и в слуховом поле коры мозга не наблюдались гистохимические и морфологические изменения.

REFERENCES

1. Balogh K., Jr.: Decalcification with versene for histochemical study of oxidative enzyme systems. *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 232.
2. Balogh K., Jr.; Nomura Y.: A technique for the demonstration of acetylcholinesterase activity in the inner ear after decalcification with EDTA. *J. Histochem. Cytochem.*, 1964, 12, 931.
3. Beagley H. A.: Acoustic trauma in the guinea pig. I. Electrophysiology and histology. *Acta Otolaryng. (Stockh.)*, 1965, 60, 437.
4. Bredberg G.: Cellular pattern and nerve supply of the human organ of Corti. *Acta Otolaryng. (Stockh.)*, 1968, suppl. 236.
5. Chodyncki S., Finkiewicz L.: Badania histochemiczne ucha wewnętrznego świnek morskich poddanych działaniu hałasu fabrycznego. *Otolaryng. Pol.*, 1968, 22, 831.
6. Conti A., Borgo M.: Behaviour of cytochrome oxidase activity in the cochlea of the guinea-pig following acoustic stimulations. *Acta Otolaryng. (Stockh.)*, 1964, 58, 321.
7. Del Bo M., Ottaviani A.: Il comportamento dell'attività deidrogenasica nella chiocciola. *Comunicazione XLVIII Congresso Soc. Ital. di L.O.R.*, Florence, 6—9 October, 1960.
8. Florkin M., Stotz E. H.: Enzyme Nomenclature. In: *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 13, 3rd edit., Elsevier, Amsterdam, 1973.
9. Gerebtzoff M. A.: Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterase. *Acta Anat.*, 1953, 19, 336.
10. Gomori G.: *Microscopic Histochemistry*. The Univ. of Chicago Press, 1953.
11. Guttmacher H., Quade R., Geyer G.: Histochemische Succinodehydrogenaseaktivität in der Cochlea des Meerschweinchens nach Impulsbeschallung. *Acta Otolaryng. (Stockh.)*, 1973, 76, 323.
12. Hamberger C.A., Hyden H.: Cytochemical changes in the cochlear ganglion caused by acoustic stimulation and trauma. *Acta Otolaryng. (Stockh.)*, 1945, suppl. 61.
13. Hammer G.: A quantitative cytochemical study of shock wave effects on spiral ganglion cells. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 1956. Suppl. 127.
14. Jordan V. M., Pinheiro M. L., Chiba K., Jimenez A.: Cochlear Pathology in Monkeys exposed to impulse noise. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 1973, suppl. 312.
15. Pearse A. G. E., Hess R.: Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry. *Experientia*, 1961, 17, 136.
16. Perlman H. G.: Minimal shock pulse trauma to the cochlea — acute and chronic. *Laryngoscope*, 1948, 58, 466.
17. Poche L. B., Stockel C. W., Ades H. W.: Cochlear hair cell damage in guinea pigs after exposure to impulse noise. *J. Acoust. Soc. Amer* 1969, 46, 947.
18. Quade R., Geyer G.: Der Succinatdehydrogenase, Nachweis mit Hilfe der Perfusioentechnik an der Cochlea des Meerschweinchens unter Normalbedingungen und nach Dauerlärmwirkung. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 1973, 75, 45.
19. Stack C. R., Webster D. B.: Histochemical pattern of enzyme distribution in cochlea of the Canguaroo rat (*D. spectabilis*) at rest and following auditory stimulation. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)*, 1971, 72, 28.

20. Stockwell C. W., Ades H., Engström H.: Patterns of hair cell damage after intense auditory stimulation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.*, 1969, 78, 1144.
21. Tarmas J., Horodyski B.: Morphologic changes in the nerve cells of the rabbit brain caused by industrial noise. *Fol. Morphol. (Warsz.)* 1974, 33, 5.
22. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH. *Am. J. Clin. Pathol.* 1957, 27, 13—20.
23. Wolff D.: Microscopic examination of human labyrinths from patients exposed to loud voices. *Arch. Otolaryng.* 1942, 36, 843.

Authors address: Poznańska 32, os. Plewiska, 60—170 Poznań 18.

I. B. ZELMAN, M. J. MOSSAKOWSKI

SOME ASPECTS OF THE PATHOMECHANISM OF NERVE TISSUE LESIONS IN ACUTE CARBON MONOXIDE INTOXICATION

Department of Neuropathology, Medical Research Centre Polish Academy of Sciences
Head: prof. dr M. J. Mossakowski

The pathogenetic mechanisms of central nervous system impairment in carbon monoxide intoxication are not fully elucidated, despite a great number of clinical, pathomorphological and experimental observations, which generally point to a complex and ununiform origin of tissue abnormalities. The role of the hypoxic mechanism, resulting from a high affinity of carbon monoxide to blood hemoglobine, exceeding in humans 240 times the affinity of oxygen (Forbes, 1970) is generally accepted. The formation of carbon monoxide hemoglobine, varying in its level, leads to anemic hypoxemia with all consequences for the nerve tissue, the nature and intensity of which depends on the degree and duration of hypoxia.

Less univocal is the role of the direct cytotoxic effect of carbon monoxide on the parenchymal elements of the nerve tissue, owing to its affinity to the intracellular respiratory enzymatic system. The reservations, concerning this mechanism of carbon monoxide action *in situ* conditions, originate from the well known relatively low solubility of carbon monoxide in blood serum (Coburn, 1970) and its unknown permeation through the blood-brain barrier. Graziani and Guariano (1965) were not able to prove the presence of CO in the tissues of the central nervous system after 30 min. acute intoxication of experimental animals. Schwedenberg's concept (1952) concerning CO-penetration to parenchymal tissue elements together with edematous fluid may be put in doubt by the fact that in experimental conditions brain edema does not present a permanent pathological feature (Miyagishi, Suwa, 1969; Korthals et al., 1973). On the other hand, Ball et al. (1951) demonstrated that carbon monoxide action *in vitro* appears only at certain level of simultaneous oxygen deficit (below 25%), very rarely reached *in vivo*. This led same authors to the concept of the exclusive hypoxic nature of brain damage in CO intoxications (Brucher, 1967).

The localization of focal tissue lesions in the brain has been attributed by many investigators to the hemodynamic disorders both systemic and local, accompanying carbon monoxide intoxications (Brzezicki, 1930; Lehoczky, 1949; Romanowa, 1959; Környey, 1963; Lapresle, Fardeau, 1967; Preziosi et al., 1970).

A series of experiments performed in our Laboratory, both on animals and on tissue culture seem to offer certain information for a better understanding of this complex problem. In the experiments carried out on rats subjected to carbon monoxide intoxication to the level of 65—70% of CO-hemoglobine in blood accompanied by the reduction of cytochrome oxidase activity in the mitochondrial fraction of brain tissue to 75% of its normal value, no histopathological lesions in the central nervous system were found (Śmiałek et al., 1972). At the same time severe metabolic abnormalities, reversible in their nature were present both during and after intoxication. They consisted in disturbances in the high-energy compounds content (Sikorska et al., 1974), altered activity of main enzymes of the glycolytic pathway (Sikorska, Broniszewska, 1974) as well as that of adenyl-cyclase (Sikorska, 1974). Abnormalities in neuronal and glial protein biosynthesis were found by Albrecht (1973) and Albrecht and Śmiałek (1975). The most striking feature was glycogen content increase during the postintoxication period, accompanied by concomitant changes in the activity of glycogen-metabolizing enzymes (Śmiałek et al. 1972). The above presented metabolic disturbances found their manifestation in the histochemical picture of the brain (Szumańska, 1973), mostly as accumulation of abnormal glycogen deposits, increased activity of UDPG-g-transferase and phosphorylases as well as in reduction of cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity. Although abnormal blood vessel permeability for protein markers was not a feature, a slight but statistically significant increase of water content in the brain tissue was found after intoxication (Rap et al., 1974).

In electron microscopy no significant abnormalities were present, except swelling of perivascular astrocytic processes and astrocytic glycogen deposition (Korthals et al., 1973). The above presented changes were in their general nature and pattern similar to those observed in many experimental models of brain hypoxia and may be treated as a manifestation of energy deprivation, resulting from the oxygen deficit. In case of a more severe intoxication, the above mentioned abnormalities were superimposed by focal tissue alterations, with an evident prevalence in such areas as Ammon's horn, cerebral white matter, parietal portions of neocortex and striatum. The globus pallidus, cerebellar structures and thalamus were much less frequently the site of irreversible tissue lesions (Korthals et al., 1973).

The location of focal tissue lesions in general corresponds well with the sites of most severe and durable blood supply disturbances as shown in Mossakowski's benzidine studies (1975). This concomitance allowed us to consider the focal tissue impairments as resulting from general, regional and local hemodynamic disturbances, related with systemic hemodynamic abnormalities, accentuated by differences in angioarchitectonics of particular brain structures, and with disorders in autoregulatory mechanisms of brain blood vessels.

At the ultrastructural level the tissue abnormalities consisted in degeneration of neurons, ranging from mitochondrial swelling to complete necrosis as well as in degeneration of axons and myelin sheaths varying in intensity and advancement.

Differences in ultrastructural abnormalities of astrocytes, consisting in swelling of their cytoplasm and those in oligodendroglial cells seem to be worth mentioning. In the latter, selective damage of mitochondria contrasted with the relatively well preserved structure of other subcellular elements.

To elucidate the question of the possible cytotoxic effect of carbon monoxide action exerted on parenchymal elements of the nerve tissue, tissue culture studies were performed (Hoppe, 1974). The severe damage to all neuroectodermal cells was a striking feature. It consisted in remarkable glial cell swelling and vacuolar degeneration with increased cell membrane permeability and significant reduction of the activity of all respiratory enzymes.

At the EM level severe vacuolization of glial cell cytoplasm and damage to mitochondrial system were permanent features (Korthals et al., 1973). The oligodendrocytes happened to be the most sensitive cellular element. Their sensitivity exceeded that of neurons. The cytotoxic effect of CO was exerted in conditions of entirely normal oxygen content; this contradicts the observations of Ball et al. (1951), at least under the conditions applied. Keeping in mind, all differences concerning tissue culture experiments, their comparison with the results of our experiments performed with animals is strongly suggestive that the cytotoxic effect of carbon monoxide has to be taken into consideration even in *in situ* conditions. The difference in the dynamics of metabolic abnormalities observed in CO intoxications as compared with other hypoxic and ischemic conditions, concerning mostly glycogen accumulation and protein biosynthesis supports this supposition. The same is suggested by the results obtained by Śmiałek (1974) in experiments with isolated nerve cells from the brain of intoxicated animals.

On the basis of experiments with animals and tissue culture it would seem that myelin impairment in experimental conditions does not depend so much on brain edema as on the oligodendroglial damage. However, the possible role of brain edema, postulated by numerous authors cannot be ruled out, as the cerebral white matter is the site of predilection for severe, persisting venous hyperemia, which favours development of brain edema (Mossakowski, 1975).

To sum up, the brain tissue damage, occurring in carbon monoxide intoxication results from several factors, such as anemic hypoxemia and ischemia due to both systemic and local hemodynamic disorders, accentuated by regional angioarchitectural factors as well as the cytotoxic action of the poison exerted directly on the parenchymal elements of the central nervous system. All these factors overlap each other and all have in common oxygen deprivation or its limited utilization in tissue metabolic processes.

I. B. Zelman, M. J. Mossakowski

WYBRANE ZAGADNIENIA PATOMECHANIZMU USZKODZEŃ TKANKI NERWOWEJ W OSTRYM ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA

Streszczenie

W oparciu o badania doświadczalne wykonane na materiale zwierzęcym i w hodowli tkankowej autorzy omawiają udział poszczególnych czynników patogenetycznych w kształtowaniu obrazu patomorfologicznego ostrej encefalopatii tlenkowej. Autorzy zwracają uwagę na trzy podstawowe czynniki odgrywające rolę w metabolicznym i strukturalnym uszkodzeniu tkanki nerwowej w następstwie działania tlenku węgla — hypoksyjnego, związanego z wysokim powinowactwem tlenku węgla do hemoglobiny, niedokrwiennego, stanowiącego następstwo ogólnoustrojowych i miejscowych zaburzeń hemodynamicznych, pogłębionych przez właściwości angioarchitektoniczne poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego i zaburzenia autoregulacyjnych mechanizmów krążenia mózgowego, oraz cytotoksycznego, wynikającego z blokowania przez tlenek węgla wewnątrzkomórkowych układów oddechowych. Szczególną uwagę zwrócono na uszkodzenia gleju skąpowypustkowego, jako czynnika prowadzącego obok obrzęku mózgu do rozpadu osłonek mielinowych.

И. Б. Зельман, М. Я. Моссаковский

ИЗБРАННЫЕ ВОПРОСЫ ПАТОМЕХАНИЗМА ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕРВНОЙ ТКАНИ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

Основываясь на экспериментальных исследованиях, проведенных на животном материале и тканевой культуре, авторы обсуждают в работе участие отдельных патогенных факторов в становлении патоморфологической картины острой энцефалопатии, вызванной окисью углерода. Авторы обращают внимание на три основных фактора повреждений нервной ткани в результате отравления окисью углерода — гипоксический, связанный с высоким сродством окиси углерода к гемоглобину, ишемический, являющийся результатом гемодинамических нарушений как местного, так и общего характера и усиленных ангиоархитектоническими свойствами отдельных структур центральной нервной системы и нарушениями авторегуляционных механизмов мозгового кровообращения, и цитотоксический, возникающий в результате блокирования окисью углерода внутриклеточных дыхательных систем. Особое внимание уделяется повреждениям олигодендроглии как фактору, ведущему наравне с отеком мозга к распаду миелиновых оболочек.

REFERENCES

1. Albrecht, J.: Effect of carbon monoxide intoxication on individual steps of protein synthesis in rat brain. *J. Neurochem.* 1973, 21, 1563—1566.
2. Albrecht, J.; Śmiałek, M.: Effect of hypoxia, ischemia and carbon monoxide intoxication on in vivo protein synthesis in neuron and glial cell enriched fractions in rat brain. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1975, 31, 257—262.

3. Ball, E. G.; Strittmatter, C. P.; Cooper, O.: The reaction of cytochrome oxidase with carbon monoxide. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 635—647
4. Brucher, J. M.: Neuropathological problems posed by carbon monoxide poisoning and anoxia. *Progress in Brain Research*. Ed. H. Bour and Mc A. Ledingham. Amsterdam 1967, 24, 111—127.
5. Brzezicki, E.: Zur Frage des Parkinsonismus bei Kohlenoxydvergiftung. *Arbeiten Neurol. Inst. Wien* 1930, 30, 148—208.
6. Coburn, R. F.: The carbon monoxide body stores. *Ann. New York Acad. Sci.* 1970, 174, 11—22.
7. Forbes, W. H.: Carbon monoxide uptake via lungs. *Ann. New York Acad. Sci.* 1970, 174, 72-75.
8. Graziani, G.; Guariano, A.: Il sistema nervoso centrale nella intossicazione acuta sperimentale da CO. *Fol. Med. Napoli* 1956, 39, 457—470.
9. Hoppe, B.: Obraz strukturalny i histochemiczny gleju hodowanego in vitro poddanego działaniu tlenku węgla. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 371—385.
10. Jacob, H.: Über die diffuse Hemisphärenmarkerkrankung nach Kohlenoxydvergiftung bei Fällen mit klinisch intervallärer Verlaufsform. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 1939, 167, 161—179.
11. Korthals, J.; Mossakowski, M. J.; Śmiałek, M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny doświadczalnej encefalopatii tlenkowęgłowej u szczura. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 179—300.
12. Korthals, J.; Hoppe, B.; Karwacka, H.: Badania mikroskopowo-elektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 315—322.
13. Környey, S.: Patterns of CNS vulnerability in CO, cyanide and other poisonings. *Selective Vulnerability of the Brain in Hypoxaemia*. Ed. J. P. Schadé and W. H. McMenemy, Blackwell. Oxford. 1963, 165—176 .
14. Lapresle, J.; Fardeau, M.: The central nervous system and carbon monoxide poisoning. II. Anatomical study of brain lesions following intoxication with carbon monoxide (22 cases). *Progress in Brain Research*. Ed. H. Bour and Mc A. Lendingham. Amsterdam 1967, 24, 96—110.
15. Lehoczyk, T.: Le mecanisme physiologique des lesions central de l'intoxication oxycarbones. *Acta Neurol. Belg.* 1949, 49, 488—495.
16. Miyagishi, T.; Suwa, N.: Electron microscopic studies on the cerebral lesions of rat in experimental carbon monoxide poisoning. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1969, 14, 118—125.
17. Mossakowski, M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla u szczurów. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241—250.
18. Preziosi, J. M.; Lindenberg, R.; Ley, D.; Christensen, D.: An experimental investigation in animals of the function and morphologic effects of a single and repeated exposures to high and low concentrations of carbon monoxide. *Ann. New York Acad. Sci.* 1970, 174, 369—384.
19. Rap, Z. M.; Kapuściński, A.; Sikorska, M.: Ocena stanu bariery krew-mózg i zawartości wody w mózgu w ostrym doświadczalnym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 403—412.
20. Romanowa, R. P.: Patologiczeskije izmienenija w głownom mozgu sobak posle terminalnych sostojanii wyzwanich ostroj krowopotierej i ostrawlenijem okislju uglewoda. *Autoreferat dla uzyskania stopnia kandydata nauk medycznych*. Moskwa 1959.
21. Schwedenberg, T. M.: Leucoencephalopathy following carbon monoxide asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1959, 18, 597—608.
22. Sikorska, M.; Bicz, W.; Śmiałek, M.; Mossakowski, M. J.: ATP, ADP, AMP concentrations in rat brain following carbon monoxide intoxication and in experimental ischemia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 387—398.
23. Sikorska, M.; Broniszewska-Ardelt, B.: The activity of adenyl cyclase, hexokinase, phosphofructokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase in rat brains in the result of experimental carbon monoxide intoxication. In preparation.

24. Sikorska, M.: Aktywność cyklazy adenylowej w mózgu szczura w różnych modelach niedotlenienia ośrodkowego układu nerwowego. Referat wygłoszony na Posiedzeniu Naukowym Stow. Neuropat. Polskich, 3 maj 1975.
25. Śmiałek, M.; Sikorska, M.; Korthals, J.; Bicz, W.; Mossakowski, M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose glycogen alfa-4-glucosyltransferase activity in rat brain in experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 22—31.
26. Śmiałek, M.: Cytochrome oxidase activity in isolated giant cells of the reticular formation from the rat brain stem following carbon monoxide intoxication (Cartesian microdiver technique). *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 397—401.
27. Szumańska, G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 301—314.

Authors' address: Department of Neuropathology, Experimental and Medical Research Centre, 3 Dworkowa Str., 00-784 Warszawa.

M. ŚMIAŁEK

RESPIRATORY ACTIVITY OF ISOLATED NEURONS FROM THE RAT
CENTRAL NERVOUS SYSTEM FOLLOWING CARBON MONOXIDE
INTOXICATION

(CARTESIAN MICRO-DIVER TECHNIQUE)*

Department of Neuropathology, Medical Research Centre Polish Academy of Sciences
Head: Prof. Dr. M. J. Mossakowski

Our previous studies on the respiratory activity of giant cells of the reticular formation isolated from the rat brain medulla demonstrated a decrease in oxygen uptake by these cells during the period of transient glycogen deposition in the brain following CO intoxication (Śmiałek et al., 1973; Śmiałek, 1974). Similar comparative observations on changes in cellular oxidation and glycogen content in isolated sensory neurons of spinal root ganglia from chick embryo tissue culture in experimental anoxia indicated a return to normal respiratory activity in the cells capable of transient glycogen deposition (Śmiałek, Kraśnicka, 1975). Transient deposition of glycogen granules in astrocytes and in some neurons which survived the experimental oxygen insufficiency was observed in various pathological conditions, e.g. following CO intoxication (Korthals et al., 1973) and in perinatal asphyxia (Mossakowski et al., 1968).

The aim of the present work was to determine the respiratory activity of different neurons with different physiological functions and different ability to accumulate glycogen, isolated from the rat central nervous system following CO intoxication with the use of ascorbate-cytochrome c and the succinate oxidation systems.

MATERIAL AND METHODS

Two hundred male albino Wistar rats aged 6 weeks were exposed to CO (Śmiałek et al., 1973). The animals were placed in a 60-l chamber with continuous flow of 1 l/min of air containing an admixture of 1% CO. The blood carboxyhemoglobin level gradually increased up to the 20th min reaching the value of about 75%. This level subsisted up to the 60th min, whereupon the CO inflow was stopped and the

* This work was partially supported by PL 480 Grant, Public Health Service USA, Agreement 05-004-1.

rats were left in the chamber with continuous air flow for further 30 min. The animals were removed from the chamber at time „O”, when the HbCO level in the blood dropped to about 50%. After further 2 1/2 min the HbCO content was reduced to about 25%, complete recovery taking place after 2 hours. The animals were decapitated 0, 1, 2, 3, 4, 24, 48, 72, 120 and 240 h after removal from the chamber. The control group consisted of animals breathing fresh air.

The carboxyhemoglobin (HbCO) level in the blood was assayed according to Whitehead and Worthington (1961).

Isolation of the neurons. The brain slices were placed in ice-cold 0.25 M sucrose solution containing 2 mM methylene blue. Single giant cells from the reticular formation of the medulla, Purkinje cells, pyramidal cells from the Ammon horn and motor neurons from the spinal cord were extracted from these slices with a 18 μ thick stainless steel needle (AB Kanthal, Sweden). A single neuron was sucked into the diver and incubated in the following media: Ascorbate — cytochrome c system (cytochrome oxidase); Na_2HPO_4 — KH_2PO_4 buffer pH 7.4, 37.5 mM; cytochrome c 8.6×10^{-2} mM; Na ascorbate 12.5 mM, AlCl_3 0.5 mM (Slater, 1949; Potter, 1957). Succinate oxidation Na_2HPO_4 — KH_2PO_4 buffer pH 7.4, 37.5 mM; cytochrome c 8.6×10^{-2} mM; Na succinate 25 mM; AlCl_3 0.5 mM; MgCl_2 0.5 mM (Slater, 1949a; Potter, 1957).

The oxygen uptake was determined at $38^\circ\text{C} \pm 0.002^\circ\text{C}$ by the Cartesian ampulla micro-diver technique according to Zeuthen (1953) in an ultrathermostat constructed in the Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, Warsaw. The respiratory activity was expressed as oxygen uptake in $\mu\text{l}/\text{hour}/\text{neuron}$. The blank was measured in the same conditions in the absence of the nerve cell.

RESULTS

Table 1 shows oxygen uptake by the neurons in the ascorbate-cytochrome c system. The Purkinje cells and the ammonal cortex neurons separated from control cells showed almost identical respiratory activity, whereas the spinal cord motor neurons were 50% less active than the other neurons.

Directly after CO intoxication the respiratory activity was found up to be reduced in all types of neurons, amounting to about 69% of the control level in the motor neurons, to 67% in the Purkinje cells and to about 54% in the pyramidal cells from Ammon's horn.

In the further experimental periods cell respiration differed quantitatively in the different types of neurons. A transient decrease of oxygen uptake in the ascorbate-cytochrome c system in the Purkinje cells showed the highest value after 4 h (79%) with recovery period up to the 120th h. In the neurons from the ammonal cortex, a drop in oxygen uptake persisting upto the 240th h was observed — the lowest value being noted 48 h after intoxication (84%). The reaction of the spinal cord neurons was characterized by a decrease in the respiratory activity directly and 1 h after

Table 1. Oxygen uptake by isolated single neurons from the rat CNS following CO intoxication (ascorbate-cytochrome c system)

Tabela 1. Zużycie tlenu w obecności askorbinianu i cytochromu c przez izolowane pojedyncze neurony OUN szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla

Experimental group time after exposure CO		Oxygen uptake $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}/\text{hour}/\text{cell}$ Zużycie tlenu $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}/\text{godz.}/\text{komórka}$						
Grupa doświadcz. czas po ekspozycji CO		Purkinje cells Komórki Purkinjego $\bar{x} \pm \text{SEM}$		Pyramidal cells (Ammon's horn) Komórki piramidowe (róg Amona) $\bar{x} \pm \text{SEM}$			Motor neurons (spinal cord) Neurony ruchowe (rdzeń kreg.) $\bar{x} \pm \text{SEM}$	
Control — Kontrola		13.50 ± 1.96	(7) ^{n/}	12.91 ± 1.81	(6)	6.47 ± 1.81	(5)	
Hours Godziny	0	4.49 ± 1.07	(5) p ≤ 0.01	5.93 ± 1.07	(5) p ≤ 0.05	2.03 ± 0.21	(5) p ≤ 0.01	
	1	—		—		4.16 ± 0.72	(5) p ≤ 0.05	
	2	4.70 ± 0.60	(5) p ≤ 0.01	4.41 ± 0.25	(6) p ≤ 0.01	9.45 ± 0.75	(8) p ≤ 0.05	
	3	—		—		5.62 ± 0.84	(5)	
	4	2.79 ± 0.20	(5) p ≤ 0.001	6.11 ± 0.99	(5) p ≤ 0.05	5.47 ± 0.29	(5)	
	24	7.57 ± 0.86	(5) p ≤ 0.001	5.76 ± 0.96	(5) p ≤ 0.01	5.35 ± 0.84	(5)	
	48	6.70 ± 0.77	(5) p ≤ 0.05	2.14 ± 0.98	(6) p ≤ 0.001	6.49 ± 0.25	(5)	
	72	7.13 ± 0.61	(5) p ≤ 0.05	2.23 ± 0.31	(5) p ≤ 0.001	5.07 ± 0.55	(5)	
	120	9.46 ± 0.93	(5)	5.65 ± 0.74	(5) p ≤ 0.01	—		
240	—		4.31 — 0.50	(5) p ≤ 0.001	—			

 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ Arithmetic mean \pm standard error of the meanŚrednia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n Number of experiments

Liczba eksperymentów

p Probability calculated by Student's t test

Prawdopodobieństwo wg testu t Studenta

intoxication. At the 2nd h, a statistically significant increase (46%) in oxygen uptake was noted as compared to the norm.

Table 2 shows the activity of the succinate oxidation system. The control oxygen uptake by Purkinje and giant cells from the reticular formation was similar. The motor neurons from the spinal cord exhibited a respiratory activity lower by about 1/3 and pyramidal cells from Ammon's horn by about 1/2 as compared to the values obtained in Purkinje cells and in motor neurons.

Succinate oxidation in Purkinje cells remained unchanged up to the 120th h after exposure to CO. In the pyramidal cells from Ammon's horn, a stimulation of the respiratory activity was noted directly after CO intoxication ($p \leq 0.05$). This stimulating effect persisted at the same level for the next 4 h, than became potentiated to the highest level at the 48th hour and remained at this level upto the 240th h. In the isolated motor neurons from the spinal cord no changes in the succinate oxidation following CO intoxication was observed up to the 3rd h. After 4 h a rapid increase in the oxygen uptake occurred (170%). This transient rise in the respiratory activity persisted up to the 48th hour with recovery after 72 h.

DISCUSSION

As shown in the previous paper on the isolated giant cells from the reticular formation (Śmiałek, 1974) exposure to CO produced a decrease of oxygen uptake in the ascorbate-cytochrome c oxidation system both in the Purkinje cells, pyramidal cells of the Ammon horn as well as in the motor neurons from the spinal cord. This is a well-known phenomenon of cytochrome oxidase activity inhibition by carbon monoxide. The period of inhibition cell respiration in this model coincides with the HbCO increase in the blood.

The observations suggest a different sensitivity of the aerobic metabolism of the particular types of neurons to CO. It seems that the spinal cord motor neurons are the most resistant in this respect. Purkinje cells were more sensitive to CO. These two types of neurons are known to possess the ability to deposit glycogen following CO intoxication. The Ammon horn neurons proved to be most sensitive to CO. The latter conclusion is consistent with the morphological observations of Korthals et al. (1973), who described the appearance in the ammonal cortex of selective necrosis and necrotic foci and the absence of glycogen deposits there. It may be postulated, that neurons with the ability of glycogen deposition are capable of utilizing the glycogen pool in cell respiration and therefore are subject to relatively milder disturbances of the respiratory chain.

Comparison of oxygen uptake by the neurons in the two aerobic oxidation systems indicates a differential effect of CO on their utilisation in different neurons. In the giant cells from the reticular formation and Purkinje cells a transient increase in oxygen uptake by the ascorbate-cytochrome c system was not accompanied by changes in succinate oxidation. In the ammonal cortex neurons, a permanent decrease

Table 2. Succinate oxidation in isolated neurons from the rat CNS following CO intoxication

Tabela 2. Utlenie bursztynianu w izolowanych neuronach OUN szczura w następstwie zatrucia tlenkiem węgla

Experimental group time after CO exposure Grupa doświadcz. czas po ekspozycji CO		Oxygen uptake $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{hour}/\text{cell}$ Zużycie tlenu $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-4}/\text{godz.}/\text{komórka}$									
		Giant cells (brain stem retic. form) Komórki olbrzymie (twór siat. pnia mózgu) $\bar{x} \pm \text{SEM}$		Purkinje cells Komórki Purkinjego $\bar{x} \pm \text{SEM}$		Pyramidal cells (Ammon's horn) Komórki piramidowe (róg Amona) $\bar{x} \pm \text{SEM}$		Motor neurons (spinal cord) Neurony ruchowe (rdzeń kręg.) $\bar{x} \pm \text{SEM}$			
Control Kontrola		5.94 \pm 1.36	(5) ^{n/}	6.29 \pm 0.96	(5)	3.14 \pm 0.32	(5)		4.07 \pm 0.68	(5)	
Hours Godziny	0	5.45 \pm 0.35	(6)	8.42 \pm 0.64	(6)	5.75 \pm 1.06	(5)	p \leq 0.05	4.62 \pm 1.04	(5)	
	1	—		—		—			4.94 \pm 0.28	(6)	
	2	6.33 \pm 0.72	(6)	8.59 \pm 1.38	(5)	5.91 \pm 0.83	(5)	p \leq 0.05	4.01 \pm 0.55	(5)	
	3	—		—		—			5.35 \pm 1.02	(5)	
	4	5.64 \pm 0.43	(7)	4.72 \pm 0.45	(5)	5.85 \pm 0.61	(5)	p \leq 0.05	10.99 \pm 2.11	(5)	p \leq 0.01
	24	4.42 \pm 0.25	(7)	6.10 \pm 0.81	(6)	8.55 \pm 1.15	(5)	p \leq 0.01	9.81 \pm 2.36	(5)	p \leq 0.01
	48	3.67 \pm 0.47	(6)	—		13.73 \pm 2.19	(4)	p \leq 0.001	8.21 \pm 0.82	(6)	p \leq 0.01
	72	6.15 \pm 0.76	(5)	6.87 \pm 0.72	(5)	9.32 \pm 0.86	(5)	p \leq 0.001	5.17 \pm 0.63	(5)	
	120	5.32 \pm 0.39	(6)	6.68 \pm 0.69	(6)	9.92 \pm 1.14	(7)	p \leq 0.01	—		
240	—		—		8.08 \pm 1.20	(5)	p \leq 0.01	—			

 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ — Arithmetic mean \pm standard error of the meanŚrednia arytmetyczna \pm średni błąd średniejp — Probability calculated by Student's t test
Prawdopodobieństwo wg testu t Studentan — Number of experiments
Liczba doświadczeń

in the cytochrome c oxidation following CO intoxication paralleled the rise of the oxygen uptake by the succinate oxidation system. Szumańska (1973) using histochemical methods found inhibition of succinate dehydrogenase (SDH) in the same model.

The above results lead to the conclusions, that four types of neurons from the rat CNS, examined in this work exhibited quantitative differences in the reduction-oxidation metabolism, both in norm and in CO intoxication.

The neurons capable of glycogen deposition after exposure to CO were characterized by a better regulation and more rapid recovery of the disturbed cell respiration. It is suggested, that these neurons are able to utilize the glycogen pool, compensating in this way the changes in the cellular high-energy compounds metabolism following CO intoxication.

The author wishes to thank Mrs Teresa Bok for skillful technical assistance.

M. Śmiałek

AKTYWNOŚĆ ODDECHOWA IZOLOWANYCH NEURONÓW OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO SZCZURA W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA

Streszczenie

Do badań użyto 6-tygodniowe szczury, które przez 90 minut poddawano działaniu tlenu węgla (Śmiałek i wsp. 1973). Izolowane neurony tworzą siatkowatego opuszki, komórki Purkiniego, neurony ruchowe rdzenia kręgowego i komórki piramidowe rogu Amona badano metodą mikronurka (Zeuthen 1953, Hamberger 1963) w różnym czasie po zatruciu.

Komórki olbrzymie tworzą siatkowatego opuszki i komórki Purkiniego, gromadzące glikogen po zatruciu tlenkiem węgla, wykazywały przejściowy spadek zużycia tlenu w układzie askorbinian-cytochrom c, przy czym powrót do normy występował nieco później w komórkach Purkiniego. W neuronach ruchowych z rdzenia kręgowego, również odkładających glikogen, obserwowano bezpośrednio po zatruciu obniżenie zużycia tlenu o około 69%; a po 2 godz. statystycznie znamienne przyrost o około 46%. Powrót do normy następował po 3 godz. od zatrucia. Komórki piramidowe rogu Amona, nie mające zdolności gromadzenia glikogenu, wykazywały obniżenie zużycia tlenu przez układ askorbinian-cytochrom C od tzw. czasu „0” do 240 godzin po zatruciu.

Badanie zużycia tlenu przez neurony w układzie katalizującym utlenianie bursztynianu wykazało statystycznie znamienne, ciągłe przyrost zużycia tlenu do 240 godzin po zatruciu w neuronach z kory amonalnej, natomiast w neuronach ruchowych z rdzenia kręgowego tylko pomiędzy 4—48 godziną po zatruciu.

Uzyskane wyniki przemawiają za odmienną reakcją badanych neuronów na działanie tlenu węgla i sugerują występowanie różnic w metabolizmie glikogenu i ilościowym wykorzystaniu jego metabolitów w oddychaniu komórkowym.

М. Смялек

ДЫХАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ЦНС КРЫСЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

Для исследований были использованы 6-недельные крысы, подвергнутые 90 минутному отравлению окисью углерода. Изолированные нейроны ретикулярной формации продолговатого мозга, клетки Пуркинье, двигательные нейроны спинного мозга и пирамидальные клетки Аммониева рога были исследованы методом поплавка в различное время после отравления. Гигантские клетки ретикулярной формации продолговатого мозга и клетки Пуркинье, накапливающие гликоген после отравления окисью углерода, обнаруживали временное снижение потребления кислорода в системе аскорбиновая кислота — цитохром „С”, причем, в клетках Пуркинье возврат к норме наступал несколько позже. В двигательных нейронах спинного мозга, также накапливающих гликоген, непосредственно после отравления наблюдалось снижение потребления кислорода примерно на 69%, а через 2 часа статистически достоверное увеличение примерно на 46%. Возвращение к норме наступало через 3 часа после отравления. Пирамидальные клетки Аммониева рога, неспособные к накоплению гликогена, в период времени от „0” до 240 часов обнаруживали снижение потребления кислорода в системе аскорбиновая кислота — цитохром „С”.

Исследование потребления кислорода нейронами в системе, катализирующей окисление сукцината, указывает на статистически достоверное постоянное увеличение потребления кислорода до 240 часов после отравления СО в нейронах гиппокампа и временное, между 4 и 48 часом после отравления, в двигательных нейронах спинного мозга.

Полученные результаты свидетельствуют о различной реакции исследованных нейронов на действие окиси углерода и предполагают наличие различий в метаболизме гликогена и количественном использовании его метаболитов в клеточном дыхании.

REFERENCES

1. Korthals, J.; Mossakowski, M. J.; Śmiałek, M.: *Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowęgłowej*. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 279—298.
2. Mossakowski, M. J.; Long, D. N.; Myers, R. E.; de Curet, H. R.; Klatzo, I.: *Early histochemical changes in perinatal asphyxia*. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
3. Potter, V. R.: *The homogenate technique*. In: „*Manometric techniques*” Ed. W. W. Umbreit R.H., Burris and J. F. Stauffer. Burgess, Minneapolis 1957; 170—187.
4. Slater, E. C.: *A comparative study of the succinic dehydrogenase-cytochrome system in heart muscle and in kidney*. *Bioch. J.* 1949a, 45, 1—8.
5. Slater, E. C.: *The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations*. *Biochem. J.* 1949, 44, 305—318.
6. Szumańska, G.: *Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla*. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 301—314.
7. Śmiałek, M.; Sikorska, M.; Korthals, J.; Bicz, W.; Mossakowski, M. J.: *The glycogen content and its topography and UDPglucose: glycogen alfa-4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11)*

- activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222—231.
8. Śmiałek, M.: Cytochrome oxidase activity in isolated giant cell of the reticular formation from the rat brain following carbon monoxide intoxication (Cartesian micro-diver technique). *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 397—401.
 9. Śmiałek, M.; Kraśnicka, Z.: Cytochrome oxidase activity in the isolated sensory neurons of the spinal root ganglia from chick embryo tissue culture in experimental anoxia. VII. Congress of Neuropath. Budapest, 1974. In press.
 10. Whitehead, T. P.; Worthington, N.: The determination of carboxyhemoglobin. *Clin. chim. Acta*, 1962, 6, 356—358.
 11. Zeuthen, E.: Growth as related to the cell cycle in single-cell cultures of *Tetrahymena piriformis*. *J. Embryol. exp. Morph.* 1953, 1, 239—249.

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

L. DYDYK, M. ŚMIAŁEK, M. DAŃBSKA

RESPIRATORY ACTIVITY OF ISOLATED GIANT CELLS OF RETICULAR
FORMATION AND ULTRASTRUCTURE OF NEURONS FROM RAT BRAIN
STEM IN CARBON MONOXIDE INTOXICATION DURING
PREGNANCY

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

Head: Prof. Dr. M. J. Mossakowski

The effect of carbon monoxide on the central nervous system has been the object of neuropathological investigations for many years. Ju et al., 1972; Korthals et al., 1973 proved the toxic effect of this gas on the living organism by way of anoxia of hypoxic-anoxic type. Histochemical and biochemical studies, despite providing data on the inhibitory effect of carbon monoxide on tissue respiration (Szumańska, 1973; Śmiałek et al., 1973; Hoppe, 1974), have not yet reached an agreement of opinions regarding its direct toxic effect on the nerve cell. A different aspect of this problem presented experimental studies concerned with the transplacental effect of carbon monoxide (Longo et al., 1967; Beaudoin et al., 1969; Longo, 1970; Myers and Ginsberg 1974).

The direct aim of our study was to investigate the effect of carbon monoxide on the brain of pregnant rat females, and on fetal brain after transplacental influence of this gas. Studies were carried out on the respiratory activity of isolated giant cells of the brain stem reticular formation. The histological, ultrastructural and histochemical appearance of medullary neurons, where the lateral giant cell nucleus of reticular formation is localized was also studied.

MATERIAL AND METHODS

Female Wistar rats in the 18th day of pregnancy were exposed to carbon monoxide intoxication according to the method described in the report of Korthals et al., (1973). Carboxyhemoglobin (HbCO) level was determined after 60 min of carbon monoxide action in the blood of female rats and fetuses according to Whitehead and Worthington (1961). Pregnant females were decapitated in groups immediately when taken out from the chamber, 24 and 72 hours after intoxication. Fetuses, born by cesarean section were decapitated directly after intoxication and 24 hours later.

Newborn rats were decapitated after 72 hours. Single giant cells of the brain stem reticular formation were isolated with Kanthal-fiber Sweden 18 microns thick. The activity of the ascorbate-cytochrome c-oxygen (cytochrome oxidase) oxidation-reduction system was determined in isolated neurons by the ultramicrogasometric method according to Hamberger (1963) on the basis of the Cartesian micro-diver technique. Gasometric studies were performed at $38^{\circ}\text{C} \pm 0.002^{\circ}\text{C}$. Results were expressed as microliters of oxygen consumed during 1 hour by 1 neuron (Zeuthen, 1953).

For histological, histochemical and ultrastructural studies brains of 32 fetuses, 24 newborn rats and 28 pregnant females were used. Control groups consisted of 8 fetal brains, 8 newborn brains and 6 brains of pregnant female rats, not exposed to carbon monoxide intoxication. Tissue sections for histological studies were stained with hematoxylin-eosin and cresyl violet. Glycogen was stained by the PAS-dimedon method according to Bulmer (1959). Tissue samples for electron microscope examination were obtained from the brain stem medulla, fixed in paraformaldehyde, in cacodylate buffer or in osmium tetroxide in veronal-acetate. Sections were dehydrated in ethanol and acetone, and then embedded in Epon 812. The material was cut in a LKB ultramicrotome. Ultrathin sections were stained with uranyl-acetate and lead citrate and examined in a Tesla BS-500 or JEM — 7A electron microscope.

RESULTS

The mean HbCO level in fetal blood after 60 min of carbon monoxide action was of $10.3 \pm 0.25\%$, and in the blood of pregnant females $73.3 \pm 0.5\%$. The results of biochemical studies are presented in Table 1 and Diagram 1.

Studies of the respiratory activity of giant cells of the brain stem reticular formation in normal brain indicated that the intensity of oxygen consumption in the presence of ascorbate-cytochrome c increases between the 18th day of fetal life and the 1st day of life by about 100%. Oxygen consumption by these cells of normal pregnant females was about 5 times higher than in newborn animals in the first day of life.

As a result of transplacental action of carbon monoxide, the respiratory activity of giant cells of the brain stem reticular formation of fetal brain showed an about 4-fold increase directly after intoxication as compared with the norm (fetuses on the 18th day of life). Twenty four hours after intoxication (fetuses on the 19th day of life) and after 72 hours (newborn rats in the first few hours of life) no statistically significant differences were noted as compared with a control group.

The reaction of giant cells of pregnant females to carbon monoxide was different. It was manifested by a decline of oxygen consumption by about 77% directly after intoxication and by about 43% after 24 hours. On the other hand, after 72 hours no significant changes were found as compared with the control.

Histological examination of fetal and newborn brains did not show any prominent changes. In electronmicroscope studies of fetal and newborn medulla two main types of cells were observed. More numerous smaller cells (Fig. 1) contained

Table 1. Respiratory activity in the isolated giant cell from the reticular formation of the rat brain stem in the system ascorbate-cytochrome c following carbon monoxide intoxication

Tabela 1. Aktywność oddechowa izolowanej komórki olbrzymiej tworzącej siatkowatego pnia mózgu szczura w układzie askorbinian-cytochrom c w następstwie zatrucia tlenkiem węgla

Experimental group Grupa doświadczalna		Oxygen uptake — $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}$ /hr/ cell Zużycie tlenu — $\mu\text{l O}_2 \times 10^{-3}$ /godz/kom. $\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$	p
Embryo (18 days) Plód (18 dni)	Control — Kontrola	1.85 ± 0.29 (5) ⁿ	
	Directly after CO — Bezp. po CO	7.27 ± 0.47 (7)	≤ 0.001
Embryo (19 days) Plód (19 dni)	Control — Kontrola	2.93 ± 0.40 (5)	
	24 hrs after CO — 24 godz. po CO	3.57 ± 0.44 (5)	≥ 0,05
Newborn (1 day) Noworodek (1 dzień)	Control — Kontrola	4.05 ± 0.61 (6)	
	72 hrs after CO — 72 godz. po CO	4.19 ± 0.12 (5)	≥ 0,05
Adult female Dorosła samica	Control — Kontrola	19.21 ± 2.05 (6)	
	Directly after CO — Bezp. po CO	4.41 ± 1.81 (6)	≤ 0.001
	24 hrs after CO — 24 godz. po CO	11.01 ± 1.12 (6)	≤ 0,001
	72 hrs after CO — 72 godz. po CO	17.11 ± 1.65 (6)	≥ 0,05

$\bar{x} \pm \text{S.E.M.}$ — arithmetic mean \pm standard error of the mean

— średnia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

n — number of experiments

— liczba eksperymentów

p — probability calculated by the Student's test

— prawdopodobieństwo wg testu Studenta t

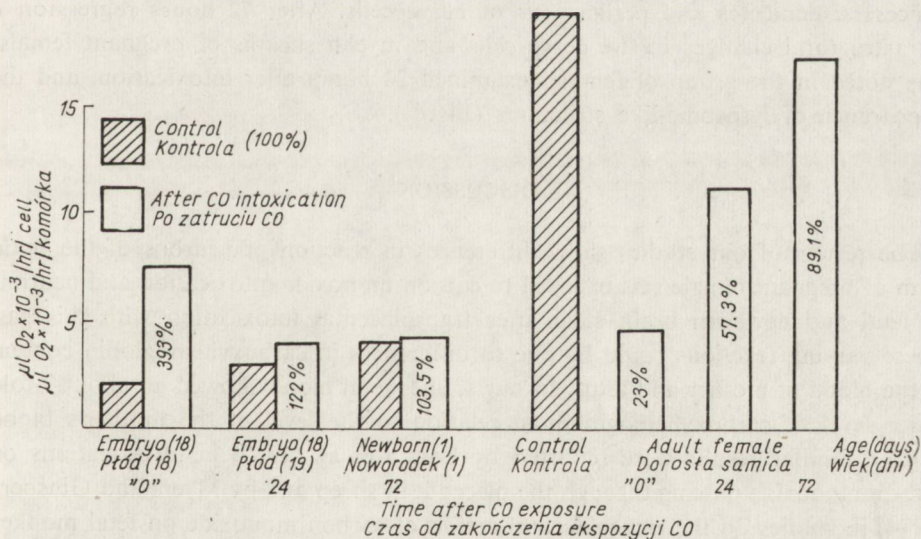


Diagram 1. Oxygen uptake by the giant cells from the reticular formation of the rat brain stem following CO intoxication (incubating medium with cytochrome c and ascorbate)

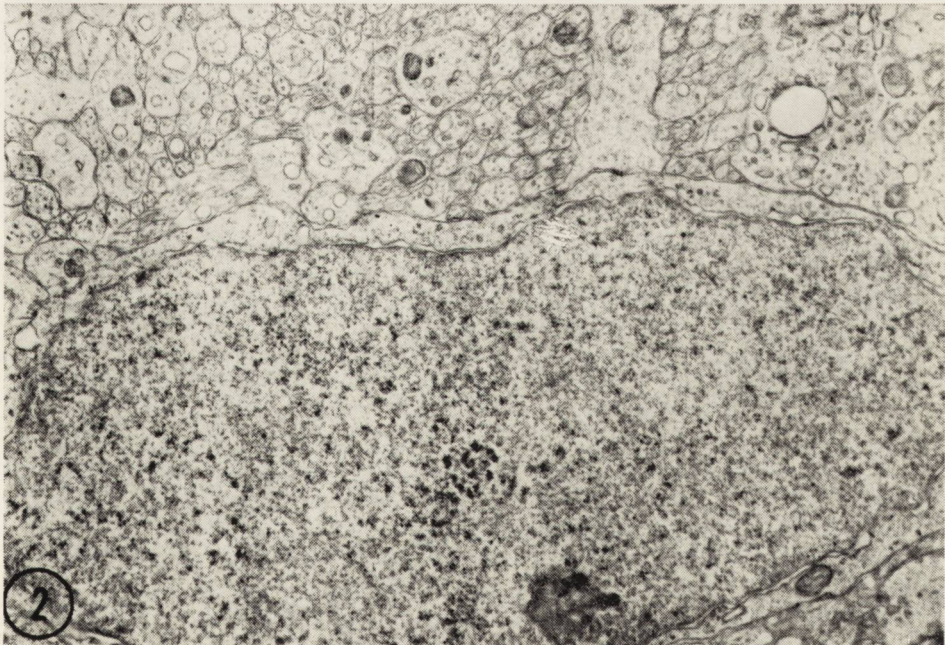
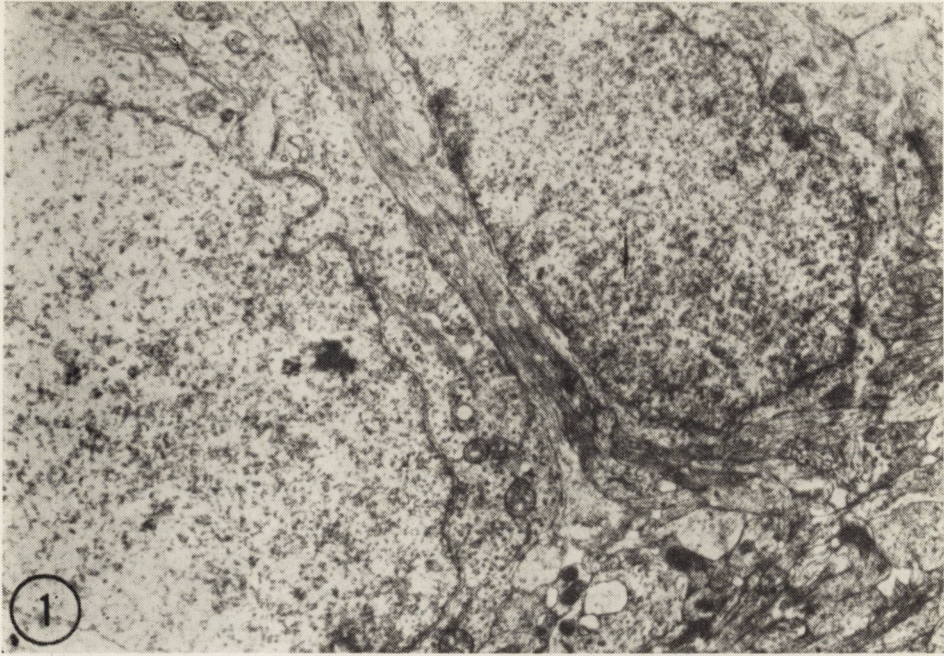
Wykres 1. Zużycie tlenu przez komórkę olbrzymią tworzącą siatkowatego pnia mózgu szczura w następstwie zatrucia CO (w środowisku inkubacyjnym obecny cytochrom c i askorbinian)

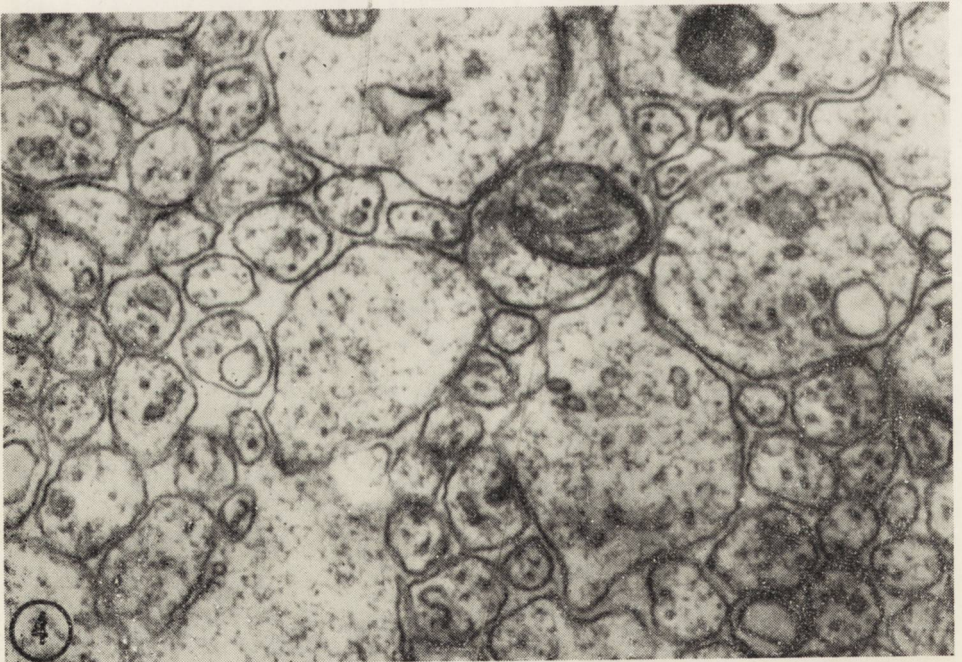
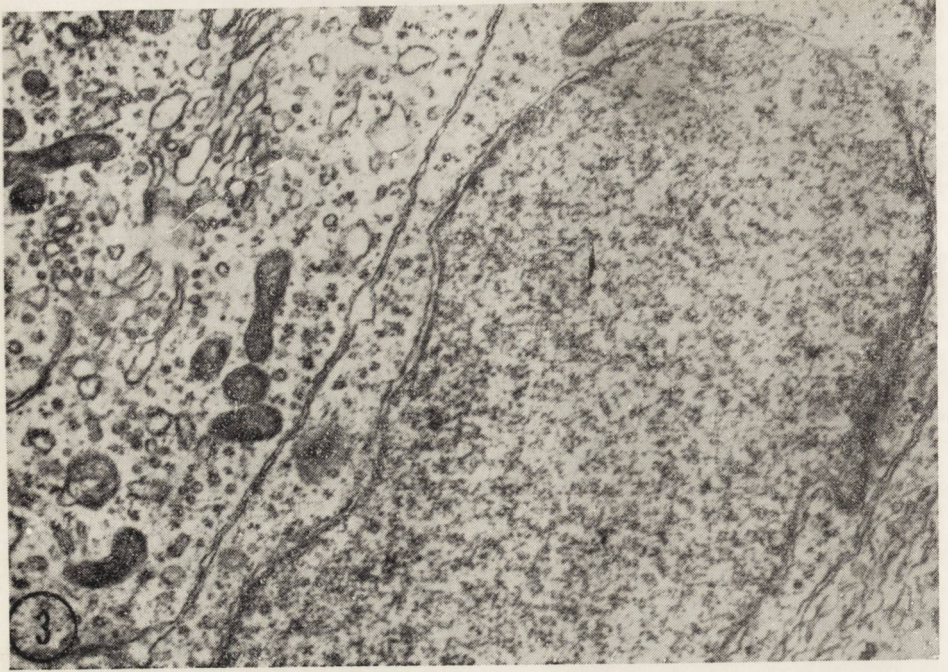
rather large oval nucleus. Uniformly distributed chromatin formed slight condensations near the nuclear membrane. The cytoplasm formed a narrow rim, in some cells enlarged near one pole of the nucleus. It contained numerous free ribosomes and polysomes, and poorly developed rough endoplasmic reticulum. Synapses were not encountered. Cells of the second type (Fig. 2) were less numerous, larger, with a large elongated nucleus containing relatively less condensed chromatin and a prominent nucleolus. The narrow cytoplasmic rim abounded in free ribosomes and contained poorly developed rough endoplasmic reticulum. These cells formed processes and synapses. Besides these cells, in the brain stem medulla of fetuses and newborns single astroblasts were encountered and single more mature neuroblasts with more abundant cytoplasm and numerous mitochondria (Fig. 3). In the group of fetuses and newborn rats subjected to intoxication the above described cells and their processes (Fig. 4) did not show any changes.

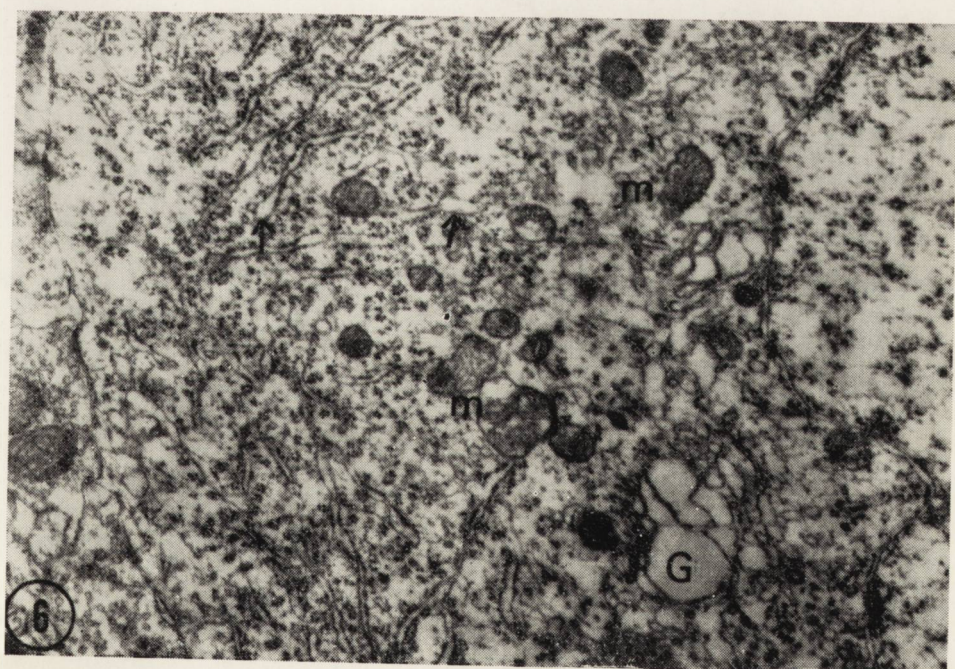
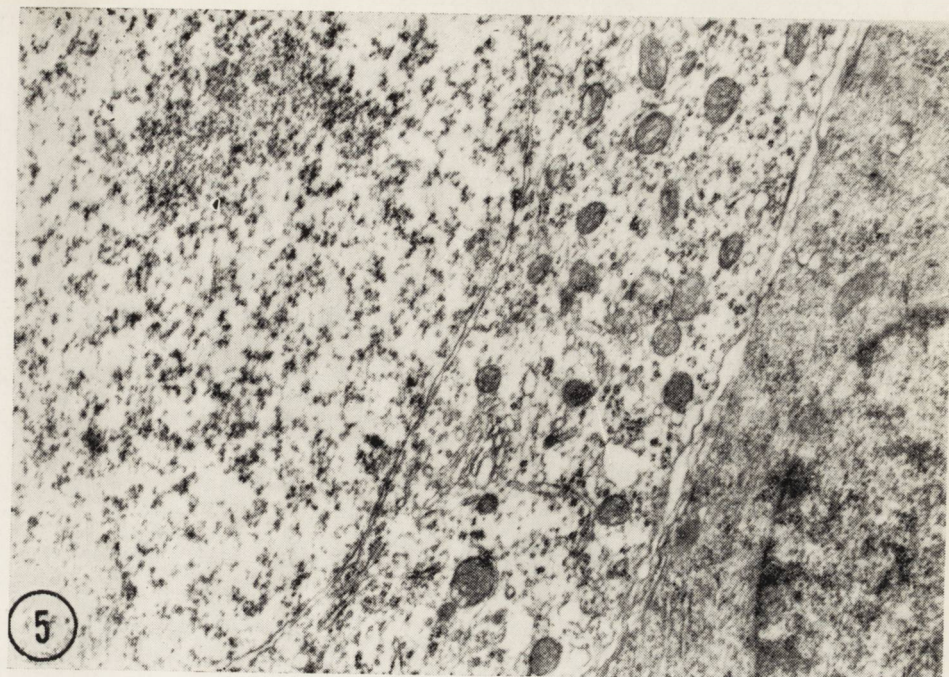
In the group of pregnant females histological examination did not reveal any pathological changes. Twenty four hours after the experiment, glycogen granules were dispersed in single neurons of the medulla. In electron-microscopic examination directly after the experiment nerve and glial cells were unchanged (Fig. 5). Myelin sheaths were normal. After 24 hours nerve cells of pregnant females showed clearing of the matrix of single mitochondria, spotted clearing of hyaloplasm and sometimes vesicular dilatations of endoplasmic reticulum channels and of the Golgi apparatus (Fig. 6). Damage of single mitochondria was seen in oligodendrocytes with normal electronoptical density of cytoplasm. In thicker myelin sheaths irregular structure of layers was observed (Fig. 7). Glycogen deposits were found in astroglial processes, dendrites and perikaryons of nerve cells. After 72 hours regression of ultrastructural changes in the nerve cells and myelin sheaths of pregnant females was noted in the group of females examined 24 hours after intoxication, and the appearance of lysosome-like structures (Fig. 8).

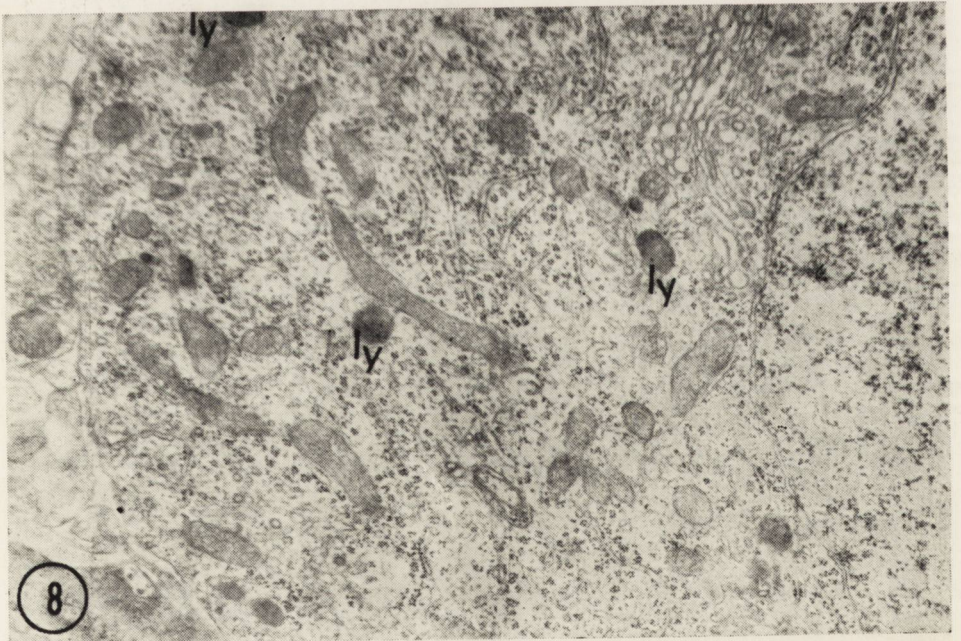
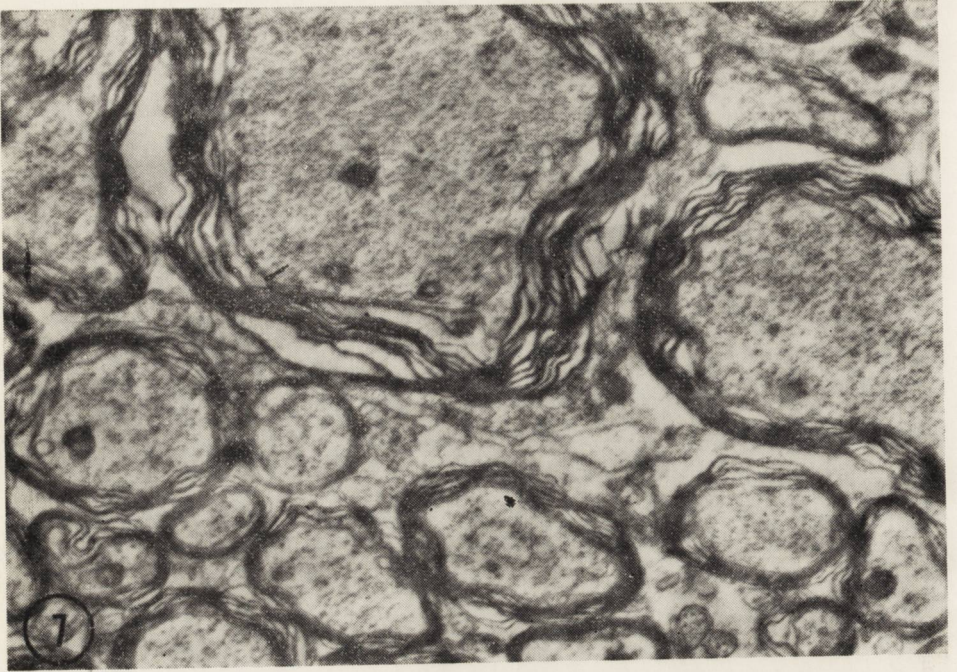
DISCUSSION

The results of our studies show differences in reaction of neurons of the brain stem of pregnant female rats exposed to carbon monoxide intoxication and neurons of fetal and newborn brain stem after transplacental intoxication with this gas. These varying reactions could be due to differences in carboxyhemoglobin content in the blood of mother and fetus. In our studies fetal blood showed an about 7-fold lower level of carboxyhemoglobin in relation to the level of the mother's blood HbCO. Similar results were reported by Longo et al. (1967) in investigations on carbon monoxide passing through the placenta in sheep and by Myers and Ginsberg (1974) in studies on the transplacental action of carbon monoxide on fetal monkey brain. Myers and Ginsberg determining pO_2 in arterial blood of mothers and fetuses during the experiment came to the conclusion that the intensity of morphological changes in fetal brains increases proportionally to the degree of blood anoxia, in-









dependently of the deviations of the low level of carboxyhemoglobin. In females subjected to intoxication, a several-fold higher level of carboxyhemoglobin, with high pO_2 did not lead to the appearance of neurological symptoms, therefore, morphological studies were not carried out. The results of the above presented studies proved once more, that carbon monoxide exerts its action on the organism through anoxia. The report of Zander and Schmidt-Schönbein (1973) indicates that in carbon monoxide intoxication anoxia is caused not only by hemoglobin blocking, but also by oxygen diffusion inhibition in circulating blood.

The different reaction to anoxia of maturing and mature brain may be explained by differences in metabolism of these organs. In our experiments the giant cells of fetal brain stem reacted to carbon monoxide intoxication by an almost 4-fold increase of oxygen consumption as compared with the control. Return to normal values was observed after 24 hours. On the other hand, giant cells of the brain stem of pregnant females after intoxication showed oxygen consumption decline to about 1/4 of control values. Return to normal values was noted after 72 hours. The causes leading to a high increase of oxygen consumption in the presence of ascorbate and cytochrome c, by immature neurons directly after carbon monoxide intoxication have so far not been elucidated. The mechanism may be considered to consist in oxygen consumption stimulation by metabolites (lactate, pyruvate) accumulating in abundance in the brain in conditions of anoxia, and mainly in the maturing brain. Jilek et al. (1964), Mourek (1965) and Drahota et al. (1965) similarly interpret in their studies the reaction to anoxia in maturing brain. The decline of respiratory activity in mature cells indicated disorders of oxidation-reduction processes, among them inhibition of cytochrome oxidase activity.

The results of morphological studies support the conclusions derived from biochemical studies. The cells observed in electron microscopic studies of the fetus and newborn medulla showed only features characteristic for immature cells. The cells noted in our experiment corresponded to those described by Privat and Leblond (1972) in the subependymal layer and in the matrix of brains of young rats. The first type of the described cells may be defined as spongioblasts, or, according to the terminology proposed by Angevine et al. (1970), glioblasts. The second type of cells were immature neurocytes, which in rat reach maturity not sooner than after birth. In mature cells transient disorders of oxidation-reduction processes lead to reversible ultrastructural changes.

The last aspect which requires explanation are the differences in tissue reaction in brains of monkeys and rats during similar dynamics of oxygen monoxide passing through the placenta (Myers and Ginsberg 1974). It seems that they should be not only related to differences between species but also to differences in the rhythm of the nervous system development in these animals.

The authors thank Mrs. Jolanta Opertowska for technical preparation of the material on the basis of the fixing and staining methods of her own modification.

DESCRIPTION OF FIGURES

Fig. 1. Spongioblasts in the medulla of 18-day-old rat fetus, directly after transplacental intoxication with carbon monoxide. No pathological changes. $\times 6\ 300$.

Ryc. 1. Spongioblasty w opuszce 18-dniowego płodu szczura, bezpośrednio po transłożyskowym zatruciu tlenkiem węgla. Bez zmian patologicznych. Pow. $6\ 300\times$.

Fig. 2. Neuroblast in medulla of 19-day-old rat fetus 24 hours after transplacental carbon monoxide intoxication. No pathological changes. $\times 8\ 000$.

Ryc. 2. Neuroblast w opuszce 19-dniowego płodu szczura, po 24 godzinach od transłożyskowego zatrucia tlenkiem węgla. Bez zmian patologicznych. Pow. $8\ 000\times$.

Fig. 3. Immature astrocyte, on the left fragment of cytoplasm of immature neuron in the brain stem of newborn rat 72 hours after transplacental carbon monoxide intoxication. No pathological changes. $\times 12\ 000$.

Ryc. 3. Niedojrzały astrocyt, po lewej fragment cytoplazmy niedojrzałego neuronu w opuszce noworodka szczura, po 72 godzinach od transłożyskowego zatrucia tlenkiem węgla. Bez zmian patologicznych. Pow. $12\ 000\times$.

Fig. 4. Neuropil in medulla of newborn rat 72 hours after transplacental carbon monoxide intoxication. No pathological changes. $\times 36\ 000$.

Ryc. 4. Neuropil w opuszce noworodka szczura, po 72 godzinach od transłożyskowego zatrucia tlenkiem węgla. Bez zmian patologicznych. Pow. $36\ 000\times$.

Fig. 5. Neuron, on the right satellite oligodendrocyte in the brain stem of pregnant female rat, directly after carbon monoxide intoxication. No pathological changes. $\times 10\ 000$.

Ryc. 5. Neuron, po prawej satelitarnej oligodendrocyt w opuszce samicy ciężarnej szczura, bezpośrednio po zatruciu tlenkiem węgla. Bez zmian patologicznych. Pow. $10\ 000\times$.

Fig. 6. Fragment of neuron in medulla of pregnant female rat 24 hours after carbon monoxide intoxication. Mitochondria with clear matrix (m). Dilated channels of the Golgi apparatus (G). Vesicular dilatation of rough endoplasmic reticulum (arrows). Spotted clearings of hyaloplasm (asterisks). $\times 17\ 000$.

Ryc. 6. Fragment neuronu w opuszce samicy ciężarnej szczura, po 24 godzinach od zatrucia tlenkiem węgla. Mitochondria z rozjaśnioną macierzą (m). Poszerzone kanały aparatu Golgiego (G). Kolbkowate rozdęcia siatki szorstkiej (strzałki). Plackowate przejaśnienia hialoplazmy. Pow. $17\ 000\times$.

Fig. 7. Medulla of pregnant female rat 24 hours after carbon monoxide intoxication. Irregular structure of the layers in myelin sheaths. $\times 10\ 000$.

Ryc. 7. Opuszka samicy ciężarnej szczura po 24 godzinach od zatrucia tlenkiem węgla. Nieregularny układ blaszek w osłonkach mielinowych. Pow. $10\ 000\times$.

Fig. 8. Fragment of nerve cell in brain stem of pregnant female rat 72 hours after carbon monoxide intoxication. Lysosomes (ly) in cell cytoplasm. $\times 10\ 000$.

Ryc. 8. Fragment komórki nerwowej w opuszce samicy ciężarnej szczura, po 72 godzinach od zatrucia tlenkiem węgla. W cytoplazmie komórki — lizosomy (ly). Pow. $10\ 000\times$.

L. Dydyk, M. Śmiałek, M. Dąmbska

AKTYWNOŚĆ ODDECHOWA IZOLOWANYCH KOMÓREK OLBRZYMICH TWORU SIATKOWATEGO OPUSZKI I ULTRASTRUKTURA NEURONÓW PNIA MÓZGU SZCZURA W ZATRUCIU TLENKIEM WĘGLA PODCZAS CIĄŻY

Streszczenie

Badania wykonano na 28 ciężarnych samicach szczura rasy Wistar, 24 noworodkach i 32 płodach. Ciężarne samice pozostawiano w 18 dniu ciąży na okres 60 minut w komorze z ciągłym przepływem powietrza zawierającego 1% tlenu węgla. Po wyjęciu z komory poziom karboksyhemoglo-

biny we krwi samic wynosił $73,3 \pm 0,5\%$, we krwi płodów $10,3 \pm 0,25\%$. Materiał do badań pobierano bezpośrednio po wyjęciu zwierząt z komory, 24 i 72 godz. po zatruciu.

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że neurony pnia niedojrzałego mózgu reagują na działanie tlenku węgla odmiennie od neuronów dojrzałego mózgu. W neuronach dorosłego szczura stwierdzono przejściowe obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej (do 77%) bezpośrednio po zatruciu i powrót do wartości kontrolnych po 72 godz. Neurony płodów reagowały na działanie tlenku węgla wzrostem zużycia tlenu o około 43% obserwowanym bezpośrednio po zatruciu i powrotem do normy po 24 godzinach.

Wzrost aktywności oddechowej w komórkach nerwowych pnia mózgu płodu bezpośrednio po działaniu tlenku węgla jest wyrazem stymulacji zużycia tlenu przez metabolity (mleczan, pirogronian) gromadzące się w mózgu niedojrzałym w stanach niedotlenienia i nie wywiera wpływu na ultrastrukturę tych komórek. Zmniejszenie aktywności oddechowej w komórkach nerwowych pnia mózgu samicy ciężarnej bezpośrednio po zatruciu jest wyrazem przejściowego zaburzenia procesów oksydo-redukcyjnych i prowadzi do odwracalnych zmian ultrastrukturalnych.

Л. Дыдык, М. Смялек, М. Домбска

ДЫХАТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ГИГАНТСКИХ КЛЕТОК РЕТИКУЛЯРНОЙ ФОРМАЦИИ И УЛЬТРАСТРУКТУРА НЕЙРОНОВ СТВОЛА МОЗГА КРЫС ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА ВО ВРЕМЯ БЕРЕМЕННОСТИ

Резюме

Исследования были проведены на 28 беременных самках крыс линии Вистар, 24 новорожденных и 32 эмбрионах. Беременных самок помещали на 18 день на 60 минут в камеру с постоянным током воздуха, содержащего 1% окиси углерода. После удаления их из камеры уровень карбоксигемоглобина в крови самок составлял $73,3 \pm 0,5\%$, в крови эмбрионов $10,3 \pm 0,25\%$. Материал для исследований брали непосредственно после отравления, через 24 часа и через 72 часа после отравления.

В нейронах взрослой крысы было обнаружено временное снижение активности цитохромоксидазы (до 77%) непосредственно после отравления и возвращение к контрольным величинам через 72 часа. Нейроны эмбрионов реагировали на воздействие окиси углерода увеличением потребления кислорода на 43%, наблюдаемым непосредственно после отравления и возвращением к норме через 24 часа.

Результаты проведенных исследований показали, что нейроны ствола незрелого мозга реагируют иначе чем нейроны зрелого мозга на гипоксию, вызванную действием окиси углерода.

Рост дыхательной активности, обнаруженный в нервных клетках ствола мозга эмбрионов непосредственно после воздействия окиси углерода отражает стимуляцию потребления кислорода метаболитами (лактат, пировиноградная кислота), накапливающимися в незрелом мозге при состояниях гипоксии и не влияют на ультраструктуру этих клеток. Уменьшение дыхательной активности, обнаруживаемое в нервных клетках ствола мозга беременной самки непосредственно после отравления отражает временные нарушения окислительных восстановительных процессов и ведет к обратимым изменениям ультраструктуры.

REFERENCES

1. Angevine J. B., Bodian D., Coulombre A. J., Edds M. Y., Hamburger V., Jacobson M., Lyser K. M., Prestige M. C., Sidman R. L., Varon S., Weiss P. A. (The Boulder Committee): Embryonic vertebrate central nervous system. Revised Terminology Anat. Rec., 1970, 166, 257—262.
2. Beaudoin A., Gachon J., Butin L. P. et al.: Les consequences foetales de l'intoxication oxy-carbonic de la mère. *Pediatric*, 1969, 24, 539—545.
3. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technol.*, 1959, 34, 95—98.
4. Drahota Z., Hahn P., Mourek J., Trojanova M.: Effect of acetoacetate on oxygen consumption of brain slices from infant and adult rats. *Physiologia Bohemoslovenica*, 1965, 14, 134—136.
5. Hamberger A.: Difference between isolated neuronal and vascular glia with respect to respiratory activity. *Acta Physiol. Scand.*, 1963, 58 (Suppl. 203), 3—58.
6. Hoppe-Kurowska B.: Obraz histologiczny i histochemiczny gliopatii tlenkowej in vitro. *Neuropat. pol.* 1974, 12, 371—385.
7. Jilek L., Fischer J., Krulich L., Trojan S.: The reaction of the brain to stagnant hypoxia and anoxia during ontogenesis. *Progress in Brain Res.*, 1964, 9, 113—131.
8. Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. *Neuronal Alteration I. Acta Neuropath.*, 1972a, 22, 222—234.
9. Ju M. C., Bakay L., Lee J. C.: Ultrastructure of central nervous system after prolonged hypoxia. *Neurologia and blood vesels. II. Acta Neuropath.*, 1972b, 22, 235—244.
10. Korthals J., Mossakowski M. J., Śmiałek M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenkowej. *Neuropat. Pol.*, 1973a, 11, 279—300.
11. Korthals J., Hoppe B., Karwacka H.: Badania mikroskopowoelektronowe nad toksycznym wpływem tlenku węgla na tkankę glejową hodowaną in vitro. *Neuropat. Pol.*, 1973b, 11, 315—322.
12. Longo L. D., Power G. G., Forster II R. E.: Respiratory function of the placenta as determined with carbon monoxide in sheep and dogs. *J. Clin. Invest.*, 1967, 46, 812—817.
13. Longo L. D.: Carbon monoxide in the pregnant mother and fetus and its exchange across the placenta. *Ann. N. J. Acad. Sci.* 1970, 174, 313—317.
14. Mourek J.: Oxidative metabolism in the medulla oblongata of the rat in relation to age metabolic substrates. *Phys. Bohemoslov.*, 1965, 14, 502—506.
15. Myers R. E., Ginsberg M. D.: Fetal brain damage following maternal carbon monoxide intoxication: an experimental study. *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, 1974, 53, 162—174.
16. Privat A., Leblond C. P.: The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *The J. of Comp. Neurol.*, 1972, vol. 146, nr 3, 277—301.
17. Szumańska G.: Obraz histochemiczny mózgu szczura w ostrym zatruciu tlenkiem węgla. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 301—314.
18. Śmiałek M., Sikorska M., Bicz W., Korthals J., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPG-glucose: glycogen-alfa-4-glucoziltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath.*, 1973, 24, 222—231.
19. Whitehead T. P., Worthington N.: The determination of carboxyhemoglobin. *Clin. Chim. Acta*, 1961, 6, 356—358.
20. Zeuthen E.: Growth as related to the cell cycle in single cell cultures of tetrahymena piriformis. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 1953, 1, 239—249.
21. Zander R., Schmidt-Schönbein H.: Intracellular mechanism of oxygen transport in flowing blood. *Respiration Physiol.*, 1973, 19, 279—282.

Author's address: Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Medical Research Centre, 02-093, Warszawa, Pasteura 3.

M. SIKORSKA, B. GORZKOWSKI, G. SZUMAŃSKA, M. ŚMIAŁEK

INCORPORATION OF ^{14}C GLUCOSE INTO GLYCOGEN AND GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN RAT BRAIN FOLLOWING CARBON MONOXIDE INTOXICATION

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

Head: Prof. Dr. M. J. Mossakowski

Department of Radiation Protection and Radiobiology, National Institute of Hygiene

Head: Ass. Prof. Dr. T. Majle

Different types of hypoxia of the central nervous system were observed to lead to transitory changes in glycogen metabolism mainly expressed by the intensification of its biosynthesis and accumulation in the CNS tissue, in particular in astroglia cells (Mossakowski et al., 1968; Ibrahim et al., 1970; Mossakowski, Zelman, 1971; Pronaszko-Kurczyńska et al., 1971). Similar changes were observed as the result of experimental carbon monoxide intoxication (Śmiałek et al., 1973). The effect of glycogen accumulation is related, among others, to the change in glucose-6-phosphate concentration (Watanabe, Passonneau, 1974) which as the principal substrate in the process of glycogen biosynthesis also influences the activity of UDP glucose:glycogen glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) (Basu, Bachhawat, 1961; Suzumo, Vasuluto, 1970).

The aim of the present study was to determine the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) the key enzyme initiating the glucose-6-phosphate metabolism in the hexose monophosphate shunt in rat brain in the conditions of experimental carbon monoxide intoxication, as well as the incorporation of ^{14}C -glucose into glycogen which accumulates in rat brain tissue under those conditions.

MATERIAL AND METHODS

Six-week-old Wistar rats of both sexes were used. Animals were placed in a 60 l chamber through which air was pumped at a constant rate of 1 l/min. For a period of 60 min air contained 1% carbon monoxide, and for the next 30 min pure air was passed. After this time animals were taken out of the chamber and used to experiments in different time groups. Further details of the experimental procedure were described by Korthals et al. (1973). The control group consisted of animals breathing pure air.

Determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity

Rats were tested on the 20th, 30th and 60th minute of exposure to carbon monoxide, immediately after removal from the chamber (time 0) and 1, 4, 6, 24, 48 and 72 hours after intoxication.

Rats under general ether anesthesia were perfused through left heart ventricle with a solution of physiological salt containing 1 mM EDTA. A 20% homogenate was prepared and centrifuged for 20 min at 15 000 RPM and 2°C. The supernatant after centrifugation was used to the determinations. The enzyme activity was determined by the spectrophotometric method according to Löhr and Walter (1963), using the standard Boehringer reagent set containing: 0.05 M triethanolamine buffer, pH 7.6, with the addition of 0.005 M EDTA, 0.01 M NADP and 0.031 M glucose-6-phosphate. Measurements were performed on a Specord spectrophotometer with constant recording of extinction changes at 340 nm wave length. Protein was measured by the method of Lowry (1951).

Histochemical determination of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity

Rats, 3 in each group, were decapitated without narcosis in the following time intervals: immediately after taking them out from the experimental chamber — i.e. at time „0”, and 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 and 120 hours after CO intoxication. For the studies brain hemispheres were cut into blocs in plane passing through chiasma, basal ganglia as well as the cerebellum with medulla. The collected material was frozen in dry ice using in „M-1 embedding matrix for frozen sectioning” (Lipshaw) and cut in a cryostat at -15°C into 14 μ sections. The enzymatic activity was determined histochemically according to Hess et al. (1958).

Incorporation of ^{14}C -glucose into glycogen

Two hours after CO intoxication rats were injected intraperitoneally 30 μCi of ^{14}C -glucose. One hour later the animals were decapitated and the brain hemispheres were collected. Glycogen was isolated from the tissue by the method described by Wolfe et al. (1962) with three additional washings with hot water. The purified compound was hydrolysed in 1 N HCl and the volume of the solution was increased up to 1 ml with water. A 0.1 ml sample was transferred to the scintillator and the radioactivity was measured on a Nuclear Chicago Isocap 300 scintillation counter. The rest of the solution was used for determination of glucose concentration by the colorimetric method of Nelson (1944).

RESULTS

In brains of rats tested on the 20, 30 and 60th minute of exposure to CO and in time 0 the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase exhibited no essential deviation from the control level.

In the group of rats tested 1 hour after taking them out from the chamber a statistically significant ($p \leq 0.001$) increase of the enzyme activity was noticed, amounting to about 33% of the control value. This increase persisted on the same level in animals tested 4 and 6 hours after intoxication.

The brains tested 24 hours after exposure showed the largest increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity by about 94%. In the next time periods, 48 and 72 hours after intoxication, the enzyme activity was decreasing respectively

Table 1. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain following carbon monoxide intoxication

Tabela 1. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w mózgu szczurów w następstwie zatrucia tlenkiem węgla

Time of CO exposure Czas działania CO			Enzyme activity Aktywność enzymu	OD.10 ⁻³ /min/mg protein ΔE.10 ⁻³ /min/mg białka	
A	B	C	$\bar{x} \pm m$	(n)	p
Control Kontrola			51 ± 1.6	(6)	
20 min			54 ± 1.3	(6)	≥ 0.05
30 „			52 ± 0.4	(16)	≥ 0.05
60 „			55 ± 3.3	(10)	≥ 0.05
60 „	30 min		55 ± 0.8	(11)	≥ 0.05
60 „	30 „	1 h	68 ± 5.3	(10)	≤ 0.001
60 „	30 „	4 „	68 ± 1.0	(7)	≤ 0.001
60 „	30 „	6 „	70 ± 1.2	(8)	≤ 0.001
60 „	30 „	24 „	99 ± 7.2	(5)	≤ 0.001
60 „	30 „	48 „	89 ± 1.4	(4)	≤ 0.001
60 „	30 „	72 „	64 ± 0.7	(6)	≤ 0.001

A — time of direct exposure to CO
czas bezpośredniej ekspozycji CO

B — time of animal stay in the chamber after cutting of CO supply
czas pozostawiania zwierząt w komorze po wyłączeniu dopływu CO

C — time of animal survival after taking them out from the chamber for decapitation
czas przeżycia zwierząt po wyjęciu z komory

$\bar{x} \pm m$ — mean ± SEM średnia arytmetyczna ± średni błąd średniej

p — probability prawdopodobieństwo

n — number of animals ilość przebadanych zwierząt

Statistical calculations were performed according to Student's test.

Obliczenia statystyczne wykonano wg wzoru Studenta.

OD — optical density at 340 nm

ΔE — przyrost ekstynkcji przy 340 nm

to the values obtained for the animals tested after 24 hours. The activity was still higher than in the control group, though a tendency of returning to the control value was visible marked (Table 1).

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase determined by the histochemical method was in control conditions expressed by a weak diffusive reaction observed in brain cortex and the white matter and was mainly related to glial cells (Fig. 1). A stronger reaction corresponding to a higher enzyme activity was observed near the basal nuclei.

In brains of animals subjected to CO intoxication an increase of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was observed at time „0” in both white and gray matter, being more pronounced in white brain structures (Fig. 2). In the next time periods from 6 to 24th hour a marked increase of enzyme activity was noticed, expressed by intensive deposits of diformazan in the cytoplasm of perikaryons and glial cell processes, mainly in astrocytes of white matter and in glial cells and several neuronal cells of the brain cortex (Figs 3 and 4). This increased activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase persisted for 5 days after intoxication.

The glycogen content in brains of control animals, amounting to 0.76 ± 0.07 μ moles of glycogen glucose/g of wet tissue, was found to be increased 3 hours after CO intoxication by about 69% reaching the value of 1.28 ± 0.06 μ moles. The increase of glycogen synthesis in this period was expressed by a marked increase of the total radioactivity as related to glycogen from 1 g of brain tissue. This radioactivity amounted to 160% of the control value and the difference was statistically significant. The specific radioactivity expressed in counts (min/ μ mole glycogen glucose per 1 g of brain tissue, being an indication for the participation of labelled glucose in glycogen synthesis comparing to that of the cold glucose, was also statistically significantly higher (by about 54% with respect to the control level; Table 2).

DISCUSSION

The activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in brains of rats subjected to CO intoxication was markedly increased during the period between 1 and 72 hours after intoxication. Histochemical studies demonstrated that this increase mainly concerned astrocytes. A similar change of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity was described by Domańska-Janik (1970) in brains of rats subjected to simple hypoxia and hypoxic-ischemic hypoxia. The causes of the increase of the enzyme activity in these experimental models are not well defined. The possibility exists that the stimulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase was related to the rise of glucose-6-phosphate level, which could have taken place in these experimental conditions as it does in ischemic-hypoxic hypoxia (Watanabe, Passonneau, 1974). This interpretation requires further experimental verification. Nonetheless, whatever the mechanism of this stimulation may be, the present results are

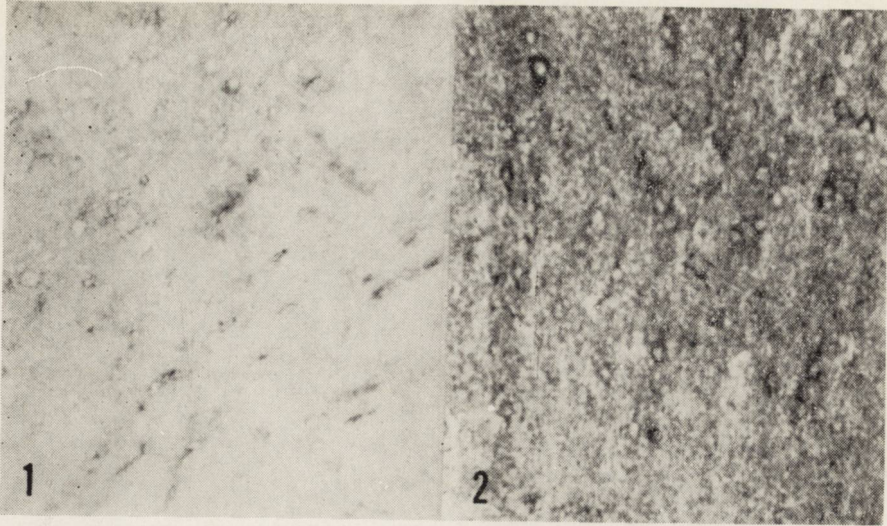


Fig. 1. Weak diffuse activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in posterior commissure and in deeper layers of brain cortex. $\times 200$. Control rat.

Ryc. 1. Słaba dyfuzyjna aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w spoidle wielkim i w głębszych warstwach kory mózgu. Zwierzę kontrolne. Pow. $200 \times$.

Fig. 2. Increased activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat brain cortex tested at time „O”. $\times 200$.

Ryc. 2. Podwyższona aktywność dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej w korze mózgowej szczura badanego w czasie „O”. Pow. $200 \times$.



Fig. 3. Increase of the intensity of the reaction of glucose-6-phosphate dehydrogenase in astrocytes of white matter and in deeper layers of rat brain cortex 6 hours after intoxication (compare with *Fig. 1*). $\times 200$.

Ryc. 3. Zwiększenie intensywności odczynu dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w astrocytach istoty białej i w głębszych warstwach kory mózgu szczura w 6 godzin po zatruciu (porównaj z *ryc. 1*). Pow. $200\times$.

Fig. 4. Increased activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the superficial layers of rat brain cortex 12 hours after CO intoxication (compare with *Figs 1 and 2*). $\times 200$.

Ryc. 4. Podwyższona aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w powierzchniowych warstwach kory mózgu szczura w 12 godzin po zatruciu CO (porównaj z *ryc. 1 i 2*). Pow. $200\times$.

Table 2. ^{14}C glucose incorporation into glycogen in the rat brain following carbon monoxide intoxicationTabela 2. Wbudowywanie się ^{14}C glukozy do glikogenu w mózгах szczurów w następstwie zatrucia tlenkiem węgla

Experimental group Grupa doświadczalna	Total radioactivity counts/min/glycogen of g wet tissue Radioaktywność całkowita impulsy/min/glikogen z 1 g świeżej tkanki		Specific radioactivity counts/min/ μmol glucose Radioaktywność właściwa impulsy/min/ μmol glukozy		Glycogen μmoles glucose/g/wet tissue Glikogen μmole glukozy/g świeżej tkanki		
	% of incorporation % wbudowywania		% of incorporation % wbudowywania		$\bar{x} \pm m$	(n)	p
	\bar{x}	$\bar{x} \pm m$	\bar{x}	$\bar{x} \pm m$	$\bar{x} \pm m$		
Control Kontrola	1777	100	2338	100	0.76 \pm 0.07	(12)	
3 hrs after CO exposure 3 godz. po zatruciu CO	4627	260.4 \pm 27.9	3615	154.6 \pm 36.5	1.28 \pm 0.05	(16)	≤ 0.001

 $\bar{x} \pm m$ — mean \pm SEMśrednia arytmetyczna \pm średni błąd średniej

p — probability

prawdopodobieństwo

n — number of animals

liczba zwierząt

indicative of a general increase of the intensity of changes in the hexose monophosphate shunt and from this point of view a reverse incorporation of tricarboxylic fragments into the Embden-Meyerhof-Parnas shunt with the regeneration of glucose-6-phosphate may be taken into consideration. The activation of hexose monophosphate shunt especially within the period between 6 and 72 hours after CO intoxication may also be related to the activation of protein biosynthesis in glial cells. This activation resulting from CO intoxication was found to be confined to the fraction enriched in glial cells and was accompanied by a significant decrease in the neuronal fraction (Albrecht, Śmiałek, 1975).

Phosphorylation of free glucose is one of the processes taking part in the formation of the glucose-6-phosphate pool, which participates indirectly in glycogen synthesis. The possible involvement of free glucose in this process was investigated in the period from 2 to 3 hours after CO intoxication, when in view of our previous studies, the most intensive glycogen biosynthesis could have taken place. Two hours after intoxication a maximal increase of glycogen synthetase was observed, followed by a maximal increase of glycogen level 2 hours later. The presence of labelled glucose in glycogen isolated from brains of both control and experimental animals is an evidence for the participation of free glucose in this process. As may be seen, this participation became more pronounced after CO intoxication. The difference

between the total and specific activities seems to indicate that the enhancement of glycogen biosynthesis may be resulting not only from the increased participation of free glucose in this process but also from some other metabolic routes affecting the glucose-6-phosphate level. Among the compounds which may be taken into consideration are: glucogenic amino acids, metabolites of the glycolytic chain as well as tricarbonyl fragments of the hexose monophosphate shunt.

The authors wish to thank Ms: Teresa Pańkowska, Teresa Bok, Jolanta Tężycka and Danuta Tuszyńska for skillful technical assistance.

M. Sikorska, B. Gorzkowski, G. Szumańska, M. Śmiałek

WBUDOWYWANIE SIĘ ^{14}C GLUKOZY DO GLIKOGENU ORAZ AKTYWNOŚĆ DEHYDROGENAZY GLUKOZO-6-FOSFORANOWEJ (EC 1.1.1.49) W MÓZGACH SZCZURÓW W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA TLENKIEM WĘGLA

Streszczenie

Badano aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oraz wbudowywanie się ^{14}C glukozy do glikogenu w mózgu szczurów poddawanych zatruciu CO wg metody opisanej przez Korthalsa i wsp. (1973). Dla określenia wbudowywania się glukozy do glikogenu, w 2 godz. po zatruciu CO, szczurom wstrzykiwano dootrzewnowo po 30 μCi ^{14}C glukozy i dekapitowano je po 1 godz. Glikogen oznaczano ilościowo, jako glukozę, metodą kolorymetryczną oraz mierzono radioaktywność ^{14}C glukozy pochodzącej z glikogenu. Aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej oznaczano histochemicznie oraz ilościowo metodą spektrofotometryczną w czasie bezpośredniego działania CO i po intoksykacji.

Bezpośrednie działanie CO nie powoduje istotnych zmian w aktywności dehydrogenazy G-6-P. Między 1 a 6 godz. od wyjęcia zwierząt z komory doświadczalnej aktywność enzymu wzrastała o około 33%, a maksymalny wzrost (o około 95%) stwierdzono po 24 godz. od zatrucia. Począwszy od 48 godz. obserwowano tendencję powrotu aktywności enzymu do normy. Odpowiednio do zmian ilościowych, histochemicznie stwierdzono podobne zmiany w aktywności dehydrogenazy G-6-P, najwyraźniej nasilone w astrocytach. Stwierdzono również wzrost włączania się znakowanej glukozy do glikogenu gromadzącego się w następstwie zatrucia CO.

Wzrost aktywności dehydrogenazy G-6-P może sugerować zwiększenie intensywności przemian w cyklu heksozomonofosforanowym, natomiast wzrost wbudowywania się znakowanej glukozy do glikogenu może świadczyć o zwiększonym udziale wolnej glukozy w procesie wzmożonej biosyntezy glikogenu.

М. Сикорска, Б. Гожковски, Г. Шуманьска, М. Смялек

WKLUCZENIE ^{14}C -GLUKOZY W GLIKOGEN I AKTYWNOŚĆ DEГИДРОГЕНАЗЫ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТА (EC 1.1.1.49) В МОЗГЕ КРЫС ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ ОКИСЬЮ УГЛЕРОДА

Резюме

Исследовалась активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата, а также включение ^{14}C -глюкозы в гликоген в мозге крыс, подвергаемых отравлению CO по методу, описанному Кортальсом и др. (1973). Для определения включения

меченой глюкозы в гликоген, через 2 часа после отравления CO, крысам вводили внутривенно по 30 μ Ci 14 C-глюкозы. Животных декапитировали через 1 час после инъекции меченой глюкозы. Гликоген определяли количественно, в виде глюкозы, калориметрическим методом, а также измеряли радиоактивность 14 C-глюкозы образовавшейся из гликогена. Активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата определяли гистохимически, а также количественно спектрофотометрическим методом во время прямого воздействия CO и после интоксикации.

Во время прямого воздействия CO не были обнаружены значимые изменения в активности фермента. Между 1 и 6 часом с момента выведения животных из экспериментальной камеры активность фермента возрастала на 33%. Максимальный рост активности дегидрогеназы Г-6-Ф (около 95%) был обнаружен через 24 часа после отравления. В очередных временных интервалах, начиная с 48 часов, наблюдалась тенденция к возвращению активности фермента к норме. Соответственно количественным изменениям, в гистохимической картине были обнаружены подобные изменения активности дегидрогеназы Г-6-Ф, наиболее выраженные в астроцитах. Был обнаружен также рост включения меченой глюкозы в гликоген, накапливающийся вследствие отравления CO.

Рост активности дегидрогеназы Г-6-Ф может указывать на увеличение активности превращений в тексомонофосфатном цикле, в то время как рост включения меченой глюкозы в гликоген может свидетельствовать об увеличенном участии свободной глюкозы в процессе усиленного биосинтеза гликогена в мозге экспериментальных крыс.

REFERENCES

1. Albrecht, J.; Śmiałek, M.: Neuronal and glial protein synthesis in rat brain in various models of experimental hypoxia. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1975, in press.
2. Basu, D. K.; Bachhawat, K. K.: Purification of uridine diphosphoglucosylase from sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta (Amst.)*, 1961, 50, 123—128.
3. Domańska-Janik, K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 17—43.
4. Hess, R.; Scarpelli, D. G.; Pearse, A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Pyridine nucleotide linked dehydrogenases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 753—760.
5. Ibrahim, M. Z. M.; Pascoe, E.; Alam, S.; Miquel, J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Path.* 1970, 40, 403—415.
6. Korthals, J.; Mossakowski, M. J.; Śmiałek, M.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny ostrej doświadczalnej encefalopatii tlenokwęglovej. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 279—300.
7. Lohr, G. W.; Walter, H. D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: „Methods of enzymatic analysis.” Ed. Bergmeyer H. U., Ac. Press N. York, 1963, 744—751.
8. Lowry, C. H.; Rosenbrough, S. M.; Farr, A. L.; Randall, R. J.: Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1931, 193, 265—270.
9. Mossakowski, M. J.; Long, D. N.; Meyers, E.; de Curet, H. R.; Klatzo, I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
10. Mossakowski, M. J.; Zelman, I. B.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedoboru tlenowego w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astronautyki, Supl.* 1971, 37—50.
11. Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 1944, 153, 375—380.

12. Pronaszko-Kurczyńska, A.; Mossakowski, M. J.; Ostenda, M.; Korthals, J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu szczura w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 281—194.
13. Suzumo, H.; Vasuluto, T.: Activation of the D to I form conversion of glycogen synthetase by glucose-6-phosphate in bovine spleen. *Biochim. Biophys. Acta* 1970, 212, 179—184.
14. Śmiałek, M.; Sikorska, M.; Korthals, J.; Bicz, W.; Mossakowski, M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose: glycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1973, 24, 222—230.
15. Watanabe, H.; Passonneau, J. V.: The effect of trauma on cerebral glycogen and related metabolites and enzymes. *Brain Research*, 1974, 66, 147—159.
16. Wolfe, L. S.; Klatzo, I.; Miquel, L.; Tobias, C.; Haymaker, W.: Effect of α -particle irradiation on brain glycogen in rat brain. *J. Neurochem.* 1962, 8, 213—218.

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

M. WENDER, B. ZGORZALEWICZ, A. WAJGT

ACTIVITY OF sRNA-AMINO ACYL SYNTHETASES IN EXPERIMENTAL CYANIDE ENCEPHALOPATHY*

Department of Neurology, Medical Academy, Poznań, Poland

In our previous work (Wender et al., 1974) on L-[U-¹⁴C] — leucine and L-[U-¹⁴C] proline incorporation into the postmitochondrial brain fraction, it was established that cyanide encephalopathy is accompanied by disturbances in protein biosynthesis in the brain. We have also found that the time course of alterations in the incorporation of leucine coincides with myelin destruction. This observation might indicate that disturbed protein synthesis in the cerebral white matter constitutes one of the factors (certainly not the only one) which are capable of injuring the myelin sheath in cyanide encephalopathy.

Studies performed in a system in which exogenous energy compounds necessary for protein biosynthesis were added, lead us to assume that cyanide intoxication affects protein biosynthesis at least partially by acting directly upon specific enzymatic processes of protein metabolism. To prove this, we have studied the activity of sRNA-amino acyl synthetases (amino acid: tRNA-ligases (AMP) E.C. 6.1.1.) in experimental cyanide encephalopathy, by evaluating the activation rates of individual amino acids by the crude pH 5 enzyme preparation of the brain, i.e. in protein extracts of acetone powders of the nervous tissue.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white Wistar rats of either sex, 200—250 g of body weight, which were exposed to hydrogen cyanide, according to the method of Levine and Stypulkowski (1959). The experimental groups, each consisting of 10 animals were sacrificed at different intervals following HCN intoxication (after 4, 18, 24 hrs, 7 and 14 days).

Histology. For histological purposes, frozen brain sections were stained by the method of Spielmeyer and H+E, and those embedded in celloidine were stained according to Woelcke, Nissl and H+E.

Chemical studies. The experimental animals were killed by decapitation. The brain

* The work was performed on behalf of the Polish Academy of Sciences (No. 09.4.1.3.)

was immediately removed from the cranial vault and samples of white and gray substance were taken for chemical investigations.

The activation of amino acids by crude enzyme preparations of the brain was studied by the hydroxamic method described by Hoagland (1955) in extracts of acetone powders of the nervous tissue, prepared according to Szafranski and Sułkowski (1959).

Preparation of acetone powders. The brain samples were transferred into an ice-cooled homogenizer and homogenized for 1 min with 5 ml of -30° cold acetone. The homogenized tissue was washed twice with 10 ml of -30° cold acetone on a Büchner's funnel and then dried in vacuum for about 4 hrs.

Enzymatic preparation. 250 mg of the acetone powder were homogenized with 5 ml of 0.02 M Tris buffer, pH 7.8 during 10 min and centrifuged at 0° for 30 min at $10000 \times g$. To the supernatant a saturated solution of ammonium sulphate was added until 0.6 saturation. The obtained mixture was adjusted to pH 5.0 with 0.2 N HCL and then centrifuged at 0° for 5 min at $10000 \times g$. The obtained sediment was dissolved in 0.2 M Tris buffer at pH 7.8 to a volume of 2.5 ml.

The above method of enzymatic preparation eliminates free amino acids present in the acetone powder.

Activation of amino acids. The individual activation of 20 L-amino acids was studied. The incubation mixture contained in a final volume of 1 ml 10 μ moles of $MgCl_2$, 0.2 mole of 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 7.8, 10 μ moles of the L-amino acid, 11 μ moles of Na_2ATP , 1500 μ moles of NH_2OH , 5 μ g of pyrophosphatase, and 0.1 ml of enzymatic preparation. The aqueous solution of salt-free hydroxylamine was prepared according to Beinert et al. (1953). The samples were incubated for 30 min at 37° . The enzymatic reaction was stopped by adding 2.3 ml of Hoagland's reagent (50.5 g of CCl_3COOH , 25 ml of concentrated HCl, and 60.0 g of $FeCl_3$ made up in distilled water to a volume of 1000 ml) and the samples were vigorously shaken and then centrifuged. The intensity of colour reaction in the supernatant was measured on a Spectronom 202 (MOM, Hungary) spectrophotometer at 540 nm. The concentration of hydroxamates formed was derived from a standard curve prepared for the individual amino acid hydroxamates (Sigma Chem. Comp., St. Louis, USA). Control experiments with heat inactivated pH 5 enzymes were carried out for each individual amino acid.

The protein content of enzymic preparations was estimated by the method of Kingsley (1942).

The results are expressed as nmoles of hydroxamates $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein.

RESULTS

Histology. Cytological slices prepared from brains of rats, sacrificed 18 and 24 hours after cyanide intoxication demonstrated frequently some fading of all cellular structures in the central part of the corpus callosum and in the anterior

Table 1. Rates of amino acid activation in cerebral white matter in experimental cyanide encephalopathy

Tabela 1. Aktywacja aminokwasów w istocie białej mózgu w doświadczalnej encefalopatii cyjanowej

Groups of amino acids Grupy aminokwasów	Activating enzyme specific for: Enzym aktywujący swoisty dla:	Normal values Wartości normalne	Time after HCN intoxication Czas po zatruciu HCN				
			4 hrs 4 godz.	18 hrs 18 godz.	24 hrs 24 godz.	7 days 7 dni	14 days 14 dni
A.a. — with an aliphatic side chain	Alanine	0.07±0.005	0.01±0.002	0.01±0.002	0.01±0.003	0.01±0.005	traces
	Glycine	0.18±0.012	0.03±0.004	traces	0.03±0.003	0.03±0.012	traces
Aminokwasy z alifatycznym łańcuchem bocznym	Isoleucine	0.03±0.010	0.01±0.006	traces	0.01±0.005	0.03±0.005	0.01±0.001
	Leucine	0.03±0.010	0.03±0.010	0.01±0.004	0.03±0.025	0.01±0.003	0.02±0.005
	Valine	0.05±0.008	0.03±0.023	0.01±0.002	0.05±0.007	0.02±0.007	0.02±0.005
A.a. — containing a hydroxy group in the aliphatic chain	Serine	0.10±0.013	0.05±0.028	0.02±0.008	0.03±0.018	0.03±0.010	0.02±0.008
	Threonine	0.05±0.007	0.01±0.003	0.01±0.003	0.03±0.018	0.01±0.007	0.01±0.005
Aminokwasy z grupą wodorotlenową							
A.a. — containing sulphur in the aliphatic chain	Cysteine	0.18±0.027	0	traces	0	0.03±0.010	0.01±0.002
	Methionine	0.18±0.018	0.07±0.015	0.02±0.008	0.05±0.013	0.02±0.012	0.05±0.015
Aminokwasy zawierające siarkę							
Acidic a.a. and their respective amides	Aspartic acid	0.05±0.010	0.01±0.004	traces	0.02±0.008	0.01±0.002	0
	Asparagine	0.07±0.010	0.01±0.003	0	0.01±0.008	0.01±0.005	0.01±0.003
Kwaśne aminokwasy i ich amidy	Glutamic acid	0.48±0.061	0.05±0.012	0.12±0.009	0.10±0.025	0.05±0.001	0.07±0.010
	Glutamine	0.13±0.012	0.01±0.001	0.03±0.007	0.02±0.013	0.02±0.008	0.02±0.007
Basic a.a.	Arginine	0.05±0.005	traces	traces	0.01±0.001	0.01±0.002	0.01±0.002
Zasadowe aminokwasy	Histidine	0.18±0.020	0.05±0.015	traces	0.07±0.027	0.03±0.011	0.02±0.007
	Lysine	0.15±0.017	0.03±0.010	0.01±0.006	0.02±0.012	0.03±0.010	0.03±0.017
Aromatic a.a.	Phenylalanine	0.12±0.020	0.05±0.017	traces	0.03±0.018	0.03±0.010	0.02±0.005
Aminokwasy aromatyczne	Tyrosine	0.07±0.008	0.01±0.004	0.01±0.027	0.01±0.002	0.01±0.005	0.11±0.002
	Tryptophan	0.08±0.010	0.03±0.013	0.01±0.005	0.07±0.025	0.05±0.010	0.03±0.010
Imine acid	Proline	0.22±0.022	0.07±0.030	0.02±0.008	0.03±0.023	0.03±0.002	0.03±0.007
Kwas iminowy							

The results are given as the mean of nmoles of hydroxamates . min⁻¹ . mg⁻¹ protein ± standard errorWyniki podano jako średnią w nmolach hydroksamatów . min⁻¹ . mg⁻¹ białka ± średni błąd

Number of animals in each group — 10

Liczba zwierząt w każdej grupie — 10

Table 2. Rates of amino acid activation in cerebral grey matter in experimental cyanide encephalopathy
 Tabela 2. Aktywacja aminokwasów w istocie szarej mózgu w doświadczalnej encefalopatii cyjanowej

Groups of amino acids Grupy aminokwasów	Activating enzyme specific for: Enzym aktywujący swoisty dla:	Normal values Wartości normalne	Time after HCN intoxication Czas po zatruciu HCN				
			4 hrs 4 godz.	18 hrs 18 godz.	24 hrs 24 dni	7 days 7 dni	14 days 14 dni
A.a. — with an aliphatic side chain	Alanine	0.05±0.003	0.02±0.010	traces	0.01±0.001	0.01±0.001	0.01±0.001
	Glycine	0.15±0.017	0.05±0.008	traces	0.01±0.001	0.02±0.005	0.01±0.001
Aminokwasy z alifatycznym łańcuchem bocznym	Isoleucine	0.03±0.008	0.03±0.015	0.01±0.002	0.02±0.003	0.02±0.005	0.01±0.001
	Leucine	0.02±0.007	0.03±0.005	0.01±0.004	0.02±0.005	0.01±0.001	0.05±0.003
	Valine	0.07±0.022	0.02±0.007	0.01±0.006	0.05±0.003	0.02±0.007	0.02±0.010
A.a. — containing a hydroxy group in the aliphatic chain	Serine	0.07±0.010	0.03±0.012	0.01±0.007	0.07±0.030	0.01±0.001	0.02±0.009
	Threonine	0.05±0.007	0.03±0.010	traces	0.03±0.013	0.01±0.001	0.02±0.007
Aminokwasy z grupą wodorotlenową							
A.a. — containing sulphur in the aliphatic chain	Cysteine	0.12±0.020	0.02±0.002	traces	traces	0.01±0.001	0.01±0.001
	Methionine	0.15±0.020	0.03±0.008	0.02±0.008	0.08±0.017	0.15±0.001	0.02±0.001
Aminokwasy zawierające siarkę							
Acidic a.a. and their respective amides	Aspartic acid	0.05±0.007	0.02±0.002	traces	0.01±0.002	traces	traces
	Asparagine	0.03±0.008	0.02±0.003	0	0.01±0.001	traces	0.01±0.001
Kwaśne aminokwasy i ich amidy	Glutamic acid	0.40±0.005	0.07±0.013	0.12±0.023	0.12±0.003	0.07±0.012	0.07±0.010
	Glutamine	0.08±0.013	0.03±0.012	0.02±0.005	0.05±0.008	0.03±0.010	0.03±0.011
Basic a.a.	Arginine	0.05±0.010	0.02±0.005	traces	0.03±0.013	0.01±0.005	0.01±0.001
Zasadowe aminokwasy	Histidine	0.10±0.020	0.08±0.002	0.01±0.001	0.10±0.037	0.02±0.008	0.02±0.007
	Lysine	0.13±0.028	0.05±0.030	0.01±0.007	0.05±0.017	0.03±0.003	0.03±0.007
Aromatic a.a.	Phenylalanine	0.08±0.012	0.03±0.012	traces	0.05±0.003	0.02±0.007	0.03±0.010
Aminokwasy aromatyczne	Tyrosine	0.05±0.008	0.02±0.008	0.01±0.004	0.02±0.012	0.01±0.003	0.02±0.007
	Tryptophan	0.07±0.010	0.03±0.010	0.01±0.006	0.07±0.022	0.03±0.005	0.03±0.008
Imine acid	Proline	0.17±0.015	0.03±0.002	0.03±0.008	0.05±0.028	0.03±0.015	0.02±0.007
Kwas iminowy							

The results are given as the mean nmoles of hydroxamates . min⁻¹ . mg⁻¹ protein ± standard error

Wyniki podano jako średnią w nmolach hydroksamatów . min⁻¹ . mg⁻¹ białka ± średni błąd

Number of animals in each group — 10

Liczba zwierząt w każdej grupie — 10

cerebral commissure. Around these necrotic fields a slight cellular reaction was visible, mainly of glial origin. The subcortical nuclei showed weak but diffuse spongy changes. When stained with the methods of Spielmeyer or Woelcke they showed no apparent alterations in the stainability of myelin demonstrable at this early stage following HCN intoxication.

Marked demyelination was noticed later that is on the 14th day after intoxication. The topography of demyelination was very characteristic, affecting mainly the posterior part of corpus callosum, the anterior commissure and fibres of the internal capsule. Distinct necrotic fields predominantly localized inside the corpus callosum were seen only rarely.

Biochemistry. The results of our study revealed considerable changes in the activity of sRNA-amino acyl synthetases both in the gray and the white matter of the cyanide encephalopathic brains. The decrease of amino acid activation was more severe in the white than in the gray matter. The drop of enzymic activity was already very strong in the early period (4 hrs) after cyanide intoxication, thus indicating that there is no appreciable coincidence between the respective enzymic activity and the time of occurrence of morphological changes in the white matter of the cerebral commissural system (14 days after intoxication). The decrease in the activity of amino acyl synthetases was generalized, and only minor differences between the individual synthetases were noticed. Detailed results of our studies on the activity of sRNA-amino acyl synthetases in the white matter in experimental cyanide encephalopathy are presented in Table 1 and the respective data concerning the gray matter in Table 2.

DISCUSSION

Hypoxia is one of the acknowledged factors capable of producing diffuse demyelination in the central nervous system, as for instance in some cases of cerebral arteriosclerosis, in cases of cardiac arrest or following carbon monoxide poisoning. In experimental conditions, acute or chronic cyanide intoxication constitutes one of the classical methods, by means of which demyelination characterized by a fairly uniform pathomorphological picture, i.e. by myelin decomposition of the commissural systems (commissura magna and anterior) as well as of the internal capsule may be produced.

The pathomechanism of demyelination in cyanide encephalopathy is unsolved so far in spite of the fact that many biochemical disturbances in the nervous tissue have been found to accompany this intoxication. In our earlier studies (Wender et al., 1973, 1974) on cyanide encephalopathy we have established considerable alterations in the composition and metabolism of basic chemical compounds constituting the myelin sheaths. Among these deviations, the observed decrease of protein biosynthesis in the nervous tissue seems to be of high significance. However the problem arises whether the decreased incorporation of amino acids into proteins of the nerv-

ous tissue was due to the effect of cyanides on energy furnishing compounds that are necessary to promote protein biosynthesis, or to the inhibitory influence on enzymic systems involved in protein biosynthesis itself. Kleihues and Hossmann (1971) have demonstrated a clear correlation between the decrease of L-[^{14}C] leucine incorporation into brain proteins and the depletion of energy rich compounds (ATP and phosphocreatine).

The presented findings, demonstrate a substantial inhibitory effect of cyanide intoxication on the activity of the enzymes active at the preliminary stage of protein biosynthesis, i.e. a very strong depression of the activity of all sRNA-amino acyl synthetases.

Our previous experiments have shown that the time course of alterations in the incorporation of labelled leucine into the postmitochondrial fraction of the nervous tissue in cyanide encephalopathy is biphasic, with lowest values observed a few hours and fourteen days after intoxication, and with approximately normal values in the intermediate period. This observation seems to be of significant value because the late drop in labelled leucine incorporation into the white matter coincides in time with the appearance of severe myelin destruction. However the incorporation of labelled proline in cyanide intoxication followed another pattern.

It is commonly accepted that the amino acids, before becoming incorporated into proteins, react with adenosine triphosphate, the reaction being catalyzed by a specific enzyme, sRNA-amino acyl synthetase, to yield the enzyme bound amino acyl adenylic anhydrate. However, there are suggestions in the literature, which assume that the basic concept of the obligatory formation of an intermediate amino acyl adenylate is not unquestionable. Loftfield and Eigner (1969) have shown that the formation of valyl-hydroxamate did not require the occurrence of the valyl-adenylate enzymic complex, and one stage lysyl-sRNA formation was postulated by Marshal and Zamecnik (1970). Notwithstanding these inconsistencies, we were inclined to expect that by using hydroxylamine as trapping agent for activated amino acids as the exponent for activation rates of individual amino acids we shall be able to find some correlation between the incorporation rates of labelled leucine and proline into cerebral proteins and the activity of enzymes specific for these amino acids. Unfortunately, there was no noticeable correspondence between the specific enzyme activities and the incorporation rates of the respective amino acids, neither was there any correlation to be seen with respect to the time course of alterations. The decrease of incorporation of labelled leucine was biphasic and more pronounced than that of proline, while the activity of leucine specific sRNA synthetase like that of other amino acids showed relatively minor changes. On the other hand proline — sRNA synthetase activity was markedly decreased in cyanide encephalopathy.

The above discussed discrepancy may partially be explained by the already very low activity of leucyl — sRNA synthetase in the normal rat brain, what makes the results liable to erroneous interpretation when the activity of this enzyme is further reduced in the pathological conditions.

However, the apparent inconsistency in results appertaining to two different stages of protein biosynthesis may also be interpreted in a different way. First of all, we would like to point to the studies of Bergmann et al., (1961) and those of Loftfield and Eigner (1966), showing that the specificity of amino acyl sRNA synthetases in distinguishing between individual amino acids is not absolute, at least with respect to chemically closely related ones. Specificity studies of Bergmann et al. (1961) showed that leucyl- and methionyl-sRNA synthetases are highly specific for a single naturally occurring amino acid, whereas isoleucyl-sRNA synthetase formed l-valyl adenylate at about one half the rate of l-isoleucyl adenylate formation, and valyl sRNA synthetase utilized threonine at about 30% the rate of valine. Using the valine and isoleucine-activating enzymes Loftfield and Eigner (1966) observed also differences in the specificity of these enzymes in pyrophosphate exchange, hydroxamate formation and sRNA acylation. It should also be mentioned that a particular synthetase may charge several isoacceptors. Thus, in calf brain Murthy et al. (1974) found two isoacceptor tRNAs for glutamate, three for glutamine, two for aspartate and one for asparagine.

On the other hand, as stressed by Patelski et al. (1972/73) there are also numerous objections as to drawing comparisons between the activation rates and metabolism of particular amino acids in different proteins, and the complexity of the enzyme and transfer systems should be taken into account.

Our investigations, in spite of not being able to closely correlate in time the observed metabolic deviations, with the onset of morphological events following cyanide intoxication, i.e. with the occurrence of diffuse demyelination, have clearly demonstrated that in this experimental disease we are dealing with severe disturbances of cerebral protein metabolism.

M. Wender, B. Zgorzalewicz, A. Wajgt

AKTYWNOŚĆ SYNTETAZ sRNA-AMINO ACYLOWYCH W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII CYJANOWEJ

Streszczenie

Badano aktywność syntetaz sRNA amino acylowych w istocie białej i szarej mózgu szczurów, u których encefalopatię wywołano przez inhalację HCN, metodą opisaną przez Levine i Stypulkowskiego. Aktywność syntetaz badano metodą hydroksamową Hoaglanda w proszku acetonowym tkanki nerwowej. Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Aktywność wszystkich syntetaz sRNA-amino acylowych ulega wyraźnemu obniżeniu w istocie szarej i białej mózgu w encefalopatii cyjanowej.

2. Spadek aktywacji aminokwasów jest w encefalopatii cyjanowej wyższy w istocie białej niż szarej mózgu.

3. Obniżenie aktywności syntetaz sRNA amino acylowych jest bardzo znaczne już w pierwszych godzinach po zatruciu cyjankami, tak iż nie stwierdza się korelacji czasowej pomiędzy pojawieniem się demielinizacji a spadkiem aktywacji aminokwasów.

4. Obniżenie procesu biosyntezy białka w encefalopatii cyjanowej jest uzależnione przynajmniej częściowo od hamującego działania cyjanków na aktywność syntetaz sRNA amino acylowych.

М. Вендер, Б. Згожалевич, А. Вайгт

АКТИВНОСТЬ АМИНОАЦИЛ-СПНК-СИНТЕТАЗ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦИАНИСТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Исследовали активность СПНК-аминоацил-синтеаз в белом и сером веществах мозга крыс, у которых вызывали энцефалопатию ингаляцией HCN по методу, описанному Левиным и Стыпулковским. Активность синтеаз изучали гидроксамовым методом Хогланда в ацетоновых порошках нервной ткани.

Результаты исследований привели к следующим выводам:

1. Активность всех аминоацил-СПНК-синтеаз заметно снижается в сером и белом веществах мозга при цианистой энцефалопатии.
2. Снижение активирования аминокислот при цианистой энцефалопатии в белом веществе больше, чем в сером веществе мозга.
3. Снижение активности СПНК-аминоацил-синтеаз является значительным уже в первые часы после цианистого отравления; не обнаруживается корреляции между появлением демиелинизации и снижением активирования аминокислот.
4. Снижение процесса биосинтеза белка при цианистой энцефалопатии зависит, по крайней мере частично, от ингибирующего воздействия цианидов на активность СПНК-аминоацил-синтеаз.

REFERENCES

1. Beinert, H., Green, D., Hele, P., Hift, H., Korff, R., Ramakrishnan, C.: The acetate activating enzyme system of heart muscle. *J. biol. Chem.* 1953, 203, 35—43.
2. Bergmann, F., Berg, P., Dickmann, M.: The enzymic synthesis of amino acyl derivatives of ribonucleic acid. *J. biol. Chem.* 1961, 236, 1735—1740.
3. Hoagland, M.: An enzymatic mechanism for amino acid activation animal tissues. *Biochim. biophys. Acta* 1955, 16, 288—289.
4. Kingsley, M.: The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. *J. Lab. clin. Med.* 1942, 27, 840—846.
5. Kleihues, P., Hossmann, K.: Protein synthesis in the cat brain after prolonged cerebral ischemia. *Brain Res.* 1971, 35, 409—418.
6. Levine, S., Stypulkowski, W.: Experimental cyanide encephalopathy. *Arch. Pathol.* 1959, 67, 306—323.
7. Loftfield, R., Eigner, E.: The specificity of enzymic reactions aminoacyl — soluble RNA ligases. *Biochim. Biophys. Acta* 1966, 130, 426—448.
8. Loftfield, R., Eigner, E.: Mechanism of action of amino acid transfer ribonucleic acid ligases. *J. biol. Chem.* 1969, 244, 1746—1754.
9. Loftfield, R., Vanderjagt, D.: The frequency of errors in protein biosynthesis. *Biochem. J.* 1972, 128, 1353—1356.
10. Marschall, R., Zamecnik, P.: Aspects of the kinetic properties of lysyl-tRNA synthetase from *Esherichia coli* strain B. *Biochim. biophys. Acta* 1970, 198, 376—385.
11. Murthy, M., Roux, H., Thenot, J.: Isoacceptor tRNAs for glutamate, glutamine, aspartate and asparagine in calf brain. *J. Neurochem.* 1974, 22, 19—22.
12. Patelski J., Waligóra, Z., Zgorzalewicz, B., Szulc, S.: Activation of amino acids in the aorta. *Enzyme* 1972/73, 14, 297—310.

13. Szafrński, P., Sułkowski, E.: Activation of amino acids in various organs of the guinea-pig. *Acta biochim. pol.* 1959, 6, 133—141.
14. Wender, M., Piechowski, A., Wajgt, A.: Soluble cerebral proteins in experimental demyelinating processes. *Exp. Path.* 1972, 7, 290—297.
15. Wender, M., Adamczewska, Z., Wajgt, A.: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 417—425.
16. Wender, M., Piechowski, A., Wajgt, A.: The activity of arylsulphatases in experimental cyanide encephalopathy. *Exp. Path.* 1974, 9, 122—124.
17. Wender, M., Zgorzalewicz, B., Wajgt, A.: Protein synthesis in vitro by the rat brain in course of experimental cyanide encephalopathy. *Exp. Path.* 1974, 9, 140—143.

Authors' address: Department of Neurology, Institute of Nervous and Sensory Organs Diseases Medical Academy, 60-355 Poznań, Poland, 49 Przybyszewskiego Str.

M. WENDER, B. ZGORZALEWICZ, A. PIECHOWSKI

ACTIVITY OF sRNA-AMINO ACYL SYNTHETASES IN TET-INDUCED BRAIN OEDEMA*

Department of Neurology, Medical Academy, Poznań, Poland

Our previous studies (Wender et al., 1974) involving tracing of L-[¹⁴C]-leucine and L-[¹⁴C]-proline incorporation into the postmitochondrial fraction of the brain in TET induced brain oedema demonstrated a pronounced reduction of labelled leucine incorporation, particularly in the white matter. The decrease of incorporation rates of labelled proline was less pronounced, although still significant for the white matter. The results suggesting a diminished protein biosynthesis as a possible metabolic cause of the white matter lesion in TET intoxication needs further explanation as to the precise mechanisms responsible for this effect. One of the possible ways is to study enzyme activities involved in the initial stage of protein biosynthesis. That is why we have undertaken investigations on the activity of sRNA-amino acyl synthetases using the hydroxamic method of Hoagland (1952).

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on white Wistar rats in which acute cerebral oedema was induced by intraperitoneal administration of triethyl tin sulphate (TET) at a dose of 4 mg per kg of body weight. The experimental groups comprised animals sacrificed 5 and 24 hours and 28 days following TET administration, respectively.

Histology

For routine histological examinations, frozen brain sections were stained according to Spielmeyer as well as with H+E. The paraffine-embedded material was stained according to the methods of Klüver-Barrera, Nissl and with H+E. Celloidine embedded material was stained according to Woelcke-Heidenhain, as well as with the Nissl and H+E techniques.

* The work was performed on behalf of the Polish Academy of Sciences (No. 09.4.1.3.)

Chemical studies

The experimental animals were sacrificed by decapitation. The brains were instantly removed from the cranial vault and samples of the white and gray matter were immediately taken for chemical investigations. The number of animals in each experimental group comprised 10. Results obtained from the experimental groups were compared with those of the control one. The activation of amino acids by the crude pH 5 enzyme preparations of the brain was studied by the hydroxamic method described by Hoagland (1955) in extracts of acetone powders of the nervous tissue, prepared according to Szafrński and Sułkowski (1959). Details of the assay were reported in our previous work published in the same issue (Wender et al.).

The protein content of the enzyme preparation was estimated by the method of Kingsley (1942).

The results were expressed as nmoles of hydroxamates. min^{-1} , mg^{-1} protein.

RESULTS

Histology. Tissue sections stained with haematoxylin-eosin and with the Klüver-Barrera technique showed diffuse spongy changes in the form of irregular and sharply demarcated empty spaces in the cerebral white matter. Observations made in the light microscope did not reveal in any stage of the experimental disease neither fading of myelin nor demyelination. Preparations of the cerebral cortex and other gray structures stained with the Nissl's method showed some widening of the Virchow-Robin space and acute or vacuolar degeneration of single neurocytes. These morphological changes were found in all experimental animal series both in the acute and chronic periods of the experimental disease. However, in the affected white matter neither a mesenchymal nor glial reaction was demonstrable.

Biochemistry. The activation rates of several individual amino acids were significantly changed in the white matter of the affected brains. At an early period of the experiment (5 hrs after intoxication) the activation of asparagine, glutamic acid and of lysine by sRNA-amino acyl synthetases was decreased, while that of isoleucine, glutamine and tryptophan was enhanced. The next experimental group — studied 24 hrs after TET intoxication exhibited in general similar results. The activation rates of alanine, glycine, serine, cysteine, methionine, asparagine, glutamic acid, lysine, tyrosine and of proline due to sRNA-amino acyl synthetase activity were depressed most significantly. The previously observed increase of activity of some sRNA synthetases was no longer detectable. In the chronic stage of the experiment (28 days after TET intoxication), the changes in amino acid activating enzyme activities concerned a considerably smaller number of enzymes. The following synthetases — specific for alanine, cysteine, methionine, glutamic acid, tyrosine and proline were still depressed, but none of them was increased (Table 1).

Table 1. Rates of amino acid activation in cerebral white matter in triethyl tin intoxication

Tabela 1. Aktywacja aminokwasów w istocie białej mózgu w zatruciu trójetylkiem cyny

Groups of amino acids Grupy aminokwasów	Activating enzyme specific for: Aktywujący enzym swoisty dla:	Normal values Wartości normalne	Time after TET intoxication Czas po zatruciu TET		
			5 hrs 5 godz.	24 hr 24 godz.	28 days 28 dni
A.a. — with an aliphatic side chain	Alanine	0.07±0.005	0.07±0.008	0.03±0.003	0.03±0.003
	Glycine	0.18±0.012	0.12±0.012	0.08±0.005	0.12±0.010
Aminokwasy z alifatycznym łańcuchem bocznym	Isoleucine	0.03±0.010	0.10±0.005	0.07±0.007	0.08±0.002
	Leucine	0.03±0.010	0.07±0.012	0.02±0.003	0.03±0.003
	Valine	0.05±0.008	0.07±0.005	0.05±0.005	0.05±0.003
A.a. — containing a hydroxy group in the aliphatic chain	Serine	0.10±0.013	0.10±0.005	0.05±0.007	0.10±0.008
	Threonine	0.05±0.007	0.07±0.005	0.05±0.005	0.05±0.003
Aminokwasy z grupą wodorotlenową					
A. a. — containing sulphur in the aliphatic chain	Cysteine	0.18±0.017	0.15±0.007	0.10±0.003	0.08±0.005
	Methionine	0.18±0.018	0.15±0.005	0.08±0.010	0.08±0.008
Aminokwasy zawierające siarkę					
Acidic a.a. and their respective amides	Aspartic acid	0.05±0.010	0.07±0.005	0.05±0.007	0.05±0.002
	Asparagine	0.07±0.010	0.02±0.005	0.01±0.002	0.08±0.005
Kwaśne aminokwasy i ich amidy	Glutamic acid	0.48±0.031	0.33±0.012	0.27±0.015	0.27±0.007
	Glutamine	0.13±0.022	0.22±0.013	0.10±0.013	0.12±0.005
Basic a. a.	Arginine	0.05±0.005	0.12±0.012	0.08±0.005	0.07±0.003
	Histidine	0.18±0.020	0.18±0.012	0.15±0.012	0.13±0.002
Zasadowe aminokwasy	Lysine	0.15±0.016	0.08±0.008	0.07±0.010	0.12±0.013
Aromatic a. a.	Phenylalanine	0.12±0.020	0.18±0.010	0.12±0.005	0.12±0.003
	Tyrosine	0.07±0.008	0.05±0.005	0.02±0.003	0.03±0.002
Aminokwasy aromatyczne	Tryptophan	0.08±0.010	0.18±0.017	0.13±0.008	0.13±0.013
Imine acid Kwas iminowy	Proline	0.22±0.022	0.15±0.010	0.10±0.012	0.12±0.007

The results are given as the mean of nmoles of hydroxamates.min⁻¹.mg⁻¹ protein ± standard error

Wyniki podano jako średnią w nmolach hydroksamatów.min⁻¹.mg⁻¹ białka ± średni błąd

The gray matter of TET intoxicated animals showed changes similar to those observed in the white matter, although the extent to which the enzymic activities were depressed was generally less pronounced than in the white matter, except for the asparagine-specific synthetase which was most severely impaired (Table 2).

Table 2. Rates of amino acid activation in cerebral grey matter in triethyl tin intoxication

Tabela 2. Aktywacja aminokwasów w istocie szarej mózgu w zatruciu trójetylkciem cyny

Groups of amino acids Grupy aminokwasów	Activating enzyme specific for: Aktywujący enzym swoisty dla:	Normal values Wartości normalne	Time after TET intoxication Czas po zatruciu TET		
			5 hrs 5 godz.	24 hrs 24 godz.	28 days 28 dni
A. a. — with an aliphatic side chain Aminokwasy z alifatycznym łańcuchem bocznym	Alanine	0.05±0.003	0.07±0.012	0.03±0.003	0.03±0.002
	Glycine	0.15±0.017	0.10±0.015	0.08±0.007	0.10±0.008
A. a. — containing a hydroxy group in the aliphatic chain Aminokwasy z grupą wodorotlenową	Isoleucine	0.03±0.008	0.10±0.012	0.07±0.005	0.07±0.003
	Leucine	0.02±0.007	0.07±0.008	0.02±0.003	0.03±0.002
	Valine	8.07±0.022	0.05±0.005	0.05±0.007	0.03±0.003
A. a. — containing sulphur in the aliphatic chain Aminokwasy zawierające siarkę	Serine	0.07±0.010	0.10±0.007	0.05±0.007	0.08±0.007
	Threonine	0.05±0.007	0.07±0.005	0.05±0.005	0.03±0.002
A. a. — containing sulphur in the aliphatic chain Aminokwasy zawierające siarkę	Cysteine	0.12±0.018	0.13±0.005	0.10±0.005	0.07±0.002
	Methionine	0.15±0.020	0.12±0.008	0.08±0.010	0.07±0.005
Acidic a. a. and their respective amides Kwaśne aminokwasy i ich amidy	Aspartic acid	0.05±0.007	0.05±0.005	0.03±0.005	0.03±0.001
	Asparagine	0.05±0.008	0.02±0.005	traces	0.05±0.001
Basic a. a. Zasadowe aminokwasy	Glutamic acid	0.40±0.017	0.32±0.013	0.25±0.013	0.25±0.005
	Glutamine	0.08±0.013	0.18±0.015	0.12±0.008	0.12±0.007
Aromatic a. a. Aminokwasy aromatyczne	Arginine	0.05±0.010	0.08±0.008	0.07±0.005	0.05±0.002
	Histidine	0.10±0.020	0.18±0.010	0.13±0.012	0.13±0.007
	Lysine	0.13±0.028	0.08±0.007	0.07±0.008	0.10±0.008
Imine acid Kwas iminowy	Phenylalanine	0.08±0.012	0.17±0.012	0.10±0.008	0.10±0.005
	Tyrosine	0.05±0.008	0.05±0.003	0.02±0.005	0.03±0.002
	Tryptophan	0.07±0.010	0.15±0.013	0.12±0.008	0.12±0.007
	Proline	0.17±0.015	0.13±0.008	0.10±0.010	0.10±0.005

The results are given as the mean of nmoles of hydroxamates $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein \pm standard error
Wyniki podano jako średnią w nmolach hydroksamatów $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka \pm średni błąd

DISCUSSION

Brain oedema provoked by alkyl tin compounds is characterized by selective impairment of the white matter with formation of vacuoles between myelin sheaths. Biochemical studies have revealed a number of deviations in the content, composition and metabolism of proteins in TET induced brain oedema, without revealing increased cell membrane permeability. Our studies have demonstrated increased

contents of cerebral soluble proteins (Wender et al., 1972) resulting probably from some changes in the physicochemical properties of structural proteins leading subsequently to an increased water-binding capacity of these proteins.

The results of the investigations on cell-free protein synthesis in these experimental conditions seem to indicate that the above mentioned increase in the soluble protein level in oedematous brain cannot be interpreted in terms of increased protein biosynthesis. The obtained results clearly indicate that triethyl tin intoxication exerts an inhibitory effect on the activity of several sRNA-amino acyl synthetases of the white and gray matter. The obvious selectivity of this effect, as emerging from the fact that only a part of the amino acids-activating enzymes was affected should be underlined. However the observed alterations within the initial stage of protein biosynthesis in the white matter, explain the previously observed decrease of amino acid incorporation rates only partially. They also should be regarded only as one of the factors, and certainly not the most important one, in the pathomechanism of TET-induced lesion of the cerebral white matter. The complexity of this problem is shown by the fact that in the acute stage of intoxication, some of the synthetases displayed increased activities, as for instance the leucine-specific enzyme. On the other hand, this very amino acid happened to be incorporated into cerebral proteins (in a cell free, in vitro system) at markedly decreased rates. A similar, although not identical controversy between the amino acid activation and incorporation rates was observed in our study on experimental cyanide encephalopathy. When discussing this, we pointed to the complexity of the enzyme and transfer systems involved in protein biosynthesis, as well as to the relatively low specificity of the individual amino acid synthetases and to the possibility that in special conditions the amino acids may be incorporated without being previously activated (Lofthfield et al., 1969; Patelski et al., 1972/73). All these problems, indicated here only very briefly and discussed elsewhere in detail (Wender et al., 1975) apply to the experimental conditions created by TET intoxication.

M. Wender, B. Zgorzalewicz, A. Piechowski

AKTYWNOŚĆ SYNTETAZ sRNA-AMINO ACYLOWYCH W OBRZĘKU MÓZGU WYWOŁANYM ZATRUCIEM TRÓJETYLKIEM CYNY

Streszczenie

Badano aktywność syntetaz sRNA-amino acylowych w istocie białej i szarej mózgu szczurów Wistar, u których cytotoksyczny obrzęk mózgu wywołano przez zatrucie podanym dootrzewnowo trójetylkiem cyny, w ilości 4 mg na kg wagi ciała. Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. We wczesnym okresie zatrucia trójetylkiem cyny występuje obniżenie aktywności części syntetaz sRNA-amino acylowych w istocie białej i szarej mózgu. Niektóre syntetazy wykazują w tym okresie wzrost w stosunku do wartości kontrolnych.
2. W przewlekłym okresie zatrucia trójetylkiem cyny istnieje obniżenie aktywności syntetaz swoistych dla alaniny, cysteiny, metioniny, kwasu glutaminowego, tyrozyny i proliny.

3. Stwierdza się wyraźną selektywność wpływu zatrucia trójetylkciem cyny na poszczególne syntetazy sRNA-amino acylowe w mózgu.

4. Nie stwierdza się wyraźnej korelacji pomiędzy zmianami aktywności syntetaz sRNA-amino acylowych a inkorporacją danych aminokwasów w przebiegu zatrucia trójetylkciem cyny.

5. Zmiany w początkowej fazie biosyntezy białka zdają się być tylko jednym, i to nie najważniejszym czynnikiem w patomechanizmie wywołanego przez trójetylkek cyny uszkodzenia istoty białej mózgu.

M. Вендер, Б. Згожалевич, А. Пеховски

АКТИВНОСТЬ АМИНОАЦИЛ-СПНК-СИНТЕТАЗ ПРИ ОТЕКЕ МОЗГА ВЫЗВАННЫМ ОТРАВЛЕНИЕМ ТРЕХОКИСЬЮ ОЛОВА

Резюме

Исследовали активность аминоксил-СПНК-синтетаз в белом и сером веществах мозга крыс линии Вистар, у которых вызывали цитотоксический отек мозга отравлением трехокисью олова, введенным внутривбрюшинно в количестве 4 мг на кг веса тела.

Результаты исследований привели к следующим выводам:

1. В ранний период отравления трехокисью олова наблюдается снижение активности некоторых аминоксил-СПНК-синтетаз в белом и сером веществах мозга. Другие же оказываются повышенным по сравнению с контрольными величинами.

2. В хронический период отравления трехокисью олова наблюдается снижение активности специфических синтетаз аланина, цистеина, метионина, глутаминовой кислоты, тирозина и пролина.

3. Обнаруживается четкая избирательность влияния отравления трехокисью олова на отдельные аминоксил-СПНК-синтетазы мозга.

4. При отравлении трехокисью олова не обнаруживается четкой корреляции между изменениями активности аминоксил-СПНК-синтетаз и включением соответствующих аминокислот.

5. Изменения в начальной фазе биосинтеза белка, по-видимому, являются единственным и к тому же не самым главным фактором в патомеханизме вызванного трехокисью олова повреждения белого вещества мозга.

REFERENCES

1. Hoagland, M.: An enzymatic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim' biophys. Acta* 1955, 16, 288—289.
2. Kingsley, M.: The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. *J. Lab. clin. Med.* 1942, 27, 840—846.
3. Loftfield, R., Eigner, E.: Mechanism of action of amino acid transfer ribonucleic acid ligases. *J. biol. Chem.* 1969, 244, 1746—1754.
4. Patelski, J., Waligóra, Z., Zgorzalewicz, B., Szulc, S.: Activation of amino acids in the aorta. *Enzyme* 1972/73, 14, 297—310.
5. Szafrński, P., Sułkowski, E.: Activation of amino acids in various organs of the guinea pig. *Acta biochim. pol.* 1959, 6, 133—141.

6. Wender, M., Piechowski, A., Adamczewska, Z.: Biochemical investigations of the brain in triethyl tin intoxication. *Neuropat. Pol.* 1973, 11, 223—234.
7. Wender, M., Piechowski, A., Wajgt, A.: Soluble cerebral proteins in experimental demyelinating processes. *Exp. Path.* 1972, 7, 290—297.
8. Wender, M., Zgorzalewicz, B., Piechowski, A.: Cell-free protein synthesis by rat brain in triethyl tin intoxication. *Acta Neurol. Scandinav.* 1974, 50, 103—108.
9. Wender, M., Zgorzalewicz, B., Wajgt, A.: Activity of sRNA-amino acyl synthetases in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1975, in press.

Authors' address: Department of Neurology, Institute of Nervous and Sensory Organs Diseases, Medical Academy 60-355 Poznań, Poland, 49 Przybyszewskiego Str.

MIROSLAW OWSIANOWSKI

CHOLESTEROL METABOLISM IN THE RAT BRAIN DURING EXPERIMENTAL CYANIDE ENCEPHALOPATHY*)

Department of Neurology, Medical Academy, Poznań

Among the exogenous factors altering the myelin sheaths in the central nervous system, different forms of anoxia play an important role (Hicks, 1950; Courville, 1957; Plum et al., 1962; Wender, 1963). Histotoxic anoxia caused by cyanide intoxication may serve as an experimental model in studying the mechanisms of demyelination. The most important morphological feature of cyanide encephalopathy is the selective destruction of myelin, limited almost exclusively to the *corpus callosum*, *corpus striatum* and white matter of the brain hemispheres (Levine, 1967; Wender et al., 1972, 1973). The pathogenesis of these changes and their anatomical localization are not clear enough and cannot be explained solely by the influence of the poison on the cytochrome oxidase system in white matter.

In the search for mechanisms of demyelination lesions following cyanide poisoning, metabolic investigations of basic myelin components (cholesterol being one of them), seem to be of primary importance. In this aspect it seemed interesting to undertake studies on cholesterol biosynthesis in cyanide encephalopathy.

MATERIAL AND METHODS

Experiments were carried out with Wistar rats of either sex, weighing 180—250 g. HCN intoxication was produced by inhalation, according to the technique of Levine and Stypulkowski (1959). The rats were placed in a glass box and exposed to a gaseous mixture of air and cyanide. After the occurrence of coma the animals were left in these conditions during 35 min and then transferred to fresh air.

Cholesterol biosynthesis was examined in two principal groups of intoxicated animals: 18 hrs and 14 days after HCN poisoning. Normal rats, not intoxicated, were used as control group. [2-¹⁴C] DL-mevalonic acid sodium salt (specific activity 30,6 mCi/mM) purchased from C.E.A., France, were used as cholesterol

*) The work was performed on behalf of Polish Academy of Sciences (No 09.4.1.3.2.)

precursor. An aqueous solution of isotope (50 $\mu\text{Ci}/1,2 \text{ ml}$) was injected intracerebrally (0.03 ml/100 g of body weight), according to the technique of Nicholas and Thomas (1959). In order to achieve a greater precision of intracerebral injection and the same conditions of operation, a stereotaxic apparatus was used for introduction of the cholesterol precursor (Fig. 1). In the construction of this apparatus the technical indications of Chevallier and Gautheron (1969) were taken into account. All animals were killed by decapitation at different periods following intracerebral injection: after 1, 6, 12, 24 and 48 hours. Each group consisted of 10 animals.

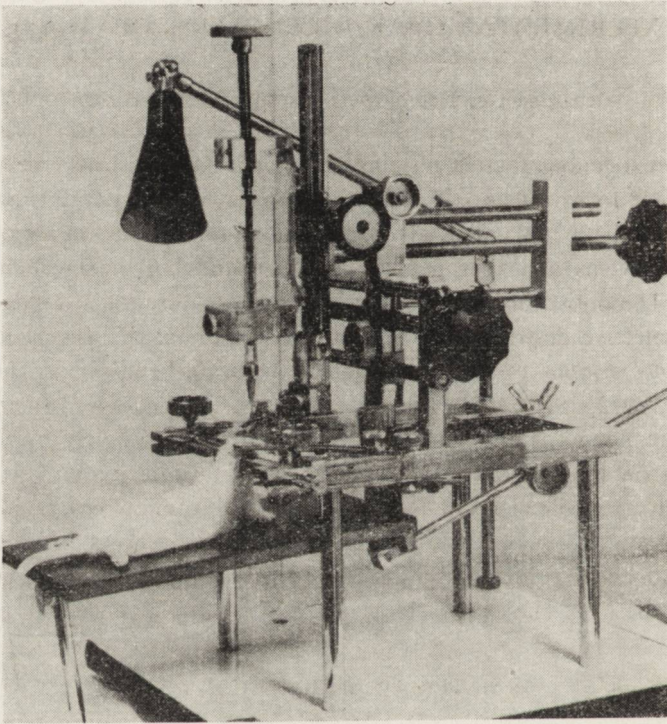


Fig. 1. Stereotaxic apparatus adjusted for intracerebral injection in experimental animals
Ryc. 1. Aparat stereotaktyczny przystosowany do wstrzyknięć domózgowych u zwierząt doświadczalnych

For biochemical investigations the white matter of the brain was used. Cholesterol and cholesterol esters were separated by the TLC method according to Svennerholm (1964) and estimated after Sperry and Webb (1950). Radioactivity was determined with a Nuclear Enterprises scintillation spectrometer.

For histological investigations of the brain the material was fixed in formalin, embedded in parafin and stained by the Nissl, H+E and Klüver-Barrera methods. Frozen slices were stained according to Spielmeyer.

RESULTS

Clinical observations: Directly after HCN inhalation the motoric activity of the rats slowed down and the animals remained in a state of coma for 1-3 h. About 30% of the animals died in the first 24 hours after intoxication; the behaviour and appearance of the surviving rats did not differ from that of normal ones.

Morphological changes: The histological picture of the brain of intoxicated animals was similar to that described previously by Wender and coworkers (1972). Only a slight fading of myelin was observed in rats examined 18 hrs after cyanide poisoning. At the later stage of disease — 14 days after intoxication — notable demyelination changes were visible, mainly in the *corpus callosum* and other commissural structures.

Biochemical findings: The free cholesterol content in the cerebral white matter in both experimental groups decreases (Table 1). As compared with the control group the differences are as follows: about 33% in the first period after intoxication and 44% — in the later one. In all intoxicated animals cholesterol esters appear in white matter.

Table 1. Cholesterol and cholesterol esters in white matter of the brain during experimental cyanide encephalopathy (in g/100 g of dry weight)

Tabela 1. Cholesterol i estry cholesterolu w istocie białej mózgu w czasie doświadczalnej encefalopatii cyjanowej (w g/100 g tkanki suchej)

	Cholesterol Cholesterol		Cholesterol esters Estry cholesterolu
Normal animals Zwierzęta normalne	12.2±0.23		0
18 hrs after HCN intoxication 18 godz. po zatruciu HCN	8.1±0.26	P < 0.001	0.6±0.06
14 days after HCN intoxication 14 dni po zatruciu HCN	6.8±0.31	P < 0.001	1.0±0.09

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

Cholesterol radioactivity measurements are presented in detail in table 2 and in fig. 2. These data indicate that in normal rats the incorporation of labelled mevalonic acid into brain cholesterol is detected as early as 1 hour after intracerebral injection; the cholesterol-specific radioactivity increases considerably after 12, 24 and 48 hours. In both experimental groups the cholesterol-specific radioactivity is lower in all examined periods after precursor injection and the differences — as compared with the control group — are statistically significant (Fig. 3). In the early

Table 2. Cholesterol specific radioactivity (cpm/min/mg) in white matter of the brain after intracerebral injection of ^{14}C mevalonate in experimental cyanide encephalopathy

Tabela 2. Radioaktywność właściwa cholesterolu (imp/min/mg) w istocie białej mózgu po domózgowym wstrzyknięciu ^{14}C mewalonianu w czasie doświadczalnej encefalopatii cyjanowej

Time (hrs) after in- tracerebral injection	Normal animals	18 hrs after HCN intoxi- cation	Confidence coefficient	14 days after HCN intoxi- cation	Confidence coefficient
Czas (godz) po wstrzyk- nięciu do- mózgowym	Zwierzęta normalne	18 godz. po zatruciu HCN	Współczynnik ufności	14 dni po zatruciu HCN	Współczynnik ufności
1	1089±48	686±83	P < 0.001	627±41	P < 0.001
6	1412±74	797±55	P < 0.001	713±42	P < 0.001
12	1956±52	789±42	P < 0.001	751±50	P < 0.001
24	3059±70	1082±47	P < 0.001	936±47	P < 0.001
48	3901±79	1360±73	P < 0.001	890±46	P < 0.001

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

stage of cyanide encephalopathy the mean values of cholesterol-specific radioactivity constitute: after 1 hr — 63% of normal value, after 6 hrs — 56%, after 12 hrs — 40%, after 24 and after 48 hrs — 35%. In the second group of intoxicated animals the mean values are somewhat lower and constitute: after 1 hr — 57%, after 6 hrs — 50%, after 12 hrs — 38%, after 24 hrs — 30% and after 48 hrs — 23% of normal value.

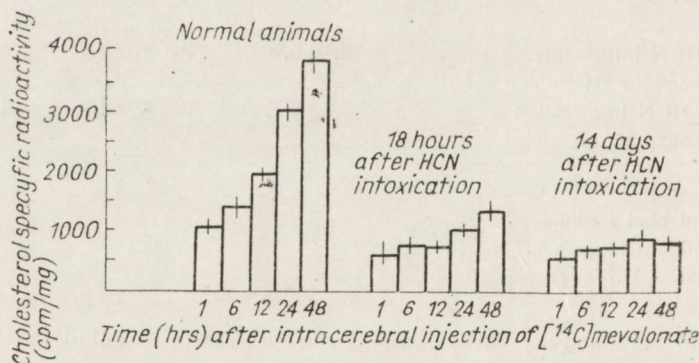


Fig. 2. Cholesterol-specific radioactivity in white matter of rat brain after intracerebral injection of ^{14}C -mevalonic acid in normal animals and during cyanide encephalopathy. The white bars indicate mean values in each group (10 animals). The vertical lines at the top of the bars express the 95% confidence interval ($P = 0.05$)

Ryc. 2. Radioaktywność właściwa cholesterolu w istocie białej mózgu szczura po domózgowym wstrzyknięciu ^{14}C kwasu mewalonowego u normalnych zwierząt i w czasie encefalopatii cyjanowej. Białe słupki oznaczają średnie wartości w każdej grupie (10 zwierząt). Pionowe linie na szczycie słupków wyrażają 95% przedział ufności ($P = 0.05$)

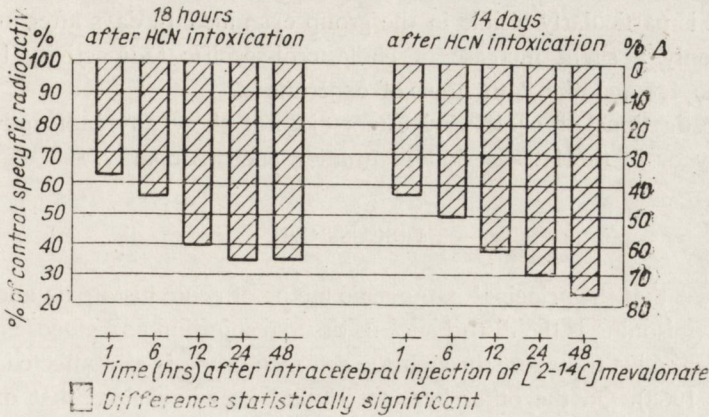


Fig. 3. Differences in cholesterol-specific radioactivity in cerebral white matter of normal and cyanide-intoxicated rats — at different periods after intracerebral injection of ¹⁴C-mevalonic acid

Ryc. 3. Różnice między radioaktywnością właściwą cholesterolu istoty białej mózgu szczurów normalnych i zatrutych cyjankiem — w różnych okresach po domózgowym wstrzyknięciu ¹⁴C kwasu mewalonowego

In both groups of intoxicated rats the dynamics of incorporation of ¹⁴C-mevalonic acid into brain cholesterol is disturbed; the increase of cholesterol-specific radioactivity in cerebral white matter in particular periods following the labelled precursor injection is relatively smaller than in normal rats or is hardly noticeable (Fig. 4).

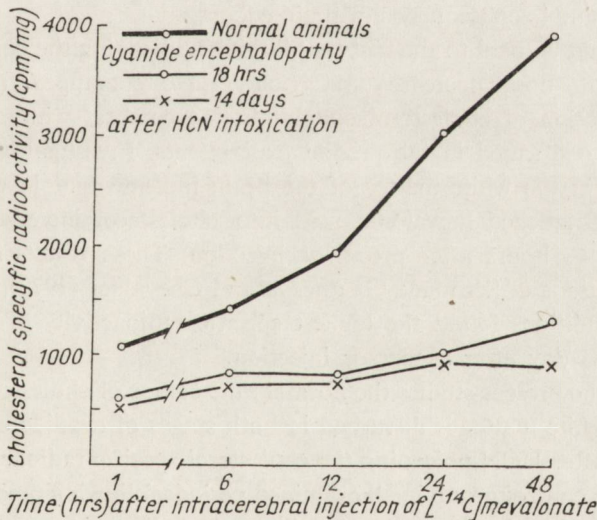


Fig. 4. Dynamics of cholesterol-specific radioactivity in white matter of the brain after intracerebral injection of ¹⁴C-mevalonic acid in normal rats and during cyanide encephalopathy.

Ryc. 4. Dynamika radioaktywności właściwej cholesterolu w istocie białej mózgu po domózgowym wstrzyknięciu ¹⁴C kwasu mewalonowego u zwierząt normalnych i w czasie encefalopatii cyjankowej.

This defect is particularly visible in the group examined 14 days after intoxication, in which only a slight increase of cholesterol-specific radioactivity is observed between the 1st and the 24th hour of experiment.

The investigations of cholesteryl esters did not show any radioactivity, either in the early or in the later period of cyanide encephalopathy.

DISCUSSION

It is known that the principal pathogenic factor of acute histotoxic anoxia caused by cyanide poisoning is the disturbance of tissue respiration and glucose metabolism in the brain; active transport through the cell membrane is also affected (Levis and Amaducci, 1968). On the other hand, it should be emphasized that oxygen consumption in the cerebral white matter is very low (Owsianowski, 1968) and the respiratory activity of the lipid components of myelin sheaths in adult animals is relatively low (Waelsch et al., 1940, 1941). In the light of these facts it is difficult to explain the selective myelin destruction observed in cyanide encephalopathy by the direct influence of HCN intoxication on the oxido-reductive processes in the white matter.

Electrophoretic investigations of cerebral soluble proteins indicate that the edematous changes of the brain, developing in the first stage of cyanide intoxication, are not associated with alteration of the blood-brain barrier and the leak of serum proteins into nervous tissue (Wender et al., 1972). These findings may suggest that the demyelination lesions arising in the later periods of cyanide encephalopathy are not a simple consequence of brain edema.

Attention should be paid to the fact that in HCN poisoning the content of myelin basic lipids in the brain decreases and cholesteryl esters appear (Wender et al., 1973). The reduction of cholesterol content in the cerebral white matter and its estrification are confirmed in the present experiments. Investigations on cholesterol biosynthesis in the white matter of the brain indicate that in normal animals incorporation of labelled mevalonic acid into cholesterol increases significantly during the first 48 hours after precursor injection. These results agree generally with the observations of Sérougne-Gautheron and Chevallier (1973), who in similar experimental conditions found the highest specific radioactivity of cerebral cholesterol on the 3rd day after precursor injection.

As shown by the present studies the normal time course of cholesterol biosynthesis in the cerebral white matter is disturbed in both stages of cyanide encephalopathy. Eighteen hours after HCN poisoning the cholesterol-specific radioactivity is already lower than in the control group in all examined periods following precursor injection, but the increase of its incorporation is still marked. In the later stage of disease, when typical demyelination changes in the brain appear, the inhibition of cholesterol biosynthesis is more significant and the dynamics of this process is profoundly affected.

These observations indicate that cyanide intoxication brings about a considerable and long lasting metabolic error in cerebral cholesterol biosynthesis.

The disorders of cholesterol synthesis found in our experiments indicate some correlation with protein biosynthesis in the postmitochondrial fraction during cyanide encephalopathy (Wender et al., 1974). These studies show that incorporation of labelled leucine into the mentioned fraction is altered already in the early stage of disease, but a greater depression of this process in the white matter of the brain appears in the further period of encephalopathy, corresponding to the manifestation of morphological features of demyelination. It seems, therefore, that the metabolic dysfunction involving the basic constituents of myelin sheaths — lipids and proteins — can be one of the factors pathogenetically connected with demyelination.

The lack of radioactivity of cholesterol esters found in our investigations may suggest that the new synthesized cerebral cholesterol is not included in the formation of these biochemical exponents of demyelination. It must, however, be taken into consideration that the present experiments were performed a very short time after precursor injection, therefore the conclusions have to be treated with circumspection.

CONCLUSIONS

1. The incorporation of labelled mevalonic acid into the cholesterol of cerebral white matter is significantly inhibited already in the early stage of cyanide intoxication, preceding the morphological symptoms of myelin damage.

2. The appearance of demyelination changes in the latter period of cyanide encephalopathy is associated with a greater decrease of cholesterol-specific radioactivity in the white matter of the brain and with a more profound alteration of the biosynthetic dynamics of cholesterol after labelled precursor injection.

3. The disturbance of cholesterol biosynthesis in cerebral white matter in the course of cyanide encephalopathy may suggest a pathogenic connection of this metabolic defect with injury to the myelin sheaths following HCN intoxication.

M. Owsianowski

PRZEMIANA CHOLESTEROLU W MÓZGU SZCZURA W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII CYJANOWEJ

Streszczenie

Badano włączanie się piętna ^{14}C -kwasu mewalonowego do cholesterolu istoty białej mózgu szczurów po zatruciu HCN w dwóch okresach rozwoju encefalopatii cyjanowej: po 18 godzinach i 14 dniach. Prekursor cholesterolu wstrzykiwano domózgowo przy pomocy aparatu stereotaktycznego. Zwierzęta zabijano 1, 6, 12, 24 i 48 godzin po wstrzyknięciu izotopu, pobierano istotę białą mózgu i izolowano chromatograficznie cholesterol i jego estry.

W obu badanych okresach po zatruciu HCN stwierdzono spadek zawartości wolnego cholesterolu w istocie białej mózgu oraz wyraźną estryfikację cholesterolu. Radioaktywność właściwa cholesterolu była obniżona już we wczesnym okresie encefalopatii cyjanowej, wykazywała jednak pewien wzrost w 48 godzin po wstrzyknięciu kwasu mewalonowego. Wzrost ten był wyraźnie mniejszy niż u zwierząt normalnych. W późniejszym okresie, w którym rozwijają się typowe dla encefalopatii cyjanowej zmiany demielinizacyjne, następował większy spadek radioaktywności właściwej cholesterolu istoty białej, a dynamika biosyntezy tego składnika ulegała znacznie większemu zakłóceniu.

Zaburzenia przemiany cholesterolu we wczesnym okresie encefalopatii cyjanowej, pogłębiające się w późniejszej fazie choroby, sugerują powiązanie tych zaburzeń z uszkodzeniem osłonek mielinowych w mózgu w następstwie zatrucia HCN.

M. Овсяновски

ОБМЕН ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЦИАНИСТОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Исследовали включение метки ^{14}C мевалоновой кислоты в холестерин белого вещества мозга крыс после отравления HCN, в два периода развития цианистой энцефалопатии — через 18 часов и через 14 дней. Предшественник холестерина вводили в мозг с помощью стереотаксического аппарата. Животных убивали через 1, 6, 12, 24 и 48 часов после введения изотопа, брали белое вещество мозга и хроматографически определяли холестерин и его эфиры.

В обоих исследуемых периодах после отравления HCN было обнаружено падение содержания свободного холестерина в белом веществе мозга, а также отчетливое этерифицирование холестерина. Удельная радиоактивность холестерина снижалась уже в ранний период цианистой энцефалопатии, проявляя, однако, некоторый рост через 48 часов после введения мевалоновой кислоты. Этот рост был заметно меньше, чем у нормальных животных. В более поздний период, в котором развиваются типичные для цианистой энцефалопатии демиелинизационные изменения, наступает более значительное снижение удельной радиоактивности холестерина белого вещества, а динамика биосинтеза этого компонента подвергается более значительному нарушению.

Нарушения обмена холестерина в ранний период цианистой энцефалопатии, усиливающиеся в более поздней фазе болезни, указывают на их связь с повреждением миелиновых оболочек в мозге вследствие отравления HCN.

REFERENCES

1. Bass N. H.: Pathogenesis of myelin lesions in experimental cyanide encephalopathy. 1968, 18, 167—177.
2. Chevallier F., C. Gautheron: Method for the study of cholesterol biosynthesis in the central nervous system. Incorporation of $2\text{-}^{14}\text{C}$ mevalonic lactone after intraperitoneal, intracisternal and intraventricular administration in the rat. J. Neurochem. 1969, 16, 323—331.
3. Courville C.: Demyelination as a delayed residual monoxide asphyxia. J. nerv. menth. Dis. 1957, 18, 597—606.
4. Hicks S. P.: Brain metabolism in vivo: I. The distribution of lesions caused by cyanide poisoning, insuline hypoglycemia, asphyxia in nitrogen and fluoracetate poisoning in rat. Arch. Path. 1950, 49, 111—128.

5. Levine S., W. Stypulkowski: Experimental cyanide encephalopathy. *Arch. Pathol.* 1959, 67, 306—323.
6. Levis G., L. Amaducci: Effect of acute intoxication on the active transport of amino acids in brain slices. *J. Neurochem.* 1968, 15, 459—469.
7. Nicholas H. J., B. E. Thomas: The metabolism of cholesterol and fatty acids in the central nervous system. *J. Neurochem.* 1959, 4, 42—49.
8. Owsianowski M.: Investigations on tissue respiration and glycolysis in the brain in different periods of ontogenic development. *Folia Biol.*, 1968, 16, 365—376.
9. Plum F., J. Posner, Z. Hain: Delayed neurological deterioration after anoxia. *Arch. intern. Med.* 1962, 110, 56—67.
10. Sérougne-Gautheron C., F. Chevallier: Time course of biosynthetic cholesterol in the adult rat brain. *Biochimica et Biophysica Acta* 1973, 316, 244—250.
11. Sperry W., M. Webb: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* 1950, 187, 97—106.
12. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.* 1964, 11, 839—859.
13. Waelsch H., W. Sperry, V. A. Stoyanoff: Lipid metabolism in brain during myelination. *J. Biol. Chem.* 1940, 135, 297—301.
14. Waelsch H., W. M. Sperry, V. A. Stoyanoff: The influence of growth and myelination on the deposition and metabolism of lipids in the brain. *J. Biol. Chem.*, 1941, 140, 885—891.
15. Wender M.: Studies of cerebral lipids in a relapsing case of carbon monoxide poisoning. *Acta Neuropath. (Berlin)*, 1963, 2, 371—377.
16. Wender M., M. Kozik, A. Wajgt: Histoenzymology of experimental cyanide encephalopathy. *Acta Histochem.* 1972, 43, 361—371.
17. Wender M., A. Piechowski, A. Wajgt: Cerebral proteins in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1972, 10, 519—522.
18. Wender M., Z. Adamczewska, A. Wajgt: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1973, 10, 417—425.
19. Wender M., B. Zgorzalewicz, A. Wajgt: Protein synthesis in vitro by the rat brain in course of experimental cyanide encephalopathy. *Exp. Pathol.*, 1974, 9, 140—143.

Author's address: Department of Neurology, Institute of Diseases of Nervous System and Sensory Organs, Medical Academy, Poznań, Przybyszewskiego 49. Poland.

MIROSLAW OWSIANOWSKI

CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS BY RAT BRAIN IN TRIETHYL TIN INTOXICATION*)

Department of Neurology, Medical Academy, Poznań

The main consequence of the poisonous action of triethyl tin (TET) on the central nervous system is a specific type of cerebral edema restricted to the white matter. Ultramicroscopic studies show that the edematous fluid is accumulated between the myelin lamellae what is considered to cause some lesions of the myelin sheaths (Aleu et al. 1963; Hirano et al. 1968).

Earlier investigations in our laboratory (Wender et al. 1973a; 1974) indicate that cytotoxic brain edema produced by TET intoxication is not accompanied by noteworthy changes in the protein pattern of the brain, and — from the biochemical viewpoint — may, therefore, be treated as a simple brain swelling. One of the significant biochemical disorders detected in the mentioned studies is the decrease of cholesterol contents in the brain and the appearance — especially in the white matter — of cholesterol esters.

These observations may suggest that the metabolic deviations of brain cholesterol precede morphological changes in TET-induced brain edema. It was, therefore, interesting to investigate the biosynthesis of this important constituent of myelin sheaths in the course of triethyl tin intoxication.

MATERIAL AND METHODS

Adult Wistar rats of either sex, weighing 180—250 g, were used as experimental animals. Each rat was injected intraperitoneally with 4 mg of triethyl tin sulfate per 1 kg of body weight. The investigations were performed in two experimental groups: 24 hrs and 28 days after TET administration. In these periods [2-¹⁴C] DL mevalonic acid sodium salt (spec. activity 30,6/ mCi/mM, CEA-France), used as cholesterol precursor, was injected intracerebrally with 2,5 (μCi/0,03 ml) per 100 g of body weight. The intracerebral injections were made according to the Nicholas

*) The work was performed on behalf of the Polish Academy of Sciences (No 09.4.1.3.2.)

and Thomas method (1959) using a stereotaxic apparatus, constructed according to the technical indications of Chevallier and Gautheron (1969). The animals were decapitated after 1, 6, 12, 24 and 48 hrs following precursor injection. The biochemical investigations in each of these periods were performed on 10 rats.

Cholesterol and cholesterol esters were separated in the white matter of the brain by the TLC method according to Svennerholm (1964) and estimated after Sperry and Webb (1950). Radioactivity was determined with an Nuclear Enterprises scintillation spectrometer.

For histological studies the brain sections were fixed in formalin, embedded in paraffin and stained with the Nissl, H+E and Klüver-Barrera methods. Frozen slices were stained by the Spielmeyer method.

RESULTS

Clinical and pathomorphological observations: About 15 min after TET administration the rats lost their normal activity and defensive reactions, they became drowsy and would not eat. These symptoms increased for 3—5 hrs, and after further 10—15 hrs they disappeared completely. In later periods of the experiment—during 28 days—the behaviour and appearance of intoxicated animals did not differ from that of normal rats.

Histological examination of the brain showed the pathomorphological changes described previously by Wender and coworkers (1974). The spongy changes in the white matter, without glial and mesenchymal reaction, are the most characteristic

Table 1. Cholesterol and cholesterol esters in cerebral white matter during cytotoxic brain edema produced by TET intoxication (in g/100 g of dry weight)

Tabela 1. Cholesterol i estry cholesterolu istoty białej mózgu w obręku cytotoksycznym mózgu wywołanym przez zatrucie trójetylkciem cyny (w g/100 g tkanki suchej)

	Cholesterol Cholesterol		Cholesterol esters Estry cholesterolu
Normal animals Zwierzęta normalne	12.2±0.23		0
24 hrs after TET intoxication 24 godz po zatruciu TET	9.8±0.31	P < 0.001	0.7±0.16
28 days after TET intoxication 28 dni po zatruciu TET	11.0±0.24	P < 0.01	0.03±0.01

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

Table 2. Cholesterol specific radioactivity (cpm/min/mg) in white matter of the brain after intracerebral injection of ^{14}C mevalonate — in cytotoxic brain edema produced by TET intoxication.

Tabela 2. Radioaktywność właściwa cholesterolu (imp/min/mg) w istocie białej mózgu po domózgowym wstrzyknięciu ^{14}C mewalonianu — w obrzęku cytotoksycznym mózgu wywołanym przez zatrucie trójetylkciem cyny

Time (hrs) after in- tracerebral injection	Normal animals	24 hrs after TET intoxi- cation	Confidence coefficient	28 days after TET intoxi- cation	Confidence coefficient
Czas (godz) po wstrzyk- nięciu do- mózgowym	Zwierzęta normalne	24 godz. po zatruciu trój- etylkciem cyny	Współczynnik ufności	28 dni po zatruciu trój- etylkciem cyny	Współczynnik ufności
1	1089 ± 48	927 ± 50	P < 0.05	1200 ± 54	P > 0.05
6	1412 ± 74	1122 ± 52	P < 0.001	1370 ± 61	P > 0.05
12	1956 ± 52	1600 ± 60	P < 0.001	1737 ± 43	P < 0.01
24	3059 ± 70	2299 ± 60	P < 0.001	2597 ± 78	P < 0.001
48	3901 ± 79	2996 ± 62	P < 0.001	3376 ± 80	P < 0.001

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

feature observed in the intoxicated animals. In neither of the examined stages following TET administration was any distinct demyelination seen.

Biochemical findings: The results of determination of free cholesterol content in the cerebral white matter presented in table 1, show a decrease of this component in both experimental groups. In comparison with the control animals the difference is about 20% in the early stage after TET administration and about 10% in the later period of cytotoxic brain edema. Cholesterol esters appear in all intoxicated animals. The cholesterol specific radioactivity in cerebral white matter of normal and experimental rats is presented in Table 2 and Fig. 1. The obtained results revealed that in the early stage of TET-induced brain edema the cholesterol-specific radioactivity is significantly lower at all examined periods after labelled precursor injection. In comparison with the control group the differences in the mean values illustrated in Fig. 2 are as follows: 15% — after 1 hr, 21% — after 6 hrs, 18% — after 12 hrs, 25% — after 24 hrs and 23% — after 48 hrs. In the later stage of experimental disease the cholesterol-specific radioactivity does not differ significantly from that of the control

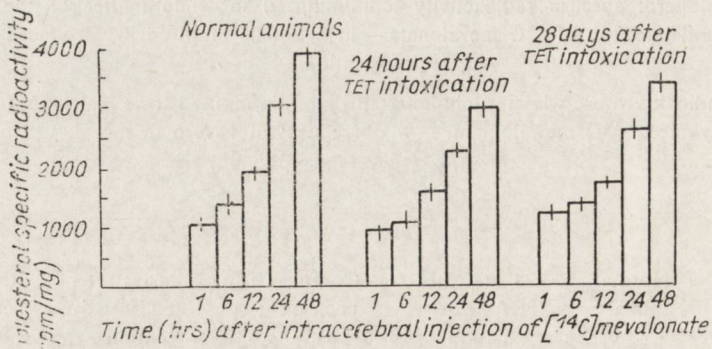


Fig. 1. Cholesterol-specific radioactivity in white matter of the rat brain after intracerebral injection of ^{14}C -mevalonic acid to normal animals and in TET-induced cytotoxic brain edema. The white bars indicate mean values in each group (10 animals). The vertical lines at the top of the bars express a 95% confidence interval ($P = 0.05$).

Ryc. 1. Radioaktywność właściwa cholesterolu w istocie białej mózgu szczura po domózgowym wstrzyknięciu ^{14}C kwasu mewalonowego u normalnych zwierząt i w czasie obrzęku cytotoksycznego mózgu wywołanego przez zatrucie trójetylkim cyny. Białe słupki oznaczają średnie wartości w każdej grupie (10 zwierząt). Pionowe linie na szczycie słupków wyrażają 95% przedział ufności ($P = 0.05$).

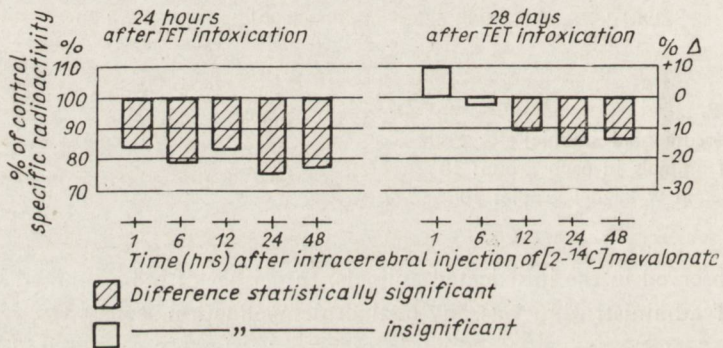


Fig. 2. Differences between cholesterol-specific radioactivity in the cerebral white matter of normal and TET-intoxicated rats at different periods after intracerebral injection of ^{14}C -mevalonic acid.

Ryc. 2. Różnice między radioaktywnością właściwą cholesterolu istoty białej mózgu szczurów normalnych i zatrutych trójetylkim cyny — w różnych okresach po domózgowym wstrzyknięciu ^{14}C kwasu mewalonowego.

specimens in the two first periods following intracerebral injection. A statistically significant decrease of cholesterol-specific radioactivity is found only in animals examined 12, 24 and 48 hrs after precursor introduction and — in comparison with normal rats — the differences are 11%, 15% and 14%, respectively.

Both in early and in later period of cytotoxic brain edema the specific radioactivity of cholesterol in cerebral white matter presents a progressive increase during 48 hrs after labelled mevalonic acid injection. In spite of marked inhibition of this

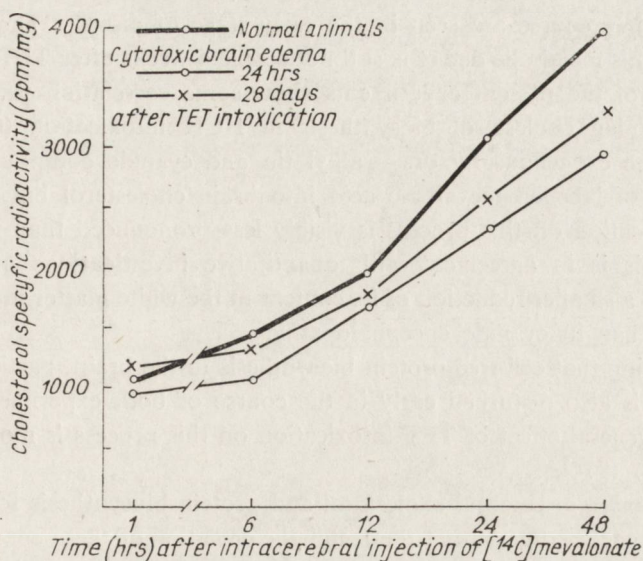


Fig. 3. Dynamics of cholesterol-specific radioactivity in white matter of the brain after intracerebral injection of ^{14}C -mevalonic acid in normal rats and in TET intoxication.

Ryc. 3. Dynamika radioaktywności właściwej cholesterolu istoty białej mózgu po domózgowym wstrzyknięciu ^{14}C kwasu mewalonowego u zwierząt normalnych i w zatruciu trójetylką cyny.

phenomenon as compared with the control group — the basic time course presents a character similar to that in normal rats (Fig. 3).

Investigations of cholesterol esters did not show any radioactivity of these components in the cerebral white matter of both experimental groups.

DISCUSSION

In contradistinction to other experimental models using for investigations of biochemical processes connected with myelin alteration in the central nervous system, e.g. cyanide encephalopathy or allergic encephalomyelitis — in the pathomorphological picture of TET-induced cytotoxic brain edema no noticeable symptoms of demyelination are seen. However, earlier studies of other authors (Wender et al. 1973 a) and the present experiments show that already in the first period of disease, selective damage of cerebral white matter is accompanied by a significant reduction of cholesterol content and accumulation of cholesterol esters, what is considered to be one of the biochemical signs of active myelin decomposition. Similar deviations concerning cholesterol were also found in different periods of EAE (Adamczewska, 1971) and cyanide encephalopathy (Wender et al. 1973 b).

Investigations of incorporation of ^{14}C -mevalonic acid into brain cholesterol during TET intoxication show a marked disturbance of this process in the cerebral white matter. A significant decrease of cholesterol-specific radioactivity and an inhi-

bition of its time course are seen in the early stage of disease. Though partially compensated this metabolic defect is still noticeable 4 weeks after TET intoxication.

The results of the present experiments show some correlation with our earlier studies concerning cholesterol biosynthesis in HCN intoxication (Owsianowski, 1975). Both the exogenous factors — alkyl tin and cyanide compounds — inhibit incorporation of labelled mevalonic acid into brain cholesterol but the influence of TET intoxication on this process is visibly less pronounced than that of HCN poisoning. This is in agreement with quantitative investigations of cholesterol, indicating also a smaller reduction of its content in the white matter in TET-induced brain edema than in cyanide encephalopathy.

It is interesting that cell-free protein biosynthesis in the brain, particularly in the white matter, is also disturbed early in the course of both experimental diseases, however, the general effect of TET intoxication on this process is more pronounced (Wender et al. 1974).

The disturbances in cerebral cholesterol and protein biosynthesis found in TET-induced brain edema suggest that the metabolic deviation of these components is at least parallel to the morphological changes occurring in this experimental disease and plays a pathogenic role in their development. The different degrees of these biochemical disorders in TET and HCN intoxication seem among other things to depend on the type of exogenous factor defining the character of the experimental model of demyelination and on the intensity of the brain lesion, particularly of myelin.

CONCLUSION

1. TET intoxication brings about a significant and long lasting inhibition of labelled mevalonic acid incorporation into cholesterol of the cerebral white matter.

2. The metabolic events involved in the biosynthesis of cholesterol in the white matter of the brain, occurring already in the early stage after TET administration, seem to play a pathogenic role in the development of morphological changes typical for TET-induced cytotoxic brain edema.

3. The disorders of cholesterol biosynthesis in the cerebral white matter found after TET intoxication are much less pronounced than those observed in HCN poisoning, but they present a similar character. It seems that the intensity of these metabolic deviations may depend among other things on the type of the experimental model of demyelination and on the degree of myelin decomposition.

M. Owsianowski

BIOSYNTENZA CHOLESTEROLU W MÓZGU SZCZURA PO ZATRUCIU TRÓJETYLKIEM CYNY

Streszczenie

Badano włączanie się piętna ^{14}C -kwasu mewalonowego do cholesterolu istoty białej mózgu szczurów zatrutych trójtlenkiem cyny. Prekursor cholesterolu wstrzykiwano domózgowo, następnie zwierzęta zabijano po 1, 6, 12, 24 i 48 godzinach od wstrzyknięcia izotopu. Cholesterol i jego

estry izolowano metodą chromatografii cienkowarstwowej. Radioaktywność ^{14}C -kwasu mewalonowego oznaczano przy pomocy spektrometru scyntylacyjnego.

W obu badanych okresach obrzęku cynowego, to jest 24 godziny i 28 dni po podaniu TET, stwierdzono spadek zawartości wolnego cholesterolu w istocie białej mózgu i jego estryfikację oraz obniżenie radioaktywności właściwej cholesterolu z zahamowaniem dynamiki jej wzrostu po wstrzyknięciu ^{14}C -kwasu mewalonowego. Odchylenia te były szczególnie wyraźne w 24 godziny po podaniu trójetylku cyny, po upływie 28 dni zmiany te wyrównywały się, ale nie całkowicie.

Wczesne wystąpienie i długotrwałe utrzymywanie się zaburzeń biosyntezy cholesterolu istoty białej mózgu w obrzęku cynowym sugerują ich znaczenie patogenetyczne w powstawaniu zmian morfologicznych wywołanych działaniem TET. Zakłócenia przemiany cholesterolu w mózgu w obrzęku cynowym mają podobny charakter jak zmiany w encefalopatii cyjanowej, są jednak znacznie mniej nasilone. Różny stopień tych zaburzeń może być m.in. uzależniony od rodzaju modelu doświadczalnego uszkodzenia osłonek mielinowych.

M. Овсяновски

БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА В МОЗГЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ ТРИЭТИЛОВЫМ ОЛОВОМ

Было исследовано включение метки ^{14}C -мевалоновой кислоты в холестерин белого вещества мозга крыс, отравленных триэтиловым оловом. Предшественник холестерина вводили в мозг и через 1, 6, 12, 24 и 48 часов после его введения убивали животных. Холестерин и его эфиры отделяли методом тонкослойной хроматографии. Радиоактивность определяли с помощью сцинтиляционного спектрометра.

Проведенные исследования обнаружили в обоих периодах острого отека, вызванного оловом (через 24 часа и через 28 дней после введения ТЭТ) падение содержания холестерина в белом веществе и его этерификацию, а также снижение удельной радиоактивности холестерина и торможение динамики ее роста после введения ^{14}C -мевалоновой кислоты. Эти отклонения были особенно отчетливы через 24 часа после введения триэтилового олова, через 28 дней эти изменения выравнились, хотя и не полностью.

Раннее появление и длительное сохранение нарушений биосинтеза холестерина белого вещества мозга при данном отеке указывает на их патогенное значение в возникновении морфологических изменений, вызванных действием ТЭТ.

Нарушения обмена холестерина в мозге при отеке, вызванном действием ТЭТ, хотя и сходны по характеру с нарушениями при цианистой энцефалопатии, выражены они, однако, значительно слабее. Различная степень этих нарушений может быть обусловлена, в частности, типом экспериментальной модели вызывающей повреждение миелиновых оболочек.

REFERENCES

1. Adamczewska Z.: Lipidy mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia. Roczniki Akademii Medycznej w Poznaniu, 1971, 5, 105—110.
2. Aleu F. P., R. Katzman: Fine structure and electrolyte analysis of cerebral edema induced by alkyl tin intoxication. J. Neuropath. exp. Neurol., 1963, 32, 403—413.

3. Chevallier F., C. Gautheron: Metod for the study of cholesterol biosynthesis in the central nervous system. Incorporation of 2-¹⁴C mevalonic lactone after intraperitoneal, intracisternal and intraventricular administration in the rat. *J. Neurochem.* 1969, 16, 323—331.
4. Hirano A., H. Zimmerman, S. Levine: Intramyelinic and extracellular spaces in triethyl tin intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 571—580.
5. Nicholas H., B. Thomas: The metabolism of cholesterol and fatty acids in the central nervous system. *J. Neurochem.* 1959, 4, 42—49.
6. Owsianowski M.: Cholesterol metabolism in the rat brain during experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 423—431.
7. Sperry M., M. Webb: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* 1950, 187, 97—106.
8. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.* 1964, 1, 838—859.
9. Wender M., A. Piechowski, Z. Adamczewska: Biochemical investigation of the brain in triethyl tin intoxication. *Neuropatol. Pol.* 1973a, 11, 223—234.
10. Wender M., Z. Adamczewska, A. Wajgt: Cerebral lipids in experimental cyanide encephalopathy. *Neuropatol. Pol.* 1973b, 11, 417—423.
11. Wender M., B. Zgorzalewicz, A. Piechowski: Cell-free protein synthesis by rat brain in triethyl tin intoxication. *Acta Neurol. Scandinav.* 1974, 50, 101—108.

Author's adress: Department of Neurology, Institute of Disease of Nervous System and Sensory Organs, Medical Academy, Poznań, 49 Przybyszewskiego Str. Poland.

M. WENDER, O. MULAREK, A. PIECHOWSKI

ON THE PROTECTIVE INFLUENCE OF CEREBROLYSINE AGAINST THE EFFECTS OF TET INTOXICATION AT AN EARLY STAGE OF EXTRAUTERINE LIFE

Department of Neurology, Institute of Nervous and Sensory Organ Diseases, Medical Academy, Poznań

Our previous studies (Wender et al., 1974) have shown that triethyl tin, when administered intraperitoneally in a dose of 10 mg per kg of body weight to 6-day-old rats is incapable of causing marked cerebral edema, it however, inhibits the overall development of these animals, including retardation of brain maturation as demonstrated by a decreased gain of brain weight and delayed myelinogenesis.

Extending further these studies we were interested in establishing what, if any, is the effect of cerebrolysine (produced by the Ebeve-Company, Unterach, Austria), a brain hydrolysate on this experimental model.

MATERIAL AND METHODS

The experimental material comprised white Wistar rats, originating from a single colony, divided into two groups. One was given 0.015 ml of cerebrolysine subcutaneously during 4 consecutive days. The second group comprised animals which were intoxicated with a single intraperitoneal injection of triethyl tin sulphate in a dose of 10 mg per kg body weight on the 6th day after birth (LD_{50} dose) and then received 0.015 ml of cerebrolysine subcutaneously for 4 consecutive days. Animals of both groups were subdivided into 4 subgroups sacrificed by decapitation 17, 25, 45 and 60 days, respectively, after TET intoxication. The results were compared with previously published studies of normal rat development and the development of animals intoxicated with a single TET injection. The body weight of animals was determined prior to decapitation. Immediately afterwards, the brains were removed from the cranial vault, weighed and fixed in formalin. Frozen sections were stained by the method of Spielmeyer and with H+E. The material embedded in paraffine was stained according to the methods of Woelcke-Heidenhain, Nissl and with H+E.

RESULTS

Clinical observations. About fifty percent of rats given triethyl tin even when receiving cerebrolysine, died in the course of 3 to 50 days after intoxication. The animals receiving cerebrolysine only developed normally and did not display any side effects. The results of estimations of body and brain weight of both the experimental and normal animals are given in Tables 1—3.

Myelin staining. Rats receiving cerebrolysine only displayed a normal time course of myelinogenesis. In 17-day-old animals myelination of nerve fibres in the rhinencephalon and of the capsula interna was complete and partial myelination was seen within the corona radiata of the cerebral hemispheres. In the corpus callosum myelination was just beginning. In the next experimental group i.e. in 25-day-old rats myelination in the corpus callosum was not yet complete, but it was almost

Table 1. Influence of administration of cerebrolysine on brain weight in rats receiving triethyl tin on the 6th day of life

Tabela 1. Wpływ podania cerebrolizyny na wagę mózgu szczurów zatrutych trójetylkkiem cyny w 6 dniu życia

Age Wiek	Brain weight (g) Waga mózgu w g			
	Normal development Normalny rozwój	Animal receiving 0.015 ml of cerebrolysine subcutaneously for 4 consecutive days Zwierzęta otrzymują- ce 0,015 ml cerebro- lizyny podskórnice przez 4 kolejne dni	Animal intoxica- ted with TET on 6th day of life Zwierzęta zatrute TET w 6 dniu życia	Animals intoxicated with TET on 6th day of life, receiving 0.015 ml of cere- brolysine subcutaneously for 4 consecutive days Zwierzęta zatrute TET w 6 dniu życia, otrzymu- jące 0,015 ml cerebroliz- yny podskórnice przez 4 kolejne dni
17 days dni	1.172±0.027	1.232±0.027	0.956±0.039	0.938±0.019
25 days dni	1.326±0.013	1.330±0.023	0.862±0.071	1.199±0.064
45 days dni	1.475±0.033	1.414±0.025	1.163±0.052	1.345±0.026
60 days dni	1.456±0.047	1.357±0.045	1.113±0.027	1.336±0.033

Each group of animals comprised 6 rats

Liczba zwierząt każdej grupy 6

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd

Table 2. Influence of administration of cerebrolysine on body weight in rats receiving triethyltin on the 6th day of life

Tabela 2. Wpływ podania cerebrolizyny na wagę ciała szczurów zatrutych trójetylktem cyny w 6 dniu życia

Age Wiek	Normal development Normalny rozwój	Body weight (g) Waga ciała w g		
		Animals receiving 0.015 ml of cerebro- lysine subcutaneously for 4 consecutive days Zwierzęta otrzymujące 0,015 ml cerebrolizyny podskórnice przez 4 kolejne dni	Animals intoxicated with TET on 6th day of life Zwierzęta zatrute TET w 6 dniu życia	Animals intoxicated with TET on 6th day of life receiving 0.015 ml of cere- brolysine subcutaneously for 4 consecutive days Zwierzęta zatrute TET w 6 dniu życia, otrzymu- jące 0,015 ml cerebrolizyny podskórnice przez 4 ko- lejne dni
17 days dni	28.1±1.0	25.4±1.2	22.0±0.9	24.4±0.2
25 days dni	40.6±1.3	39.0±1.3	24.2±2.8	34.2±3.4
45 days dni	68.3±2.5	53.7±0.7	47.5±0.6	51.2±1.4
60 days dni	106.7±5.2	101.1±1.5	60.1±4.7	94.3±2.9

Each group of animals comprised 6 rats

Liczba zwierząt każdej grupy: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd

finished in the cerebral hemispheres. 45-day-old animals showed complete myelination of nerve fibres.

A similar picture, lacking any significant alterations was seen also in the next experimental group comprising animals intoxicated with TET followed by cerebrolysine treatment.

Cytological studies. When compared with control rats the animals of both experimental groups (rats receiving cerebrolysine only and those receiving cerebrolysine after TET intoxication) did not reveal any differences in the intensity of myelination gliosis. In 17-day-old rats intense myelination gliosis was observed within the corpus callosum (glia cell clusters consisting mostly of various types of immature and mature oligodendroglia cells with few intercalated astrocytes). In the next experimental group (25-day-old animals) the myelination gliosis in the corpus callosum was less intense with a more mature pattern of cellular components. Residual matrix cells were seen under the ventricular ependyma. No signs of cerebral edema were observed.

Table 3. Influence of administration of cerebrolysine on brain weight/body weight ratio in rats receiving triethyl tin on the 6th day of life

Tabela 3. Wpływ podania cerebrolizyny na stosunek wagi mózgu do wagi ciała szczurów zatrutych trójetylkiem cyny w 6 dniu życia

Age Wiek	Normal development Normalny rozwój	Brain weight/body weight ratio (in %) Stosunek wagi mózgu do wagi ciała (w proc.)		
		Animals receiving 0.015 ml of cerebrolysine subcutaneously for 4 consecutive days Zwierzęta otrzymujące 0,015 ml cerebrolizyny podskórnie przez 4 kolejne dni	Animals intoxicated with TET on 6th day of life Zwierzęta zatrute TET w 6 dniu życia	Animals intoxicated with TET on 6th day of life receiving 0.015 ml of cerebrolysine subcutaneously for 4 consecutive days Zwierzęta zatrute TET w 6 dniu życia otrzymujące 0,015 ml cerebrolizyny podskórnie przez 4 kolejne dni
17 days dni	4.17±0.18	4.85±0.22	4.35±0.21	3.84±0.09
25 days dni	3.27±0.14	3.41±0.19	3.56±0.16	3.51±0.19
45 days dni	2.53±0.11	2.63±0.19	2.45±0.13	2.63±0.18
60 days dni	1.36±0.09	1.34±0.30	1.85±0.11	1.42±0.12

Each group of animals comprised 6 rats

Liczba zwierząt każdej grupy: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd

DISCUSSION

The obtained results demonstrate a protective effect of cerebrolysine against general retardation including brain development, provoked by TET-intoxication at an early stage of extrauterine life. This effect was most impressive in animals which reached adulthood (60-day old animals), and displaying almost normal body and brain weights as well as brain weight/body weight ratios. Cerebrolysine alone had no influence on the development in normal intact rats.

Our findings suggest that the brain hydrolysate when applied immediately following the toxic agent, known for its disturbant effect on cerebral metabolism, is capable of exerting a positive influence both on the general noxious effect of TET in immature animals and on their further maturation.

The explanation of this interesting observation is difficult. Cerebrolysine is the product of mild hydrolysis of porcine brain proteins. It constitutes an aqueous solution of amino acids and low molecular weight peptides. One milliliter of this solution

corresponds as regards to amino acid content approximately to 1 g of fresh porcine brain.

A number of experimental studies have proved that small doses of cerebrolysine are able to influence the course of some physiological as well as pathological processes in the central nervous system, especially in young animals.

Karasek (1972) demonstrated that rats treated with cerebrolysine and afterwards exposed to anoxia were much less susceptible to this factor. The increased resistance to anoxia caused by cerebrolysine treatment was obviously age-dependent, being most pronounced in 35-day-old rats and much less evident in very young and adult ones. The same author established that the occurrence of cardiac arrest following electric stimulation of *nervus vagus* was much lower in cerebrolysine pretreated animals. Sommer and Quandt (1972) on the contrary reported an enhancement of differentiation of the cerebral cortex, and increase of activation and proliferation of mitochondria and glial cells in young rats treated with cerebrolysine.

Harrer et al., (1972) established a protective influence of large doses of cerebrolysine against the noxious effects of severe hypoglycaemia on the central nervous system. Similar effects have been observed by Hetzel and Niedermeyer (1955).

The above quoted authors ascribe tentatively these protective effects of cerebrolysine in various pathological states as well as the inciting influence of this preparation on the physiological brain development to the amino acids contained in this preparation, which might exert a stimulating action on the brain's amino acid metabolism.

Our own results, demonstrating the protective effect of cerebrolysine on the toxic sequelae of TET administration in the early stage of extrauterine development seem to indicate, that this preparation assists the animal in overcoming the negative immediate effects of the poison and in recovering from the intoxication without serious, permanent consequences, such as retardation of both general and brain development.

Whether this effect should be attributed to a substituting or stimulating effect of the parenterally administered amino acids and peptides on the toxically (triethyl tin poisoning) inhibited metabolism of low molecular weight nitrogen compounds of the brain has not, however, been proved yet, and thus must remain in the sphere of speculation.

M. Wender, O. Mularek, A. Piechowski

OCHRONNY WPLYW CEREBROLIZYNY PRZED NASTĘPSTWAMI ZATRUCIA TRÓJETYLKIEM CYNY WE WCZESNYM OKRESIE ŻYCIA POZAPŁODOWEGO

Streszczenie

Badano wpływ podania 0.015 ml cerebrolizyny (produkcji firmy Ebeve — Unterach, Austria) przez 4 kolejne dni na następstwa rozwojowe zatrucia trójetylkiem cyny (TET), podanym dootrzewnowo w dawce 10 mg na kg wagi ciała w 6 dniu życia pozapłodowego szczurów białych.

Otrzymane wyniki wykazały ochronne działanie cerebrolizyny na opóźnienie ogólnego rozwoju, włączając w to dojrzewanie mózgu, wywołane przez zatrucie TET we wczesnym okresie życia pozapłodowego. Najbardziej wyraźnie był widoczny wpływ cerebrolizyny u zwierząt, które osiągnęły wiek dojrzały, które wykazały w przeciwieństwie do zwierząt, które nie otrzymały tego leku, prawie normalną wagę ciała oraz wagę mózgu. Cerebrolizyna nie wywierała natomiast uchwytne go wpływu na normalny rozwój szczurów.

Wyniki nasze wskazują, że podanie hydrolizatu białek mózgu bezpośrednio po toksycznym zaburzeniu metabolizmu mózgu wywiera dodatni wpływ zmniejszając ogólnie toksyczne działanie TET u zwierząt niedojrzałych, zapewniając w ten sposób dalsze prawidłowe dojrzewanie.

M. Вендер, О. Мулярек, А. Пеховски

ЗАЩИТНОЕ ВЛИЯНИЕ ЦЕРЕБРОЛИЗИНА ПРОТИВ ПОСЛЕДСТВИЙ
ОТРАВЛЕНИЯ ТРИЭТИЛОВЫМ ОЛОВОМ
В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ВНЕУТРОБНОЙ ЖИЗНИ

Резюме

Было изучено влияние подачи 0,015 мл церебролизина (производства фирмы Эбеве-Унтерах, Австрия) в течение 4 дней на нарушения развития, вызванного отравлением триэтиловым оловом (ТЭО), введенным внутривентриально в дозе 10 мг на кг веса тела на 6 день внеутробной жизни белых крыс.

Полученные результаты обнаружили защитное влияние церебролизина при задержке общего развития, включая также созревание мозга, вызванной отравлением ТЭО, в раннем периоде внеутробной жизни. Наиболее выраженным было влияние церебролизина у животных, которые достигли зрелого возраста. У этих животных в отличие от животных, которые не получали этого медикамента, были почти нормальными вес тела и вес мозга. В то же время церебролизин не оказывал заметного влияния на нормальное развитие крыс.

Наши результаты показывают, что подача гидролизата белков мозга непосредственно после токсического нарушения метаоблизма мозга оказывает положительное влияние уменьшая общее токсическое воздействие ТЭО у незрелых животных, обеспечивая таким образом дальнейшее правильное созревание.

REFERENCES

1. Harrer, G.: Ergebnisse mit einem Gehirn-Hydrolysat. Tagung der österreichischen Arbeitsgemeinschaft f. Neuro-psychopharmakologie in Salzburg. *Ärztl. Praxis* 1972, 24, 3595—3596.
2. Harrer, G., Melnizky, U., Wagner, F.: Wirkweise und therapeutische Wirksamkeit einer Gehirnhydrolysates. *Arzneim.-Forsch.* 1972, 22, 3—15.
3. Hetzel, H., Niedermeyer, E.: Der Gehirnhydrolysat-Weckeffekt im hypoglykämischen Koma und sein hirnelektrisches Bild. *Arch. f. Psychiatr. u. Z. Neur.* 1955, 193, 369—382.
4. Karasek — cyt. wg Harrera, poz. 1.
5. Sommer, H., Quandt, J.: Zur Wirkung eines Hirnhydrolysates auf zentralnervöse Strukturen unter Berücksichtigung elektronenoptischer Ergebnisse. *Schw. Arch. f. Neur. Neuroch. u. Psych.* 1973, 112, 373—385.
6. Wender, M., Mularek, O., Piechowski, A.: The effect of triethyl tin intoxication at the early stage of extrauterine life on cerebral myelination. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 13—18.

Authors' address: Department of Neurology, Institute of Diseases of Nervous System and Sensory Organs, Medical Academy, 60-355 Poznań, Poland, 49 Przybyszewskiego Str.

M. SIKORSKA, B. BICZOWA, W. BICZ, M. SKONIECZNA

GLYCOGEN CONTENT, GLYCOLYTIC AND RESPIRATORY ACTIVITY AND ATP, ADP AND AMP CONCENTRATIONS IN RAT BRAIN FOLLOWING TRICHLORPHON (DIPTEREX) INTOXICATION*

Laboratory of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, Warsaw

Head: Doc. Dr. W. Bicz

Results of our previous work indicate that intoxication of rats with dichlorvos (DDVP) leads to an increase of glycogen content in the cerebral hemispheres without affecting the respiratory and glycolytic activity (Biczowa et al., 1975). On repeated administration of the pesticide, a slight increase of ATP took place.

The present work aimed at evaluating the glycogen level, glycolysis, respiration and adenine nucleotides concentrations in rat brain following intoxication with trichlorphos. This compound is a structural analogue of dichlorvos and as a phosphoorganic insecticide has found wide application in agriculture. At present it may be assumed that trichlorphos is metabolized in the organism to dichlorvos (Metcalf et al., 1959) and that the latter compound is most probably responsible for the *in vivo* effect of the former.

MATERIAL AND METHODS

White male rats weighing 200 g, derived from isolated stock and paired randomly were used. The studies comprised 3 experimental groups corresponding to 3 intoxication models. The animals of group I were given trichlorphos (0,0-dimethyl-1-hydroxyl-2, 2, 2, trichloroethylphosphonate, Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences) in 2-, 10- and 50% of LD₅₀ doses and were examined 2 hrs after administration of the pesticide. The animals of group II were given the pesticide in the same doses during 14 days, every day except Sundays. Group III consisted of animals which received trichlorphos for 90 days (except Sundays and holidays) in a 2% LD₅₀ dose. The pesticide was administered per os in water solution. The LD₅₀ dose for male rats was considered to be 630 mg/kg body weight (Rusiecki 1973). The control groups consisted of animals receiving water in the same conditions. The animals were sacrificed by decapitation without anesthesia. Glycogen and nucleotides were assayed in the cerebral hemispheres after decapitation and freezing the tissue in liquid nitrogen. Glycogen was determined indirectly by measuring glucose liberated from isolated and purified glycogen by the colorimetric method of Nelson (1944).

* This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (Research Programme No 09.4.1.3).

Table 1. Glycogen level in rat brain and glycolytic activity in aerobic conditions of rat brain homogenates following trichlorphon (dipterex) intoxication
 Tabela 1. Poziom glikogenu w mózgu szczura oraz aktywność glikolityczna w warunkach tlenowych homogenatów mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem (dipterexem)

Model of intoxication Model zatrucia		Glycogen level mg glucose/100 g wet tissue			Lactate production μmoles/hr/mg protein			Glucose consumption μmoles/hr/mg protein		
Period of pesticide administration (days) Okres podawania pestycydu (dni)	dose of pesticide % LD ₅₀ dawka pestycydu % LD ₅₀	Poziom glikogenu mg glukozy/100 g mokrej tkanki			Produkcja mleczanu μmole/godz/mg białka			Zużycie glukozy μmole/godz/mg białka		
		$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p
1	0 Control	95.7±2.6	(6)		3.24±0.16	(9)		2.48±0.17	(9)	
	2	111.6±3.2	(6)	< 0.05	3.63±0.10	(6)	> 0.05	2.90±0.21	(6)	> 0.05
	10	120.7±3.2	(7)	< 0.05	3.17±0.05	(6)	> 0.05	2.65±0.08	(6)	> 0.05
	50	126.3±1.0	(6)	< 0.05	3.42±0.13	(8)	> 0.05	2.33±0.19	(6)	> 0.05
14	0 Control	83.5±1.8	(7)		3.17±0.16	(9)		2.35±0.22	(9)	
	2	101.6±6.2	(7)	< 0.05	3.31±0.18	(7)	> 0.05	2.39±0.12	(7)	> 0.05
	10	118.5±2.7	(6)	< 0.05	3.13±0.04	(7)	> 0.05	2.44±0.07	(7)	> 0.05
	50	128.5±2.4	(7)	< 0.05	3.42±0.21	(6)	> 0.05	2.52±0.11	(6)	> 0.05
90	0 Control	78.6±2.2	(10)		4.00±0.10	(8)		2.64±0.15	(8)	
	2	89.9±1.6	(10)	< 0.05	3.65±0.16	(10)	> 0.05	2.59±0.24	(10)	> 0.05

\bar{x} — arithmetic mean
średnia arytmetyczna

Sx — mean error of the mean
średni błąd średniej

n — number of animals
liczba zwierząt

p — probability
prawdopodobieństwo

ATP, ADP and AMP were assayed spectrophotometrically in enzymatic tests (Adam 1962, 1962a).

Glycolysis was evaluated in homogenates of the cerebral hemispheres by measuring lactate production (Horn et al., 1956) and glucose consumption (Hugget et al. 1957) in aerobic and anaerobic conditions. Oxygen consumption by the homogenates of cerebral hemispheres was determined directly by the manometric method (Umbreit et al. 1957) in a Warburg apparatus.

The details of the methods were the same as described previously (Biczowa et al. 1975).

RESULTS

Both one-time and repeated administration to rats of trichlorphon in 2, 10 and 50% LD₅₀ doses were found to cause a statistically significant increase of glycogen level in the cerebral hemispheres (Table 1), depending on the dose applied. In the case of the highest dose (50% LD₅₀) these increases were highest too and amounted to 32% and 54%, respectively, for the one-time and 14-day models.

After 90-day administration of trichlorphon in a 2% LD₅₀ dose, the glycogen level was found to be elevated by 14% in relation to the control.

The glycolytic activity of homogenates remained unaffected by trichlorphon intoxication and the same held for lactate production and glucose consumption in aerobic (Table 1) and anaerobic conditions (Table 2).

Table 2. Anaerobic glycolysis of rat brain homogenates following trichlorphon intoxication
Tabela 2. Glikoliza beztlenowa homogenatów mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem

Model of intoxication Model zatrucia		Lactate production µmoles/hr/mg protein produkcja mlecyanu µmole/godz./mg białka			Glucose consumption µmoles/hr/mg protein zużycie glukozy µmole/godz./mg białka		
Period of pesticide administra- tion (days) Okres poda- wania pesty- cydu (dni)	dose of pesticide % LD ₅₀ dawka pes- tycydu % LD ₅₀	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p
		1	0 Control	3.44±0.16	(9)		1.71±0.12
	2	3.14±0.10	(6)	> 0.05	1.85±0.14	(6)	> 0.05
	10	3.18±0.06	(6)	> 0.05	1.97±0.10	(6)	> 0.05
	50	3.21±0.09	(8)	> 0.05	1.83±0.33	(4)	> 0.05
14	0 Control	3.51±0.12	(9)		1.78±0.15	(9)	
	2	3.49±0.18	(7)	> 0.05	1.58±0.10	(7)	> 0.05
	10	3.24±0.07	(7)	> 0.05	1.70±0.15	(7)	> 0.05
	50	3.62±0.24	(6)	> 0.05	—		
90	0 Control	4.20±0.12	(8)		2.08±0.22	(8)	
	2	4.31±0.07	(10)	> 0.05	2.01±0.24	(9)	> 0.05

Explanations in Table 1.

Objaśnienia w tabeli 1

The results of parallel assays of the respiratory activity of cerebral hemispheres homogenates are listed in Table 3. No significant changes in the intensity of oxygen utilization in the presence of either glucose or succinate were observed to follow one-time intoxication by any dose of trichlorophon, as well as 14-day intoxication by 50% and 10% LD₅₀ dose. Only in the case of a 2% LD₅₀ dose in the 14-day intoxication model a slight, though statistically significant, stimulation (by 14%) of oxygen consumption by the homogenates was noted in the presence of glucose but not of succinate. Administration of the pesticide in a 2% LD₅₀ dose for 90 days did not significantly influence the respiratory activity of the homogenates.

Table 4 illustrates the effect of trichlorophon intoxication on the adenosine nucleotides levels in rat brain. A slight (4%), but statistically significant, increase of brain ATP level was observed to result from one-time intoxication with a 50% LD₅₀ dose. Administration of 10% and 50% LD₅₀ dose of trichlorophon for 14 days also led to an increase of brain ATP by about 14% and 17% respectively. An increased brain ATP level was also observed to accompany the 90-day intoxication with a 2% LD₅₀ dose. This increase was slight (by 7%) but statistically significant. The ADP and AMP levels were unchanged in all the experimental conditions.

Table 3. The respiration of rat brain homogenates following trichlorophon intoxication

Tabela 3. Oddychanie homogenatów mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem

Model of intoxication Model zatrucia		Oxygen uptake ($\mu\text{l O}_2/\text{hr}/\text{mg protein}$) Zużycie tlenu ($\mu\text{l O}_2/\text{godz.}/\text{mg białka}$)					
Period of insecticide administration (days) Okres podawania pestycydu (dni)	dose of pesticide % LD ₅₀ dawka pestycydu % LD ₅₀	substrate: glucose substrat: glukoza			succinate bursztynian		
		$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p
1	0 Control	25.1±1.14	(7)		39.6±1.47	(7)	
	2	24.8±0.69	(6)	> 0.05	40.0±2.19	(6)	> 0.05
	10	24.4±2.12	(6)	> 0.05	39.9±1.44	(6)	> 0.05
	50	25.8±0.98	(6)	> 0.05	41.4±1.21	(6)	> 0.05
14	0 Control	23.2±0.35	(9)		34.6±1.66	(8)	
	2	26.3±1.33	(7)	< 0.05	36.6±1.81	(7)	> 0.05
	10	24.4±0.70	(7)	> 0.05	34.4±1.31	(7)	> 0.05
	50	22.4±0.60	(6)	> 0.05	33.6±1.87	(6)	> 0.05
90	0 Control	21.0±0.86	(14)		32.1±0.73	(13)	
	2	21.8±0.40	(16)	> 0.05	32.7±0.090	(14)	> 0.05

Explanations in Table 1

Objaśnienia w tabeli 1

Table 4. ATP, ADP and AMP concentrations in rat brain following trichlorophon (dipterex) intoxication

Tabela 4. Stężenia ATP, ADP, AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem

Model of intoxication Model zatrucia		Nucleotides concentrations (μ moles/g wet tissue) Stężenia nukleotydów (μ mole/g mokrej tkanki)								
Period of pesticide administration (days) Okres podawania pestycydu (dni)	dose of pesticide % LD ₅₀ Dawka pestycydu % LD ₅₀	ATP			ADP			AMP		
		$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p
1	0 Control	6.26 \pm 0.27	(5)		1.94 \pm 0.03	(5)		0.57 \pm 0.01	(5)	
	2	6.13 \pm 0.15	(6)	> 0.05	1.90 \pm 0.02	(6)	> 0.05	0.51 \pm 0.01	(6)	> 0.05
	10	6.07 \pm 0.34	(6)	> 0.05	1.81 \pm 0.03	(6)	> 0.05	0.52 \pm 0.06	(6)	> 0.05
	50	6.47 \pm 0.10	(6)	< 0.05	1.88 \pm 0.01	(6)	> 0.05	0.51 \pm 0.02	(6)	> 0.05
14	0 Control	5.85 \pm 0.19	(6)		2.08 \pm 0.07	(6)		0.60 \pm 0.01	(6)	
	2	5.88 \pm 0.09	(7)	> 0.05	2.01 \pm 0.07	(7)	> 0.05	0.58 \pm 0.02	(7)	> 0.05
	10	6.69 \pm 0.10	(6)	< 0.05	2.13 \pm 0.06	(6)	> 0.05	0.62 \pm 0.03	(6)	> 0.05
	50	6.82 \pm 0.22	(7)	< 0.05	2.13 \pm 0.08	(7)	> 0.05	0.59 \pm 0.04	(7)	> 0.05
90	0 Control	5.99 \pm 0.07	(10)		1.92 \pm 0.04	(10)		0.51 \pm 0.01	(10)	
	2	6.39 \pm 0.08	(9)	< 0.05	1.96 \pm 0.01	(9)	> 0.05	0.49 \pm 0.01	(9)	> 0.05

Explanations in Table 1.

Objaśnienia w tabeli 1.

DISCUSSION

The experimental models applied in these studies provided the possibility to evaluate the behaviour of the major pathways of glucose metabolism in the central nervous system following one-time (short-term) or repeated (chronic) intoxication with phosphoorganic insecticide trichlorophon. Both one-time and repeated intoxications with doses lower than LD_{50} led to an elevation of glycogen and ATP levels in brain. The same doses remained without essential effect on the glycolytic and respiratory activity of the cerebral hemisphere homogenates. The stimulation of respiration observed as consequence of administration of 2% LD_{50} dose for 14 days was slight and probably does not reflect a biologically important process. The mechanism of the rise of glycogen and ATP levels in the brain following intoxication with phosphoorganic insecticides has not yet been established. The phenomenon of transient glycogen accumulation in the brain has been observed in a variety of models of central nervous system hypoxia (Mossakowski et al. 1968, Śmiałek et al. 1973). It has been suggested that the increase of glycogen level in the brain may be a characteristic reaction of the nerve tissue to hypoxia. On the other hand, data have accumulated indicating that phosphoorganic insecticides may impair the respiratory chain in animal cells (Syrowatka 1969, Sitkiewicz et al. 1975, Pachecka et al. 1975). It may thus be inferred that the changes of glycogen level in rat brain following intoxication by trichlorophon might result from hypoxia of the central nervous system. Another possibility to be considered is that of disturbances of a hormonal regulatory system insuline-adrenaline.

Previous studies (Biczowa et al. 1975) revealed that dichlorvos (DDVP) a structural analogue of trichlorophon, also produces a rise of the glycogen and ATP levels in rat brain in chronic models, the effects exerted by trichlorophon, however, are more pronounced.

The foregoing results suggest that phosphoorganic insecticides, beside inhibiting acetylcholinesterase activity, may cause disturbances of energy and carbohydrate metabolism in the central nervous system.

The authors wish to thank Ms: Teresa Pańkowska, Barbara Dyjak, Halina Nowicka, Ewa Ohde, Teresa Bok and Krystyna Podwójcik for skillful technical assistance.

M. Sikorska, B. Biczowa, W. Bicz, M. Skonieczna

POZIOM GLIKOGENU, AKTYWNOŚĆ GLIKOLITYCZNA I ODDECHOWA ORAZ STĘŻENIA ATP, ADP I AMP W MÓZGU SZCZURA W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA INSEKTYCYDEM FOSFOROORGANICZNYM — TRICHLORFONEM (DIPTEREKS)

Streszczenie

Przeprowadzono badania biochemiczne mózgów szczurów dorosłych, poddawanych jednorazowemu i wielokrotnemu (14 i 90 dni) zatruciu trichlorfonem w dawkach 2, 10 i 50% LD_{50} . Poziom glikogenu i nukleotydów adeninowych w półkulach mózgu oznaczano metodami spektro-

fotometrycznymi. Aktywność glikolityczną oceniano na podstawie produkcji mleczanu i zużycia glukozy przez homogenaty półkul mózgowych.

Stwierdzono zwiększenie poziomu glikogenu po jednorazowym i wielokrotnym zatruciu, przy czym przyrost ten był zależny od dawki pestycydu. Glikoliza homogenatów mózgow w warunkach tlenowych i beztlenowych nie ulegała zmianie zarówno po jednorazowym jak i wielokrotnym podawaniu pestycydu, podobnie jak i intensywność zużycia tlenu przez homogenaty mózgu. W następstwie 14-dniowego podawania trichlorfonu stwierdzono nieznaczny stymulację oddychania w obecności glukozy. Niewielki wzrost poziomu ATP przy braku znamienych różnic w stężeniach ADP i AMP obserwowano u zwierząt doświadczalnych niezależnie od wielkości dawki i czasu stosowania pestycydu.

Uzyskane wyniki wskazują, że trichlorfon może powodować zaburzenia w metabolizmie węglowodanowo-energetycznym ośrodkowego układu nerwowego.

М. Сикорска, Б. Бичова, В. Бич, М. Сконечна

УРОВЕНЬ ГЛИКОГЕНА, ГЛИКОЛИТИЧЕСКАЯ И ДЫХАТЕЛЬНАЯ
АКТИВНОСТЬ, А ТАКЖЕ СОДЕРЖАНИЕ АТФ, АДФ И АМФ
ВСЛЕДСТВИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФООРГАНИЧЕСКИМ ИНСЕКТИЦИДОМ
ТРИХЛОРФОНОМ (ДИПТЕРЕКС)

Резюме

Были проведены биохимические исследования мозга взрослых крыс, подвергаемых однократному и многократному (14 и 90 дней) отравлению трихлорфоном в дозах 2, 10 или 50% ЛД₅₀. Уровень гликогена и адениновых нуклеотидов в полушариях мозга определялся спектрофотометрическими методами. Гликолитическая активность оценивалась на основе образования лактата и использования глюкозы гомогенатами полушарий мозга.

Было обнаружено увеличение уровня гликогена после однократного и многократного отравления, прирост уровня гликогена зависел от дозы пестицида. Гликолиз гомогената мозгов в аэробных и анаэробных условиях так же, как и интенсивность потребления кислорода гомогенатами мозга не изменялись как после однократного, так и после многократного введения пестицида. После 14-дневного введения трихлорфона была обнаружена незначительная стимуляция дыхания в присутствии глюкозы. Незначительный рост уровня АТФ при отсутствии значимых различий в концентрациях АДФ и АМФ наблюдался у экспериментальных животных независимо от времени и дозы пестицида.

Полученные результаты указывают, что трихлорфон может вызывать нарушения в углеводно-энергетическом метаболизме центральной нервной системы.

REFERENCES

1. Adam H.: „Adenosin-5'-triphosphat Bestimmung mit Phosphatglycerat-Kinase". W: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim 1962, 539—543.
2. Adam H. a): „Adenosin-5'-diphosphat und Adenosin-5'-monophosphat". W: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer H. U. (ed.), Verlag Chemie, Weinheim 1962, 573—577.
3. Biczowa B., Sikorska M., Bicz W., Pachecka J., Suliński A.: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenia ATP, ADP, AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropatologia Polska*, 1975, 13, 259—272.

4. Horn H. D., Bruns F. H.: Quantitative Bestimmung von L(+) Milchsäure mit Milchsäuredehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 21, 378—380.
5. Hugget A. S. G., Nixon D. A.: Enzymic Determination of Blood Glucose. *Biochem. J.* 1957, 66, 12P.
6. Mossakowski M. J., Long D. N., Meyers R. E., De Curet H. H., Klatzo I.: Early histochemical changes in perinatal asphyxia. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1968, 27, 500—516.
7. Nelson N.: The photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 1944, 153, 375—380.
8. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach *in vitro*. *Roczniki PZH*, 1975, 26, 347—356
9. Pronaszko-Kuczyńska A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Changes in the glycogen content of the brain during experimental ischemia. *Pol. Med. J.* 1972, 11, 991—1003.
10. Rusiecki W.: Toksykologia środków ochrony roślin. PZWL, Warszawa 1973, 75—103.
11. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznymi insektycydami dichlorofosem i trichlorfonem. *Neuropatologia Polska*, 1975, 13, 273—281.
12. Syrowatka T.: Wpływ niektórych insektycydów fosforoorganicznych na fosforylację oksydacyjną i regulację oddychania mitochondriów wątroby szczura. *Roczniki PZH*, 1969, 20, 557—562.
13. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucoseglycogen α -4-glucosyltransferase (EC 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1973, 24, 222—231.
14. Umbreit W. W., Burris R. H., Stauffer J. F.: W „Manometric Techniques”. Burgess Publ. Co., Minneapolis 1957, 64—78.

Author's address: Laboratory of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 02—097 Warszawa, Banacha Str. 1, Poland.

J. PACHECKA, A. SULIŃSKI, G. ZIÓLKOWSKA

THE ACTIVITIES OF SOME ESTERASES OF THE RAT BRAIN
AFTER INTOXICATION BY ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES,
DICHLORVOS AND TRICHLORPHON*)

Laboratory of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, Warszawa
Head: Doc. Dr. W. Bicz

A number of literature data, as well as the results of our previous studies (Piekarski et al., 1971; Syrowatka 1969; Biczowa et al., 1975; Pachecka et al., 1975; Sitkiewicz et al., 1975) indicate that organophosphate insecticides, acting mainly as acetylcholinesterase inhibitors, also affect some other enzymes and metabolic processes. Hitherto no investigation were performed on the effect of these pesticides on the activity of phosphatases in the central nervous system. These enzymes are known to participate in the intra — and intercellular transport and in the regulation of a number of metabolic shunts (Cohen, 1970).

The present work aimed at evaluating the effects of intoxication by Dichlorvos (DDVP) and Trichlorphon (Dipterex) on alkaline phosphatase (E.C.3.1.3.1.-ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase), acid phosphatase (E.C.3.1.3.2.-ortho-phosphoric monoester phosphohydrolase) and acetylcholinesterase (E.C.3.1.1.7.-acetylcholine hydrolase) activities in rat brain homogenates. These studies were prompted by the structural resemblance of the insecticides and artificial phosphatase substrates and by the data concerning inhibition of some hydrolases by other organophosphate compounds (Barzu et al., 1973).

MATERIAL AND METHODS

Male albino Wistar rats weighing 200—230 g were used in these experiments. Pesticides were administered per os in 50%, 10% and 2% LD₅₀ doses. As LD₅₀ dose was considered 80 mg/kg for Dichlorvos (0,0-Dimethyl-0-/2,2-dichlorovinyl/ /phosphate) and 630 mg/kg for Trichlorphon (0,0-Dimethyl-/1-hydroxy-2,2,2-trichloroethyl/ /phosphonate). The enzyme activities were assayed after one-time and 14-day intoxications by all the applied doses and after 90-days intoxication by

*) This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences. (Research Programme No. 09.4.1.3).

a 2% LD₅₀ dose. In the single intoxication model the rats were sacrificed two hours after pesticide administration and in both chronic intoxication models 24 hrs after administration of the last dose. The animals were decapitated without anesthesia and then the cerebral hemispheres were excised and subjected to homogenization. The following homogenates were used for the respective determinations: for alkaline phosphatase — 2% homogenates in distilled water prepared in a glass-glass Potter homogenizer, for acid phosphatase — 0,5% homogenates prepared as those for alkaline phosphatase, for acetylcholinesterase — 10% w/v homogenates in 0,1 M phosphate buffer pH 7,4, prepared in a glass-teflon Potter homogenizer. The homogenates for acetylcholinesterase determination were centrifuged for 10 min at 1100 × g, the pellets were washed again with identical volumes of phosphate buffer and the combined supernatants served to assay the enzyme activity. All homogenates were prepared at 0—4°C. The phosphatases were assayed by the Bessey-Lowry method (Linhard, 1962) and acetylcholinesterase according to Ellman (Ellman et al., 1961). The respective reactions mixtures were: for alkaline phosphatase (FV 1 ml) — 5.5. µmoles of p-nitrophenyl phosphate disodium salt, 50 µmoles of glycine buffer pH 10.5; 0.1. µmoles of MgCl₂ and about 200 µg homogenate proteins. The incubation was carried out 30 min. at 37°C and p-nitrophenol was estimated at 410 nm. For acid phosphatase (FV 1 ml) — 5.5 µmoles of p-nitrophenyl phosphate disodium salt, 25 µmoles of citrate buffer pH 4.8. and about 50 µg of homogenate protein. The reaction was carried out as given for alkaline phosphatase. For acetylcholinesterase (FV 2 ml) — 2 µmoles of acetylthiocholine iodide, 0.4 µmoles of Ellmans reagent (DTNB), 200 µmoles of phosphate buffer pH 7.4 and about 200 µg of homogenate proteins. The optical density was reading in every 60 sec. in the period of 5 min. at 412 nm. Protein in the homogenates was determined by the method of Kjeldahl (Tomaszewski, 1970). Statistical analysis was performed by Student's t test.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the activities of esterases in rat brain after intoxication with Dichlorvos.

One-time administration of the pesticide in a 50% LD₅₀ dose led to a decrease of the activity: of alkaline phosphatase by 45%, of acid phosphatase by 16% and of acetylcholinesterase by 58%. A single administration of the same pesticide in a 10% LD₅₀ dose caused a statistically significant reduction of alkaline phosphatase activity only, the reduction reaching 9%. A 2% LD₅₀ dose remained without effect on either of the enzyme activities.

Repeated administration of Dichlorvos was not found to affect the alkaline phosphatase activity in either of the doses and time intervals applied. The acid phosphatase activity underwent a 25% reduction after administration for 14 days of either 10 or 50% LD₅₀ doses, but was not affected by 2% LD₅₀ dose administered

Table 1. Activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase and acetylcholinesterase of rat brain following dichlorvos intoxication
 Tabela 1. Aktywność fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i acetylcholinesterazy mózgu szczura w następstwie zatrucia dichlorfosem

Model of intoxication Model zatrucia		Alkaline phosphatase (nmoles/hr/mg protein) Fosfataza zasadowa (nmole/godz/mg białka)			Acid phosphatase (nmoles/hr/mg protein) Fosfataza kwaśna (nmole/godz/mg białka)			Acetylcholinesterase (nmoles/hr/mg protein) Acetylcholinesteraza (nmole/godz/mg białka)		
Period of pesticide administration (days) Okres podawania pestycydu (dni)	dose of pesticide % LD ₅₀ dawka pestycydu % LD ₅₀	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p
1	0 Control Kontrola	1213 ± 47.0	(7)		383 ± 21.0	(7)		46 ± 3.0	(14)	
	2	1134 ± 39.8	(7)	≥ 0.05	350 ± 21.0	(7)	≥ 0.05	52 ± 3.8	(6)	≥ 0.05
	10	1101 ± 42.2	(7)	≤ 0.05	346 ± 22.2	(7)	≥ 0.05	40 ± 2.0	(6)	≥ 0.05
	50	666 ± 52.0	(7)	≤ 0.05	319 ± 18.2	(7)	≤ 0.05	19 ± 2.2	(6)	≤ 0.05
14	0 Control Kontrola	1471 ± 91.8	(7)		539 ± 28.2	(7)		37 ± 3.5	(10)	
	2	1410 ± 92.8	(5)	≥ 0.05	480 ± 32.5	(6)	≥ 0.05	30 ± 1.9	(8)	≥ 0.05
	10	1452 ± 28.7	(7)	≥ 0.05	396 ± 20.5	(7)	≤ 0.05	25 ± 1.3	(8)	≤ 0.01
	50	1584 ± 51.2	(7)	≥ 0.05	398 ± 19.3	(6)	≤ 0.05	15 ± 1.7	(9)	≤ 0.01
90	0 Control Kontrola	1361 ± 74.3	(8)		476 ± 29.0	(8)		52 ± 2.5	(8)	
	2	1409 ± 60.0	(10)	≥ 0.05	457 ± 18.2	(10)	≥ 0.005	58 ± 1.7	(8)	≥ 0.06

$\bar{x} \pm Sx$ — arithmetic mean ± mean error of the mean
 średnia arytmetyczna ± średnie odchylenie od średniej

p — probability
 prawdopodobieństwo

n — number of experiments
 ilość doświadczeń

for either 14 or 90 days. The acetylcholinesterase activity dropped after 14-day administration of 50 and 10% LD₅₀ doses of the pesticide by 60% and 32% respectively. No effect in respect to this enzyme was noted after administration of 2% LD₅₀ dose for 14 and 90 days.

Table 2 presents the activities of the enzymes after intoxication with Trichlorphon.

One-time administration of Trichlorphon in 50% and 10% LD₅₀ doses caused reduction of the acetylcholinesterase activity, respectively by 74% and 55% but did not at all affect either of the two phosphatases. A 2% LD₅₀ dose produced no changes of the enzyme activities. After 14-day administration of Trichlorphon in 50%, 10% and 2% LD₅₀ a decrease of the acetylcholinesterase activity by 70, 40 and 19% respectively, became apparent. The alkaline phosphatase activity showed an increase after 14-day administration of Trichlorphon in 50% LD₅₀ and 10% LD₅₀ doses by 10% and 14%, whereas the acid phosphatase activity remained unchanged under these conditions.

Administration of Trichlorphon for 90 days in a 2% LD₅₀ caused a decrease of the acetylcholinesterase activity by 20% and of that of alkaline phosphatase by 18%, without affecting the acid phosphatase. The differences between the control enzymatic activities in the 90-day intoxication model and in the other models are probably due to genetic factors (In this case the rats were from other farms).

These studies aimed at elucidating the problem of the toxic effects of pesticides on the central nervous system. The experimental models applied make possible determination of the activities of cerebral esterases in various states of intoxication, depending on the pesticide dose and the administration period. Measurements after single intoxication provided the possibility of evaluating the direct effects of insecticides and their metabolites on the enzymatic activity. In turn, the behaviour of esterases after repeated administration may be considered as a manifestation of metabolic disturbances of the central nervous system as the consequence of chronic intoxication.

For those studies, pesticides differing in their chemical structure were chosen, which gave the possibility to investigate the correlation between the structure and biological activity. The pesticides were found to differ in their activity. The differences presumably result from their various affinity to the active centres of the esterases. The different chemical structure of Dichlorvos and Trichlorphon may also be the cause of differences in their resorption from the gastrointestinal tract as well as in distribution and metabolism in the tissues (Arthur, Casida, 1957; Bull, Ridgway, 1969; Hodgson, Casida, 1962; Hassan, et al., 1965; Potter et al., 1973). This problem is important in view of the fact that presumably Dichlorvos and Trichlorphon do not inhibit phosphatases directly, but via biological active metabolites. Rapid degradation of Dichlorvos and Trichlorphon in the rat organism confirms this presumption (Arthur, Casida, 1958; Bull, Ridgway, 1968; Casida et al., 1962). Our studies do not support the view that Dichlorvos is a metabolite

Table 2. Activities of alkaline phosphatase, acid phosphatase and acetylcholinesterase of rat brain following trichlorphon intoxication

Tabela 2. Aktywność fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej i acetylocholinesterazy w mózgu szczura w następstwie zatrucia trichlorfonem

Model of intoxication Model zatrucia		Alkaline phosphatase (nmoles/hr/mg protein) Fosfataza alkaliczna (nmole/godz/mg białka)			Acid phosphatase (nmoles/hr/mg protein) Fosfataza kwaśna (nmole/godz/mg białka)			Acetylcholinesterase (nmoles/hr/mg protein) Acetylocholinesteraza (nmole/godz/mg białka)		
Period of pesticide administration (days) Okres podawania pestycydu (dni)	dose of pesticide % LD ₅₀ dawka pestycydu % LD ₅₀	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p	$\bar{x} \pm Sx$	n	p
1	0 Control Kontrola	1133 ± 19.2	(7)		375 ± 28.8	(7)		58 ± 2.5	(12)	
	2	1154 ± 20.3	(7)	≥ 0.05	377 ± 29.1	(7)	≥ 0.05	53 ± 3.2	(6)	≥ 0.05
	10	1149 ± 21.5	(7)	≥ 0.05	384 ± 30.4	(7)	≥ 0.05	27 ± 1.1	(6)	≤ 0.05
	50	1127 ± 24.8	(7)	≥ 0.05	379 ± 28.2	(7)	≥ 0.05	15 ± 2.1	(6)	≤ 0.05
14	0 Control Kontrola	1175 ± 41.2	(7)		431 ± 36.6	(7)		76 ± 2.5	(7)	
	2	1324 ± 81.8	(7)	≥ 0.05	439 ± 26.7	(7)	≥ 0.05	62 ± 2.9	(7)	≤ 0.05
	10	1346 ± 61.8	(7)	≤ 0.05	441 ± 22.0	(7)	≥ 0.05	46 ± 2.6	(7)	≤ 0.05
	50	1298 ± 48.5	(7)	≤ 0.05	428 ± 25.5	(7)	≥ 0.05	23 ± 0.9	(7)	≤ 0.05
90	0 Control Kontrola	580 ± 25.5	(6)		1397 ± 34.3	(6)		47 ± 2.5	(6)	
	2	479 ± 26.2	(6)	≤ 0.05	1388 ± 65.1	(6)	≥ 0.05	37 ± 1.1	(6)	≤ 0.05

For explanations see Table 1.

Objaśnienia w tabeli 1.

of Trichlorphos responsible for its biological activity (Metcalf, et al., 1959), since in such a case both pesticides would exert a similar effect on the activities of the examined enzymes. The lack of data concerning the rate of resorption, metabolism and penetration of Dichlorvos and Trichlorphos and their metabolites into the brain does not allow to explain unequivocally the differences between the effects of the two insecticides on the activities of brain esterases. The increased alkaline phosphatase activity after 14- or 90-day administration of Trichlorphos is possibly related to the increment of its content in the brain, and not to enhanced activity; the mechanism of this process, however still remains obscure. Dichlorvos appears to affect more strongly the brain phosphatases than Trichlorphos and the same holds true for serum phosphatases, as shown by *in vivo* studies (Suliński et al., 1975).

The present study indicates that intoxication by Dichlorvos or Trichlorphos, beside inhibiting acetylcholinesterase activity, affects the activity of brain phosphatases. This phenomenon should be taken into consideration in evaluating the toxic effects of organophosphate insecticides on the central nervous system.

The authors gratefully acknowledge the technical assistance of Mrs Hanna Pietrzykowska and Mrs Krystyna Podwójcik.

J. Pachecka, A. Suliński, G. Ziółkowska

AKTYWNOŚĆ WYBRANYCH ESTERAZ MÓZGU SZCZURA W NASTĘPSTWIE ZATRUCIA INSEKTYCYDAMI FOSFOROORGANICZNYMI DICHLORFOSEM I TRICHLORFONEM

Streszczenie

Przeprowadzono badanie biochemiczne mózgow szczurów zatruczanych dichlorfosem i trichlorfonem. Białym szczirom, samcom o ciężarce 200—230 g, podawano dichlorfos lub trichlorfon w dawkach 2%, 10% i 50% LD₅₀ jednorazowo lub przez okres 14 dni oraz w dawce 2% LD₅₀ przez okres 90 dni. W homogenatach mózgow szczurów badano aktywność acetylcholinesterazy, fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej.

Dwie godziny po jednorazowym podaniu dichlorfosu w dawce 50% LD₅₀ obserwowano obniżenie aktywności wszystkich badanych enzymów. W tych samych warunkach trichlorfon powoduje tylko obniżenie aktywności acetylcholinesterazy. Po jednorazowym podaniu dichlorfosu w dawce 10% LD₅₀ obserwowano obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej, podczas gdy taka sama dawka trichlorfonu powodowała obniżenie aktywności acetylcholinesterazy. Pozostałe dawki insektycydów nie miały wpływu na aktywność badanych esteraz.

Dichlorfos podawany przez 14 dni w dawkach 50% i 10% LD₅₀ obniża aktywność acetylcholinesterazy i fosfatazy kwaśnej, natomiast podawany przez 90 dni w dawce 2% LD₅₀ nie wywiera wpływu na aktywność tych enzymów. Trichlorfon podawany przez 14 dni we wszystkich badanych dawkach obniża aktywność acetylcholinesterazy, w dawkach 10% i 50% LD₅₀ podwyższa aktywność fosfatazy alkalicznej. Podawanie trichlorfonu przez 90 dni w dawce 2% LD₅₀ powoduje zarówno obniżenie aktywności acetylcholinesterazy jak i fosfatazy alkalicznej. Obserwowane zmiany aktywności badanych esteraz mogą powodować zaburzenie funkcji ośrodkowego układu nerwowego.

Я. Пахецка, А. Сулиньски, Г. Зюлковска

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ЭСТЕРАЗ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ
ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФООРГАНИЧЕСКИМИ ИНСЕКТИЦИДАМИ
ДИХЛОРФОСОМ И ТРИХЛОРФОНОМ

Резюме

Были проведены биохимические исследования мозга крыс отравляемых дихлорфосом (ДХФ) и трихлорфоном (Диптерекс). В опытах были использованы самцы белых крыс, весом 200—230 г., которым подавали дихлорфос или трихлорфон в дозах 2%, 10% или 50% ЛД₅₀ или в течение 14 дней или в течение 90 дней в дозе 2% ЛД₅₀.

В мозговых гомогенатах крыс исследовали активность ацетилхолинэстеразы щелочной фосфатазы и кислой фосфатазы.

Через 2 часа от момента однократной подачи дихлорфоса в дозе 50% ЛД₅₀ наблюдалось снижение активности всех исследуемых энзимов. В этих же условиях трихлорфон вызывает лишь снижение ацетилхолинэстеразной активности. Однократная подача дихлорфоса в дозе 10% ЛД₅₀ вызывает снижение только активности щелочной фосфатазы, а такая же доза трихлорфона — снижение активности ацетилхолинэстеразы. Остальные дозы не влияют на активность эстераз. Дихлорфос, подаваемый в течение 14 дней в дозах 50% и 10% ЛД₅₀ снижает активность ацетилхолинэстеразы и кислой фосфатазы. 90-дневная подача дихлорфоса в дозе 2% ЛД₅₀ не влияет на активность исследуемых эстераз. Все исследуемые дозы трихлорфона, подаваемые в течение 14 дней снижали активность ацетилхолинэстеразы, в дозах 10% и 50% ЛД₅₀ повышали активность щелочной фосфатазы. 90-дневная подача трихлорфона в дозе 2% ЛД₅₀ вызывает снижение активности ацетилхолинэстеразы и щелочной фосфатазы.

Наблюдаемые изменения активности эстераз мозга могут вызывать нарушения функций центральной нервной системы.

REFERENCES

1. Arthur B. W., Casida J. E.: Metabolism and selectivity of 0,0-dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate and its acetyl and vinyl derivatives. *J. Agr. Food Chem.*, 1957, 5, 186—191.
2. Arthur B. W., Casida J. E.: Biological activity of several O,O-dialkyl 1-acyloxyethyl phosphonates. *J. Agr. Food Chem.*, 1958, 6, 360—365.
3. Barzu T., Cuparencu B., Hantz A.: Action of organophosphorus compounds on cell organelles. I. Effect of tetraethyl dithiopyrophosphate on lysosomal hydrolases. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 185—194.
4. Biczowa B., Sikorska M., Bicz W., Pachecka J., Suliński A.: Poziom glikogenu, glikoliza, oddychanie oraz stężenia ATP, ADP i AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 259—272.
5. Bull D. L., Ridgway R. L.: Metabolism of trichlorophen in animals and plants. *J. Agr. Food Chem.*, 1969, 17, 837—841.
6. Casida J. E., Mc Bridge L., Niedermeier R. P.: Metabolism of 2,2-dichlorovinyl dimethyl phosphate in relation to residues in milk and mammalian tissues. *J. Agr. Food Chem.*, 1962, 10, 370—377.

7. Cohen S. R.: Phosphatases. In Handbook of Neurochemistry, Lajtha A. (ed), Plenum Press, N. Y. and London 1970, 3, 87—132.
8. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr, Featherstone A. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88—95.
9. Hassan A., Zayed S. M. A. D., Abdel-Hamid F. M.: Metabolism of organophosphorus insecticides. II. Metabolism of 0,0-dimethyl-2, 2, 2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate (Dipterex) in mammalian nervous tissue and kinetics involved in its reaction with acetylcholinesterase. *Can. J. Biochem.*, 1965, 43, 1263—1269.
10. Hodgson E., Casida J. E.: Mammalian enzymes involved in the degradation of 2,2-dichlorovinyl-dimethyl phosphate. *J. Agr. Food Chem.*, 1962, 10, 208—214.
11. Linhard K., Walter K.: Phosphatasen. In Methoden der enzymatischen Analyse .Bergmeyer H. U. (ed), V-g Chemie, Weinheim 1962, 779—785.
12. Metcalf R. L., Fukuto T. R., March R. B.: Toxic action of Dipterex and DDVP to the house fly. *J. Econ. Entomol.*, 1959, 52, 44—49.
13. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach in vitro. *Roczn. PZH*, 1975, 26, 347—356.
14. Piekarski L., Fitak B., Karliński S., Sawicki J.: Toksyczność fosfonianu 0,0-dwumetylo-2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylowego (Dipterexu) dla komórek zwierzęcych w hodowli. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1971, 4, 307—314.
15. Potter J. C., Loeffler J. E., Collins R. D., Young R., Page A. C.: Carbon -14 balance and residues of dichlorvos and its metabolites in pigs dosed with dichlorvos-¹⁴C. *J. Agr. Food Chem.*, 1973, 21, 163—166.
16. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Chojnacka-Baldys K., Czerska-Trzcińska A.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura i kury. *Roczn. PZH*, 1975, in press.
17. Suliński A., Pachecka J., Ziółkowska G.: Aktywność wybranych esteraz surowicy krwi szczura w następstwie zatrucia organizmu insektycydami fosforoorganicznymi Dichlorvosem i Trichlorfonem. In prep.
18. Syrowatka T.: Wpływ niektórych insektycydów fosforoorganicznych na fosforylację oksydacyjną i regulację oddychania mitochondriów wątroby szczura. *Roczn. PZH*, 1969, 20, 557—562.
19. Tomaszewski L.: Mikrometody biochemiczne w laboratorium klinicznym. PZWL, Warszawa 1970, 127—131.

Author's address: Laboratory of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, 02-097 Warszawa, Banacha 1 Str., Poland.

DARIUSZ SITKIEWICZ, ZOFIA ZALEWSKA

EFFECT OF ORGANOPHOSPHATE INSECTICIDES ON SOME
OXIDOREDUCTASES IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA*)

Laboratory of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy Medical Academy in Warsaw
Head of the Laboratory: Doc. W. Bicz, M. D.

The results obtained in our (Sitkiewicz, Zalewska, 1975; Sitkiewicz et al., 1975; Pachecka et al., 1975) and other laboratories indicate that organophosphate insecticides, apart from inhibiting acetylcholine esterase activity, cause disturbances of other metabolic processes (Heidker, Pardini, 1972; Piekarski et al., 1971; Syrowatka, 1969). It seems that these insecticides are capable of binding the lipid components of mitochondrial membranes and, consequently, may alter mitochondrial functions.

In this work, cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activities were examined in rat brain mitochondria in different experimental models of intoxication with Dipterex (Trichlorphon-0,0-Dimethyl-1-hydroxy-2, 2, 2-trichloroethyl/phosphonate) or Dichlorvos (DDVP-0,0-Dimethyl-0-/2,2-dichlorovinyl/phosphate). In addition the effect of these insecticides on the activities of both mitochondrial enzymes *in vitro* was studied. In experiments *in vivo* insecticides were given to male Albino Wistar rats per os in 2, 10 and 50% LD₅₀ doses. The cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activities were determined after single or repeated intoxications (14 days with all doses of insecticides and 90 days with 2% LD₅₀ only). The activities of both enzymes were determined in rat brain mitochondria after solubilization by sodium deoxycholate. The fraction of rat brain mitochondria was prepared in a discontinuous Ficoll density gradient (Clark, Nicklas, 1970). Cytochrome oxidase activity was estimated by following ferrocytochrome c oxidation (Smith, 1954). Succinate dehydrogenase activity was measured spectrophotometrically (King, 1963).

RESULTS AND DISCUSSION

Figs. 1 and 2 showed the activities of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase in rat brain mitochondria following Dipterex or Dichlorvos intoxication.

Single intoxication with Dipterex in 2, 10 and 50% LD₅₀ doses produced no changes in the activity of cytochrome oxidase of the rat brain mitochondrial fraction.

*) This work was supported by a grant from the Polish Academy of Sciences (Research Programme No 09. 4. 1. 3.)

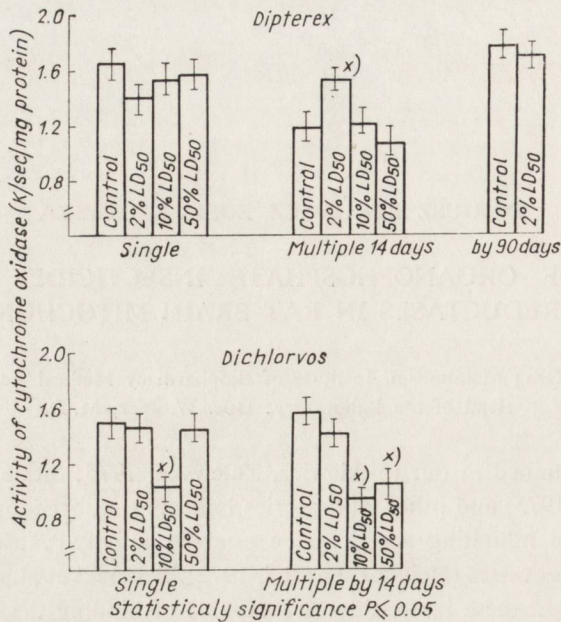


Fig. 1. Activity of cytochrome oxidase in rat brain mitochondria following Dipterex or Dichlorvos intoxication. Levels shown are mean values \pm standard error of the mean for 5—8 animals.
Ryc. 1. Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu szczura po zatruciu dipterexem lub dichlorfosem. Przedstawione wartości są średnią arytmetyczną \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 5—8 szczurów.

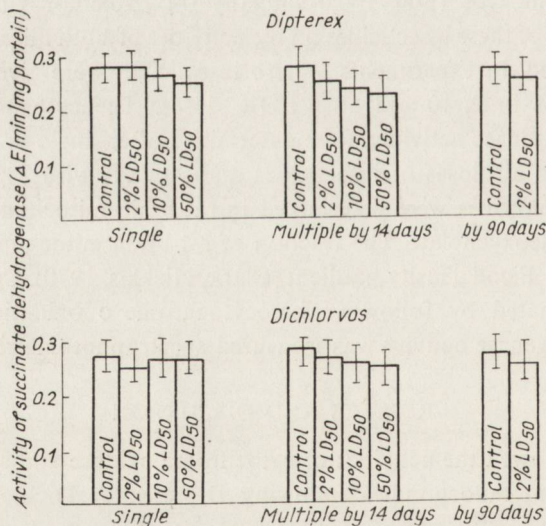


Fig. 2. Activity of succinic dehydrogenase in rat brain mitochondria following Dipterex or Dichlorvos intoxication. Levels shown are mean values \pm standard error of the mean for 5—8 animals.
Ryc. 2. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w mitochondriach mózgu szczura po zatruciu dipterexem lub dichlorfosem. Przedstawione wyniki są średnią arytmetyczną \pm średnie odchylenie od średniej wyników dla 5—8 szczurów.

Following multiple intoxication by this insecticide in 2% LD₅₀ doses for 14 days an increase of enzyme activity was noted. The other doses of the insecticide did not exert any effect on cytochrome oxidase activity. Neither did administration of Dipterex during 90 days in small doses (2% of LD₅₀) change the assayed enzyme activity. In contrast to Dipterex, Dichlorvos produced inhibition of cytochrome oxidase activity after both single and multiple administration. In both experiments the highest inhibitory effect was noted with the 10% LD₅₀ dose of the insecticide. After a single administration of Dichlorvos in a 50% LD₅₀ dose cytochrome oxidase activity remained unchanged. However, when this dose of Dichlorvos was repeated for 14 days, a decreased enzyme activity was observed. Intoxication with either of the insecticides did not change the succinate dehydrogenase activity of rat brain mitochondria, either after single or repeated administration.

In the next part of this work the effect of Dipterex or Dichlorvos on cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase activities was examined *in vitro*. The activity of cytochrome oxidase in relation to the time of preincubation of solubilised brain mitochondria in the presence of Dipterex or Dichlorvos and the effects of different concentrations of these insecticides on both mitochondrial enzymes activities are shown in Figs. 3. and 4.

The data presented in Fig. 3 indicate that Dipterex in a concentration of 100 µg/mg protein, inhibits cytochrome oxidase activity only after 15 min of preincubation of solubilised mitochondria with the insecticide. This inhibition persisted for a period from 15 to 45 min. The inhibitory effect of Dipterex was only noted at insecticide concentration of 10 and 100 µg/mg protein. Dichlorvos in all the concentrations used caused stimulation of cytochrome oxidase activity at time 0 (without preincubation). The activity of this enzyme returned to the control level after 15 min preincubation. Both insecticides in concentrations ranging from 0,1 to 100 µg/mg protein did not affect the succinate dehydrogenase activity.

Comparison of the results of *in vivo* and *in vitro* experiments indicates that the decrease of cytochrome oxidase activity following Dichlorvos intoxication is not due to the direct action of the insecticide, but to the influence of its metabolites. The observed absence of correlation between the insecticide dose and the degree of enzyme inhibition, confirms the suggestion of its indirect action. The absence of inhibition of cytochrome oxidase activity after Dipterex intoxication may be caused by restriction of the permeability of mitochondrial membranes.

In order to confirm the above supposition, experiments were carried out in which the insecticides were incubated with untreated mitochondria. After 15 min the mixture was centrifuged at 12.500 x g. Mitochondrial pellets were solubilised and the activity of cytochrome oxidase was determined. Results of those experiments are shown in Table 1.

In these conditions Dipterex remained without effect on the assayed enzyme activity. Inhibition of cytochrome oxidase activity was noted if solubilised mitochondria were incubated with Dipterex. These observations suggest that Dipterex

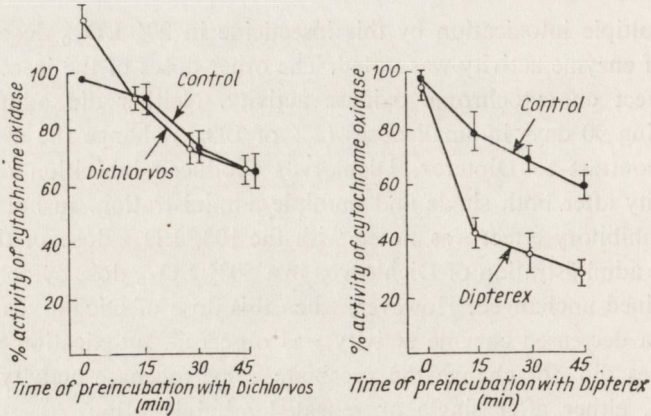


Fig. 3. Cytochrome oxidase activity during preincubation of rat brain mitochondria with Dipterex or Dichlorvos shown as per cent of control activity. Results are mean values \pm standard error of the mean from five experiments.

Ryc. 3. Aktywność oksydazy cytochromowej podczas preinkubacji mitochondriów mózgu szczura z dipterexem lub dichlorfosem przedstawiona jako % aktywności kontrolnej. Wyniki są średnią arytmetyczną z 5 doświadczeń \pm odchylenie od średniej.

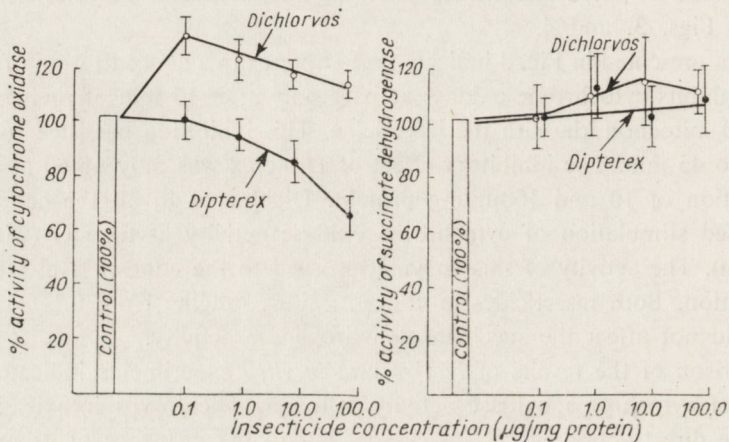


Fig. 4. Effect of Dipterex or Dichlorvos on the cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activities of rat brain mitochondria, shown as per cent of control activity. Results are mean values \pm standard error of the mean from five experiments.

Ryc. 4. Wpływ dipterexu i dichlorfosu na aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mitochondriów mózgu szczura. Wyniki są średnią arytmetyczną z 5 doświadczeń \pm średnie odchylenie od średniej.

does not penetrate into the mitochondria. In contrast, Dichlorvos produced an increase of cytochrome oxidase activity in both untreated and solubilised mitochondria, what suggests that this insecticide may penetrate mitochondrial membranes.

After Dipterex intoxication, a decrease of cytochrome oxidase activity in liver mitochondria was noted (Sitkiewicz, unpublished results), but this did not hold for brain mitochondria. This observation suggested that brain lipids may protect

Table 1. Activity of cytochrome oxidase after incubation whole or solubilised mitochondria with Dipterex or Dichlorvos

Tabela 1. Aktywność oksydazy cytochromowej po inkubacji pełnych i solubilizowanych mitochondriów mózgu szczura z Dipterexem lub Dichlorfosem.

INSECTICIDE (100 µg/mg protein)	Activity of cytochrome oxidase (K/sec/mg protein)					
	Aktywność oksydazy cytochromowej (K/sek/mg białka)					
	solubilised mitochondria mitochondria solubilizowane			whole mitochondria mitochondria pełne		
ISEKTYCYD (100 µg/mg białka)	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	%	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	%
Control Kontrola	1.30±0.07	(4)	100.0	0.96±0.02	(5)	100.0
Dipterex	0.78±0.17	(4)	60.0	1.00±0.06	(5)	104.1
Dichlorvos Dichlorfos	1.51±0.08	(4)	111.1	1.11±0.11	(5)	115.6

$\bar{x} \pm S\bar{x}$ arithmetic mean \pm standard error of the mean
średnia arytmetyczna \pm średnie odchylenie od średniej

(n) number of experiments
liczba doświadczeń

Table 2. Activity of cytochrome oxidase after incubation of solubilised rat brain mitochondria in the presence of Dipterex and lecithin.

Tabela 2. Aktywność oksydazy cytochromowej po inkubacji solubilizowanych mitochondriów mózgu szczura w obecności dipterexu i lecytyny.

Conditions of incubations Warunki inkubacji	Activity of cytochrome oxidase (K/sec/mg protein)					
	Aktywność oksydazy cytochromowej (K/sek/mg białka)					
	Control without insecticide Kontrola bez insektycydu			Dipterex (100µg/mg protein) (100µg/mg białka)		
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	%	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	(n)	%
Solubilised mitochondria Solubilizowane mitochondria	1.23±0.07	(4)	100.0	0.89±0.03	(4)	72.3
Solubilised mitochondria with lecithin Solubilizowane mitochondria z lecytyną	1.48±0.06	(4)	100.0	1.59±0.07	(4)	107.4

$\bar{x} \pm S\bar{x}$ arithmetic mean \pm standard error of the mean
średnia arytmetyczna \pm średnie odchylenie od średniej

(n) number of experiments
liczba doświadczeń

cytochrome oxidase against the action of Dipterex and prompted the authors to study the effect of this insecticide on cytochrome oxidase activity in the presence of lecithin *in vitro*.

The data shown in Table 2 indicate that the incubation of solubilised mitochondria with Dipterex caused inhibition of cytochrome oxidase by about 30%. Addition of lecithin (5 mg/ml) to the incubation mixture abolishes the inhibitory effect of this insecticide on cytochrome oxidase. These results seem to suggest that phospholipids of the central nervous system can protect the respiratory enzymes in mitochondria against poisoning by organophosphate insecticides.

The authors acknowledge the help of Miss Irena Rakowska and Miss Anna Kielducka, students of the Faculty of Pharmacy, Medical Academy in Warsaw in some experiments. We also thank Mrs. Barbara Dyjak for skillful technical assistance.

D. Sitkiewicz, Z. Zalewska

DZIAŁANIE FOSFOROORGANICZNYCH INSEKTYCYDÓW NA AKTYWNOŚĆ NIEKTÓRYCH OKSYDOREDUKTAZ W MITOCHONDRIACH MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Przebadano aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mitochondriach mózgu szczura w różnym czasie po zatruciu Dipterexem (trichlorfon) i Dichlorfossem (DDVP) oraz wpływ Dipterexu i Dichlorfosu na aktywność obu tych enzymów *in vitro*. Zatrucie Dipterexem nie powodowało zmian aktywności oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej w mitochondriach mózgu szczurów. Obniżenie aktywności oksydazy cytochromowej stwierdzono w następstwie jednorazowego i wielokrotnego podawania wysokich dawek Dichlorfosu. Zatrucie tym insektycydem nie powodowało zmian aktywności dehydrogenazy bursztynianowej. W doświadczeniach *in vitro* stwierdzono hamujący wpływ Dipterexu na aktywność oksydazy cytochromowej po preinkubacji solubilizowanej frakcji mitochondrialnej mózgu. W przypadku inkubacji nienaruszonych mitochondriów z Dipterexem nie obserwowano zmian w aktywności tego enzymu. Hamujący wpływ Dipterexu był znoszony przez lecytynę. Dichlorfos powodował stymulację aktywności oksydazy cytochromowej zarówno we frakcji solubilizowanej jak i w nienaruszonych mitochondriach. W warunkach *in vitro* oba insektycydy nie miały wpływu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej mitochondriów mózgu szczura.

Uzyskane wyniki mogą świadczyć o pośrednim działaniu Dichlorfosu *in vivo*, poprzez bardziej toksyczne metabolity. Wydaje się, że selektywna przepuszczalność błon mitochondrialnych dla insektycydów oraz wysoka zawartość fosfolipidów w mózgu mogą działać ochronnie na enzymy łańcucha oddechowego w zatruciach insektycydami fosforoorganicznymi.

Д. Ситкевич, З. Залевска

АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ И СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФООРГАНИЧЕСКИМИ ИНСЕКТИЦИДАМИ

Резюме

Была исследована активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях мозга крысы в различное время после отравления Диптерексом (трихлорфон) и Дихлорфосом (ДДВФ), а также влияние Диптерекса и Дихлорфоса на активность этих энзимов.

Отравление Диптерексом не вызывало изменений цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях мозга крыс. Снижение активности цитохромоксидазы было отмечено после однократной и многократной подачи больших доз Дихлорфоса, в то же время изменения в активности сукцинатдегидрогеназы не были отмечены. В опытах *in vitro* было обнаружено тормозящее влияние Диптерекса на активность цитохромоксидазы после преинкубации солюбилизированной митохондриальной фракции. При инкубации интактных митохондрий с Диптерексом не было отмечено изменений в активности этого фермента. Тормозящее влияние Диптерекса снималось лецитином. Дихлорфос как во фракции солюбилизованных, так и интактных митохондрий вызывал стимуляцию активности цитохромоксидазы. Оба инсектицида в условиях *in vitro* не влияли на активность сукцинатдегидрогеназы митохондрий мозга крыс. Полученные результаты могут свидетельствовать о действии Дихлорфоса *in vivo* посредством более токсических метаболитов. По-видимому, избирательная проницаемость митохондриальных мембран для инсектицидов, а также высокое содержание фосфолипидов в мозге могут выполнять защитную функцию на ферменты дыхательной цепи при отравлениях фосфоорганическими инсектицидами.

REFERENCES

1. Clark J. B., Nicklas W. J.: The Metabolism of Rat Brain Mitochondria Preparation and Characterisation. *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, 4724—4731.
2. Heidker J. C., Pardini R. S.: Inhibition of Mitochondrial Electron Transport by Guthion, Some Related Insecticides and Degradative Products. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1972, 8, 141—146.
3. King T. E.: Reconstruction of Respiratory Chain Enzyme Systems. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 4032—4036.
4. Pachecka J., Biczowa B., Suliński A., Bicz W.: Wpływ fosforoorganicznych środków owadobójczych na oddychanie i glikolizę ośrodkowego układu nerwowego szczura i kury w badaniach *in vitro*. *Roczn. PZH*, 1975, 26, 347—356.
5. Piekarski L., Fitak B., Karliński S., Sawicki J.: Toksyczność fosfonianu 0,0-dwumetylo-2,2,2-trójchloro-1-hydroksy etylowego (Dipterexu) dla komórek zwierzęcych w hodowli. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1971, 4, 307—314.
6. Sitkiewicz D., Zalewska Z.: Aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura w następstwie zatrucia fosforoorganicznymi insektycydami dichlorfosem i trichlorfonem. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 273—281.
7. Sitkiewicz D., Konecka A. M., Chojnacka-Baldys K., Czerska-Trzczińska A.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych na aktywność oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy bursztynianowej mózgu szczura i kury. *Roczn. PZH*, 1975 *in press*.
8. Smith L.: A Study of Some Oxidative Enzymes of Bakers Yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 50, 285—298.
9. Syrowatka T.: Wpływ niektórych insektycydów fosforoorganicznych na fosforylację oksydacyjną i regulację oddychania mitochondriów wątroby szczura. *Roczn. PZH*, 1969, 20, 557—562.

Authors' address: Laboratory of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 02-097 Warszawa, Banacha 1.

MIKOŁAJ ŚLIŻEWSKI

INFLUENCE OF CHRONIC ADMINISTRATION OF PHENYLMERCURIC ACETATE ON THE PERIPHERAL NERVE SYSTEM OF RAT

Department of Neurology and Morphological Laboratory Institute of Nervous and Sensory Organs Diseases

Medical Academy, Białystok, Poland

Head of the Department: Ass. Prof. E. Jankowicz, M. D.

Head of the Laboratory: Ass. Prof. St. Chodynicky, M. D.

Fungicides i.e. compounds with fungicidal and fungistatic properties, belong to a large group of pesticides widely produced and used the world over. Among them are organic mercury compounds which are particularly effective. A commonly used fungicide for grain treatment before sowing is the Seed Dressing R which contains phenylmercuric acetate as an active agent. The mechanism of toxic action of the majority of pesticides has not been explained as yet (Rusiecki 1966). Most probably it consists in blocking of oxidation and phosphorylation processes in the nervous tissue (Drogiczina 1968, Makowskaja 1967). Yoshino et al. (1966) found serious impairment of protein synthesis during intoxication with organic mercury compounds.

Professional exposure to intoxication concerns people employed in production, transport and utilization of pesticides in agriculture and other domains. People having accidental contact with pesticides or eating products containing the substance may be also intoxicated. The alimentary tract, respiratory system and skin are the pathways through which organomercury compounds most often penetrate into the organism and evoke intoxication resulting in impairment of various tissues. The nervous system is specially exposed to the toxic action of organic mercury compounds and, particularly, to its short-chain homologues such as methylmercury and phenylmercury. Probably these compounds pass easier through the blood-brain barrier (Rustam, Hamdi 1974).

Clinical symptoms of intoxication with organic mercury compounds have been described as early as 1885 and 1886 by Edwards. Numerous intoxications were observed in 1953—1960 in Minamata Bay (called then Minamata disease) and in 1960—1965 in Niigate in Japan after consumption of fish and crustaceans contaminated with organomercury compounds (Rustam, Hamdi 1974). Numerous intoxications were also observed in Pakistan (Ul Hag 1969), Guatemala (Ordóñez et al. 1966) and

Iraq (Bakir et al. 1973) after consumption of bread from grain treated with fungicides. In Iraq 6530 patients were hospitalized of which 459 died.

The clinical picture of intoxication with organic mercury compounds varies and may present the following features: cerebellar disorders, cortical blindness, disseminated brain lesions of encephalopathic type, sensory superficial and deep disorders, speech disturbances (aphasia, dysarthria), lesion (paresis) of cranial nerves, mental disorders (depression, euphoria, dementia), lesions of pyramidal tracts, disorders of extrapyramidal system (involuntary movements, tremor), disorders of the autonomic system (Rustam, Hamdi 1974), impairment of peripheral nerves (motor and sensory disorders) (Miyakawa et al. 1970, Takeuchi et al. 1962).

Pathomorphological changes of the central nervous system are well known (Ito 1957, Morikawa 1961, Shiraishi et al. 1959, Takeuchi et al. 1962) but reports concerning pathomorphological changes in peripheral nerves are rare.

The purpose of this work was therefore to investigate electrophysiological and pathomorphological changes in peripheral nervous system after chronic administration of phenylmercuric acetate.

MATERIAL AND METHODS

The Seed Dressing R (Zakłady Chemiczne „Azot”, Poland) was used. The preparation contained 2.4% of phenylmercuric acetate as the active agent.

The experiments were carried out on 70 male Wistar rats weighing 190—220 g. The control group included 15 rats. All animals received intragastrically 1 ml of 0.3% solution of phenylmercuric acetate (1/4 LD₅₀ — 15 mg/kg) every day through a probe connected with a syringe. The behaviour of the animals was recorded every 7 days and motor nerve conduction velocity of the sciatic nerve was examined. Besides, the sciatic nerve was examined histologically after decapitation of 2—3 animals.

Determination of motor nerve conduction velocity was carried out by means of the electromyographic method according to Hodes et al. (1948) in the author's own modification. Calculations were performed according to the following formula:

$$V = \frac{L \times 1000}{t}$$

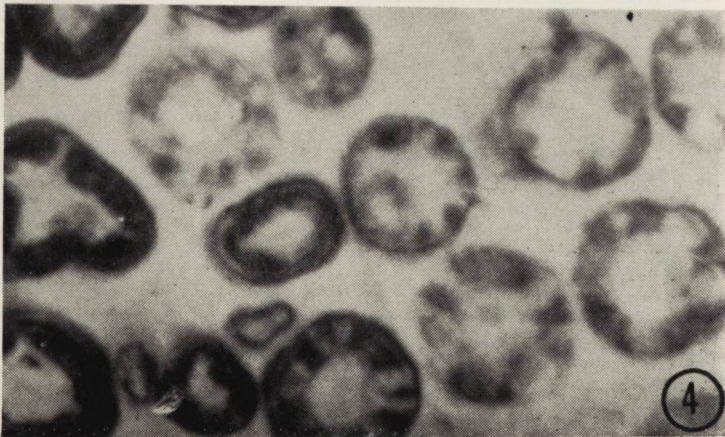
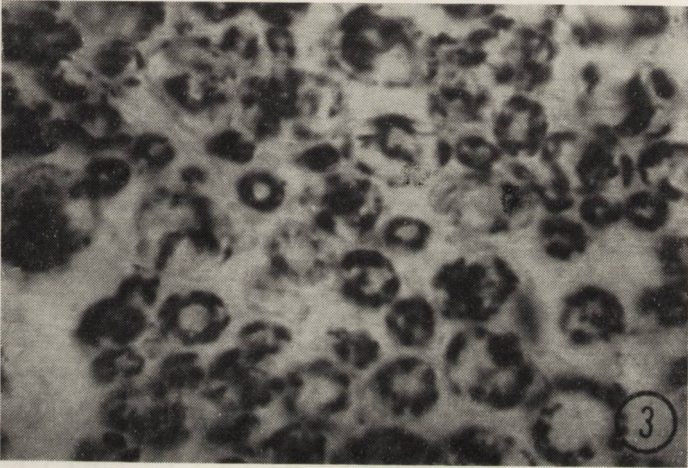
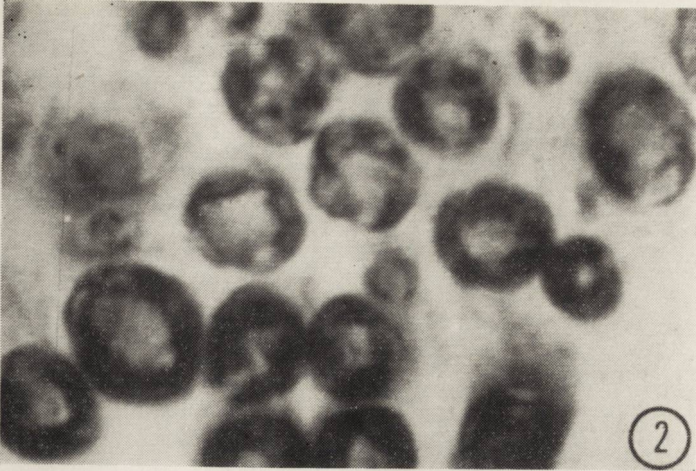
Fig. 2. Nonuniform staining of myelin sheaths, nerve fibres of different diameter. Osm. $\times 1740$
Ryc. 2. Niejednakowe zabarwienie osłonek mielinowych. Włókna nerwowe o różnej średnicy. Osm. Pow. 1740 \times .

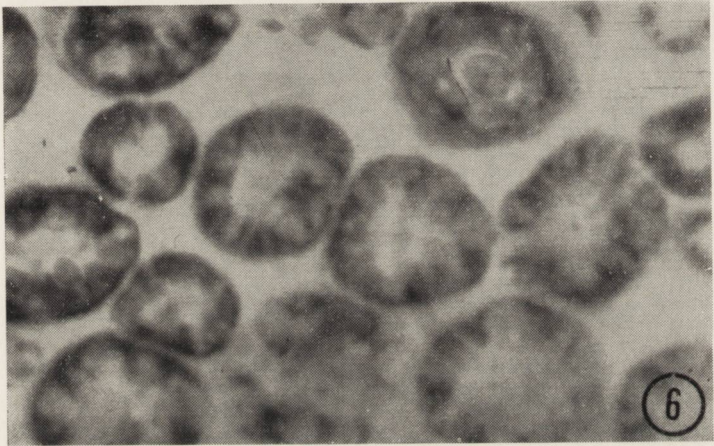
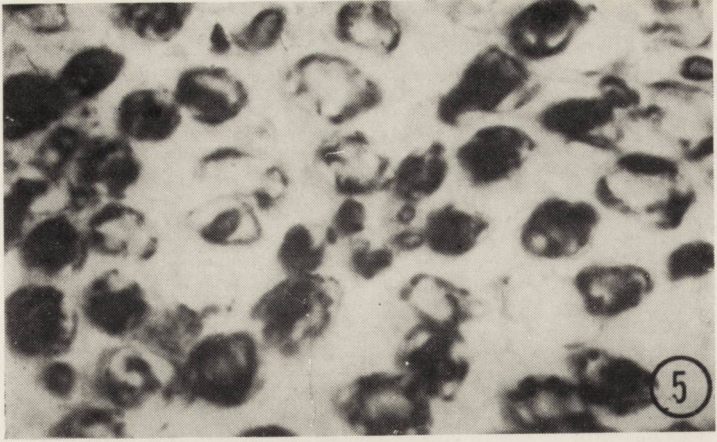
Fig. 3. Nerve fibres of various diameter, granular disintegration of myelin sheaths. Mahon meth. $\times 1020$

Ryc. 3. Włókna nerwowe o różnej średnicy, ziarnisty rozpad osłonek mielinowych. Met. Mahona. Pow. 1020. \times .

Fig. 4. Nerve fibres of different shape and diameter. Nonuniform staining of myelin sheaths, granular disintegration of some fibres. Osm. $\times 1740$

Ryc. 4. Włókna nerwowe mają różny kształt i średnicę, osłonki mielinowe wybarwione nierównomiernie, ziarnisty rozpad niektórych włókien. Osm. Pow. 1740 \times .





where V = motor nerve conduction velocity, L = distance in cm,
 t = time of impulse action in milliseconds.

The response to rectangular, supramaximal stimuli of 0.25 millisecond duration was observed on oscilloscope and recorded on photographic tape at the moment of the highest amplitude.

Histological investigations were based on silver impregnation according to Bielschowsky method, osmium staining according to Marchi or Mahone methods for myelin.

RESULTS

General slowing down of the animals' motility and dull hair were observed on the 7th day of the experiment. The symptoms increased with the time of the experiment. After some time the animals' aggressiveness and fear reactions decreased. After 21 days the hind legs became less active, and after 35 days they showed distinct

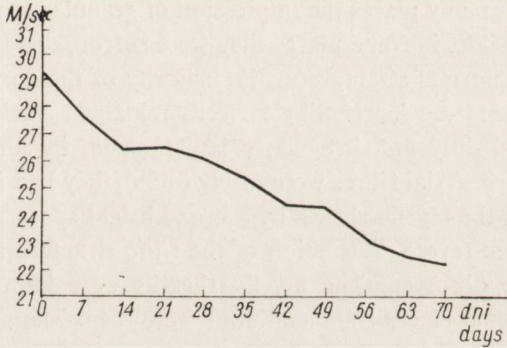


Fig. 1. Decrease of motor nerve conduction velocity in the rat sciatic nerves.

Ryc. 1. Zmniejszenie szybkości przewodzenia ruchowego w nerwach kulszowych szczura

paresis and disturbances of equilibrium. Paresis was most pronounced after 49 days and changed only little until the end of the experiment (70 days). Paresis of the hind legs of varying intensity could be observed on both sides.

Motor nerve conduction velocity of 100 animals of the same race, weight and sex as the experimental ones was measured to establish the author's own standard of sciatic motor nerve conduction velocity. The standard value including conduction in the nerve, junction and muscle amounted to 29.4 m/sec.

Fig. 5. Nonuniform staining of myelin sheaths, obliterated structure of nerve fibres. Mahon meth. $\times 1020$.

Ryc. 5. Nierównomierne wybarwienie mieliny, włókna nerwowe o zatartej budowie. Met. Mahona. Pow. 1020 \times .

Fig. 6. Myelin is faintly stained, gaps are seen in the sheaths. Osm. $\times 1740$

Ryc. 6. Mielina słabo wybarwiona, widoczne przerwy w osłonkach. Osm. Pow. 1740 \times .

Fig. 7. Neurokeratin network of nerve fibres and myelin remnants. Mahon meth. $\times 1020$

Ryc. 7. Siateczka neukokeratynowa włókien nerwowych i resztki mieliny. Met. Mahona. Pow. 1020

Values of motor nerve conduction velocity are presented in Fig. 1. As seen, as early as after 7 days of the phenylmercuric acetate administration a slight slowing down of motor nerve conduction velocity in the sciatic nerves was observed. A more distinct decrease was observed after 28 days, and it was highest after 70 days of the experiment reaching about 24.8%.

Histopathological examinations

Control preparation: the nerve fibres ran parallelly on the longitudinal sections, myelin sheaths were intensively impregnated along the whole length. The diameter of the nerve fibres on cross sections was nearly uniform, axial fibres were well seen.

The microscopic picture of the sciatic nerve after 14 days administration of phenylmercuric acetate showed obliteration of the nerve fibres, outlines nonuniform blackening of the myelin sheaths and appearance of myelin granules. The obliteration was still more distinct, especially in the middle part of the preparation after 21 days. The fibre diameters differed and the myelin sheaths impregnated irregularly. Figs. 1 and 2 gave in many places the impression of granular structures. Axial fibres were only slightly visible, in some places they were surrounded by lighter spaces.

After 35 days the normal structure of the majority of the nerve fibres had disappeared, their diameter was large. Single fibres remained unchanged. The myelin sheaths were only slightly and irregularly impregnated, in some places they had a granular appearance. Axial fibres were rarely found, they had irregular shapes and were separated from the myelin sheath by a broad bright space.

After 42 days more severe destruction of the fibre structure and variation of the fibre diameter were observed. The myelin sheaths were impregnated irregularly, with gaps, and in some places fragmentations were seen. The axial fibres were not clearly seen, they were not numerous and were separated from the myelin sheath by a large, bright space.

After 56 days only a dim outline of the nerve fibres was observed. Most fibres represented bright spaces, delamination of the myelin sheaths became distinct, the bright gaps were radially arranged. In some places the myelin sheaths showed granular structure. The axial fibres were scarce and only slightly visible (Figs. 4 and 5).

After 70 days the nerve fibres had the appearance of what is called neurokeratin net. The myelin sheaths consisted of irregularly impregnated granules and seemed to be broken. Intensity of staining decreased from the periphery to the centre of the nerve. Around the nerve fibres irregular, light spaces were seen. The axial fibres were not visible (Figs. 6 and 7).

DISCUSSION

Chronic intoxication with phenylmercuric acetate was manifested in the clinical picture by slowing down of motility as early as after 7 days and by distinct paresis of the extremities after 35 days of the experiment. Slowing down of the motor nerve

conduction velocity was also observed after 7 days, but its distinct decrease was noted after 28 days, and most advanced after 70 days. Pathomorphological changes in the sciatic nerves were found after 14 days. They concerned the nerve fibres and consisted in decomposition of the myelin sheaths.

According to the literature, the problem of impairment of the peripheral nerves by organic mercury compounds is disputable.

The report of Experts (1971) summing up the accumulated histopathological and electrophysiological information does not confirm the hypothesis of peripheral neuropathy evoked by intoxication with methyl mercury in humans. Other authors (Hunter, Russel 1954, Prick et al. 1967, Takeuchi 1968) carrying out histological examinations did not find changes suggesting lesion of the peripheral nerves. Takeuchi et al. (1962) examining the Minamata disease in Japan found disseminated destruction and atrophy of granular cells in the cerebellum and ganglion cells in the cerebral cortex and subcortical nuclei. They found granular degeneration of myelin and segmental demyelination in the peripheral nerves only in few cases. Experimental studies on animals intoxicated with organic compounds of mercury also showed the same neurological disturbances and morphological changes in the nervous system as did humans (Ito 1957, Morikawa 1961, Shiraishi et al. 1959). Miyakawa et al. (1970) examined in the electron microscope the peripheral nerves of rats intoxicated with organic mercury compounds and after 12—20 days of the experiment they found distinct degenerative changes of the axial fibres and destruction of the myelin sheaths. The changes preceded neurological symptoms. Cavangh (1969) found degenerative changes in the peripheral nerves of rats after 8 days of the intoxication with organic mercury compounds. Makowskaja (1967) also reports destruction of myelin sheaths of peripheral nerves in the course of intoxication with organic mercury. Kantarjian (1961) and Brown (1954) described cases of intoxication with compounds of ethyl and phenyl mercury with clinical picture similar to amyotrophic lateral sclerosis. They suggest that these compounds have a higher affinity to motor neurons.

Our results showing considerable degenerative changes in the sciatic nerves may indicate that phenylmercuric compounds have a higher affinity to the peripheral nervous system than methylmercuric compounds.

CONCLUSIONS

1. Organic compounds of mercury such as phenylmercuric acetate impair the peripheral nerves, especially they evoke atrophy of myelin sheath as early as after 14 days of administration.
2. Slowing down of motor nerve conduction velocity in the sciatic nerves was noted after 7 days of the experiment, marked paresis of the hind legs was observed after 35 days of the experiment.

3. Slowing down motor nerve conduction velocity and pathomorphological changes remarkably preceded clinical symptoms of impairment of the peripheral nervous system.

M. Śliżewski

WPLYW PRZEWLEKŁEGO STOSOWANIA FUNGICYDU — OCTANU FENYLORTĘCIOWEGO NA OBWODOWY UKŁAD NERWOWY SZCZURA

Streszczenie

Badano wpływ przewlekłego stosowania fungicydu octanu fenylortęciowego na obwodowy układ nerwowy szczura. Doświadczenia wykonano na 70 szczurach, którym przez 70 dni podawano dożołądkowo 3 mg octanu fenylortęciowego dziennie. Badano zachowanie się zwierząt, przewodnictwo ruchowe w nerwach kulszowych oraz wykonano badanie histologiczne nerwów wg Marchi i met. Mahona.

Stwierdzono nieznaczne zwolnienie przewodzenia ruchowego już po 7 dniach, rozpad osłonek mielinowych po 14 dniach, a pojawienie się wyraźnych niedowładów kończyn tylnych po 35 dniach. Objawy te narastały w miarę trwania doświadczenia.

М. Слижевски

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ФУНГИЦИДА ФЕНИЛРТУТНОГО АЦЕТАТА НА ПЕРИФЕРИЧЕСКУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ КРЫСЫ

Резюме

Было проведено экспериментальное исследование влияния хронического применения фунгицида фенилртутного ацетата на периферическую нервную систему крысы.

Эксперимент был проведен на 70 крысах, которым в течение 70 дней подавалось перорально 3 мг фенилртутного ацетата.

Исследовали поведение животных, двигательную проводимость в седалищных нервах, а также проводили гистологические исследования нервов окрашиванием осмием согласно Марчи и методу Махона.

Было обнаружено незначительное замедление двигательной проводимости уже через 7 дней, распад миелиновых оболочек через 14 дней и появление явных парезов задних конечностей через 35 дней. Эти явления усиливались по мере продолжения эксперимента.

REFERENCES

1. Bakir F., Damluji S. F., Amin-Zaki L., Martadna M., Khalidi A., Al-Rawi N. Y., Tikriti S., Dhahir H. I., Clarkson T. W., Smith J. C. and Doherty R. A.: Methylmercury poisoning in Iraq. An inter-university Report. Science, 1973, 181, 230—241.
2. Brown I. A.: Chronic mercurialism: A cause of the clinical syndrome of amyotrophic lateral sclerosis. Archs. Psych., Chicago, 1954, 72, 674—810.
3. Cavanagh J. B.: Toxic substances and the Nervous system. Brit. Med. Bull. 1969, 3, 268—273.
4. Drohicizina E. N.: Professional diseases of the nervous system. Leningrad 1968.

5. Edwards G. N.: Two cases of poisoning by mercuric methide. *St. Barts'Hosp. Rep.*, 1885, 1, 141—150 — Notes on the termination of the second case of poisoning by mercuric methide. *St. Barts'Hosp. Rep.*, 1886, 2, 211.
6. Expert Group Report: Methyl mercury in fish. A Toxicologic-epidemiologic evaluation of risks. *Nord. hyg. Tidskr.*, 1971, 4, 149—150.
7. Hodes R., Larrabec M. G., Gerum V.: The human electromyogram in response to nerve stimulation and the conduction velocity of motor axons. *Arch. Neurol. Psychiat.*, Chicago, 1948, 60, 340.
8. Hunter D. and Russel S. D.: Focal cerebral and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1954, 17, 235—241.
9. Ito H.: Pathological studies on Minamata disease-experimental production of Minamata disease in the cat. *Kumamoto Igk. Z.* 31, Suppl., 1957, 2, 282.
10. Kantarjian A. D.: A syndrome clinically resembling amyotrophic lateral sclerosis following chronic mercurialism. *Neurology Minneap.*, 1961, 11, 639—644.
11. Makowskaja E. J.: Pathological anomaly of chemical intoxications. Moskwa, 1967, 224.
12. Miyakawa T., Deshimeru N., Sumiyoshi S., Teracka A., Tatetsu S.: Light Electron Microscopic Studies on Peripheral Nerve of Experimentally Induced Poisoning Due to Organic Mercury Compound. Reprinted from *Clinical Neurology*, 1970, 6, 271—280.
13. Morikawa N.: Pathological studies in organic mercury poisoning. *Kumamoto Med.*, J. 1961, 14, 71.
14. Ordóñez J. V., Carrillo J. A., Miranda M. and Gale L. J.: Estudio epidemiológico de una enfermedad considerada como ancefalitis en la region de Los Altos de Guatemala. *Boln. Of. sanit. pan-am.*, 1966, 60, 510—519.
15. Prick J. J. G., Sonnen A. E. H. and Slooff J. L.: Organic mercury poisoning II. *Proc. K. ned. Akad. wet. Sect. C.*, 1967, 70, 170—186.
16. Rusiecki W.: Toxicology of the plant protecting substances. Warszawa, 1966.
17. Rustam H. and Hamdi T.: Methyl Poisoning in Iraq a Neurological study. *Brain a J. of Neurol.*, 1974, 499—510.
18. Shiraishi Y. et al: On the pathological findings of cats and rats fed with shellfish from the Minamata bay. *Kumamoto Igk. Z.* 33, Suppl., 1959, 3, 642.
19. Takeuchi T., Morikawa N., Matsumoto H. and Shiraishi A.: Pathological Study of Minamata Disease in Japan. *Ac. Neuropath.* vol. II, fasc. 1, 1962.
20. Takeuchi T.: Pathology of Minamata Disease. In: *Minamata Disease Study Group of Minamata Disease*. Edited by M. Kutauma. Kumamoto University Press., 1968, 141—228.
21. Ul Hag I.: Agrosan poisoning in man. *Br. med. J.*, 1969, 1, 1571—1582.
22. Yoshimo Y., Mozai T., Nakao K.: *J. Neurochem.*, 1966, 13, 397.

Author's address: Klinika Neurologiczna, AM. 15—097 Białystok, ul. M. Curie-Skłodowskiej 24a.

E. SOSIŃSKI

MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT BRAIN AND SKELETAL MUSCLE IN THE REGION OF NICKEL OXIDE IMPLANTATION

Autonomous Division of Pathology of the Central Nervous System and Sensory Organs, Medical
Academy, Poznań

Head: Doc. Dr. M. Kozik

Various nickel compounds have been demonstrated by many authors to be capable of inducing tumours. While implanted into the paranasal sinuses, the lungs, subcutaneously or intramuscularly they caused development of rhabdomyosarcoma, fibrosarcoma, adenocarcinoma and less often reticulum cell sarcoma (Sunderman et al. 1965, Kasprzak et al. 1972). The highest per cent of tumours (89%) was observed after intramuscular administration of nickel sulphide (Ni_3S_2). Rats have been most commonly used as experimental animals. Fischer and Bethesda-Black strains are considered to exhibit the highest sensitivity, while Wistar rats are more resistant. The average period of latency of tumours was 150—260 days (Basur et al. 1967, Daniel 1967, Kasprzak et al. 1972).

In the available literature we find no papers concerning the reaction of the nervous tissue to nickel compounds. We resolved, therefore, to investigate the reaction of this tissue to nickel oxide (Ni_2O_3) administered intracerebrally.

MATERIAL AND METHODS

In our experiments 10 white Wistar rats of both sexes weighing 150—170 g were used. Refined, powdered nickel oxide (Ni_2O_3), 3 mg per dose was administered subcortically into right frontal area. Powdered nickel oxide (10 mg) was implanted also intramuscularly into the left gastrocnemius muscle of every rat.

After 5, 6, 12, 14, 16, 21 and 22 months of observation animals were sacrificed. Whole brain and muscle sections were removed and fixed in 10% formalin and then embedded in paraffin. Sections of 8 μ were stained by the hematoxylin-eosin, Nissl, Kanzler, and van-Gieson techniques.

RESULTS

Macroscopic findings. Only one brain after 21 months of observation revealed in the administration area gelatinous well separated tissue, 7 mm in diameter.

Microscopic findings. After 5 and 6 months of observation implanted nickel oxide was found in the subcortical white matter and partially in the cortex. The nickel compound granules were surrounded and separated by fine bundles of well vascularized connective tissue. Some phagocytic cells loaded with ingested granules of nickel oxide were visible on the periphery of the focus and around the vessels (Fig. 1).

After 12 months implanted nickel was visible in the white matter and cortex enclosed and separated by bundles of poorly vascularized connective tissue with few phagocytic cells (Fig. 2).

In the 14th month we found in the nucleus caudatus focus of nickel granules surrounded by tightly packed minute neoplastic cells. Diversity, scanty eosinophilic cytoplasm, oval or elongated, darkly stained nuclei were the characteristic features of these cells. Quite often multinucleated neoplastic cells were observed. This type of neoplastic growth was classified as sarcoma (Fig. 3). After 21 months of observation in two brains two histologically different types of neoplastic growth were noted around the implanted nickel compound. The histological picture of the first brain, was similar to the picture described previously. The area of cell proliferation consisted of two parts (Fig. 4). The central part contained numerous minute aggregates of nickel oxide granules, varying in diameter, separated by loose network of neoplastic cells in abundant mucilaginous ground. The boundaries of the focus consisted of abundant mucilaginous tissue and loosely packed minute, poorly differentiated elongated and star-like cells. These neoplastic cells were eosinophilic with scanty cytoplasm and a hyperchromatic elongated nucleus, in many areas tandem-

Fig. 1. Rat with 6 months of survival time. Phagocytic cells loaded by ingested granules of nickel oxide at the periphery of the focus and around blood vessels. H.-E. $\times 175$

Ryc. 1. Szczur z 6-miesięcznym czasem przeżycia. Komórki żerne obladowane ziarnami tlenku niklu widoczne na brzegu ogniska i wokół naczyń. H.-E. Pow. 175 \times .

Fig. 2. Rat with 12 months of survival time. Cerebral cortex. Implanted nickel oxide surrounded by fine bundles of connective tissue. H.-E. $\times 175$.

Ryc. 2. Szczur z 12-miesięcznym przeżyciem. Kora mózgowa. Wszczepiony tlenek niklu otoczony delikatnymi pasemkami tkanki łącznej. H.-E. Pow. 175 \times .

Fig. 3. Rat with 14 months of survival time. Neoplastic growth of sarcoma type in the brain. In central part minute aggregates of nickel oxide (arrow). H.-E. $\times 175$.

Ryc. 3. Szczur z 14 miesięcznym czasem przeżycia. Rozplem nowotworowy typu mięsaka w mózgu. W części centralnej widoczne drobne ziarna tlenku niklu (strzałka). H.-E. Pow. 175 \times .

Fig. 4. Rat with 21 months of survival time. Central and peripheral part of the tumour. H.-E. $\times 28$.

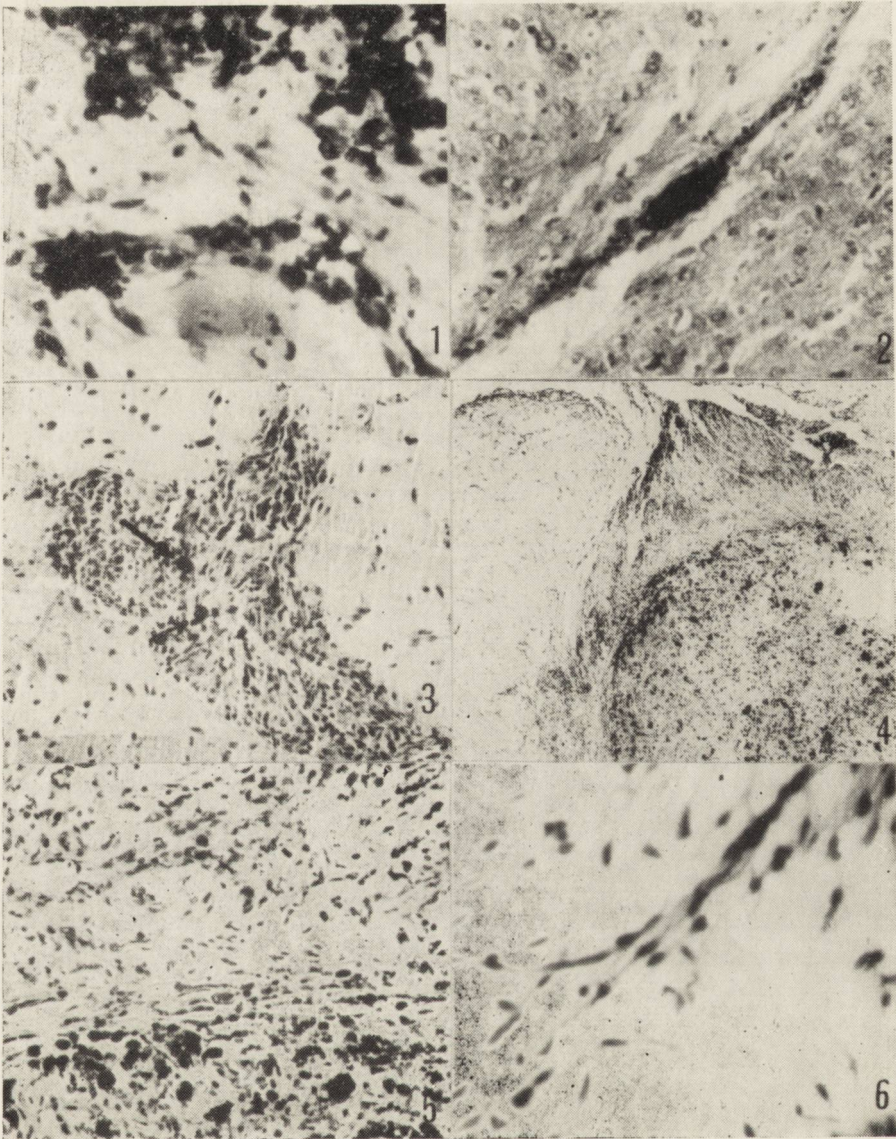
Ryc. 4. Szczur z 21 miesięcznym przeżyciem. Centralna i obwodowa część guza. H.-E. Pow. 28 \times

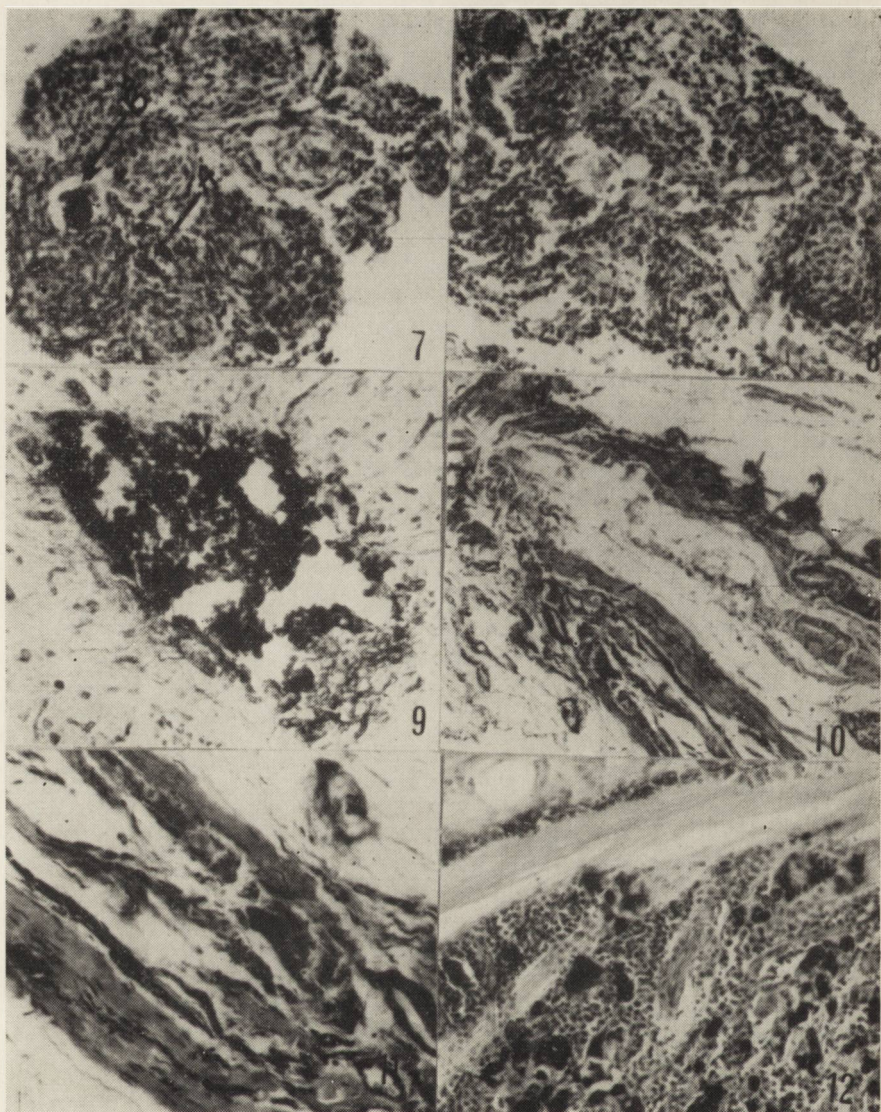
Fig. 5. Fragment of *Fig. 4.* The borderline of central and peripheral part of the tumour. H.-E. $\times 175$.

Ryc. 5. Fragment *Ryc. 4.* Pogranicze centralnej i obwodowej części guza z obfitym śluzowym podścieliskiem. H.-E. Pow. 175 \times .

Fig. 6. Fragment of *Fig. 4.* Peripheral part of the tumour. Elongated neoplastic cells with tandem-like nuclei arrangement. H.-E. $\times 350$

Ryc. 6. Wycinek z *Ryc. 4.* Obwodowa część guza. Wydłużone komórki nowotworowe z tandemowym układem jąder. H.-E. Pow. 350 \times .





-like arranged. The cellularity increased around the central part and at the periphery of the tumour. The tumour tissue was distinctly separated from the neighbourhood by a narrow zone of necrotic cortex and white matter. The whole picture corresponded to a neoplastic growth of sarcoma type (Figs. 5, 6).

The second brain showed in the fissura rhinalis the focal growth of ovoid and elongated cells with abundant cytoplasm forming whorl-like arrangements with scanty framework of connective tissue. In the centre of this focus small deposits of the nickel granules were seen. Additionally in the tumour area we observed small calcifications, some of them of concentric structure. This tumour we classified as meningioma (Figs. 7, 8).

In the last two brains, 22 months after implantation of nickel oxide only small aggregates of nickel granules were present, surrounded by poorly vascularized bundles of connective tissue (Fig. 9).

In the muscles after 5, 6, 12, 14 months of observation the small deposits of nickel granules were separated by thin bundles of connective tissue. Among the few phagocytic cells in the focus predominated giant cells containing the ingested nickel granules. The muscle fibres closely adjacent to the focus revealed symptoms of degeneration and atrophy. Slight regeneration features were present only sporadically in the fibres (Figs. 10, 11).

From 16 months to the end of the experiment a rise in the amount of the phagocytic cells and appearance of the plasma cells were noted. The giant cells were less numerous and present in the central parts of the focus, while the plasma cells and the phagocytic cells were localized on its periphery (Fig. 12). The connective tissue appeared as scanty, thick bundles, readily staining by the van-Gieson technique.

Fig. 7. and 8. Rat with 21 months of survival. Neoplastic growth of meningioma type with small aggregates of nickel oxide (arrow A) and small calcifications (arrow B). H.-E. \times 175.

Ryc. 7 i 8. Szczur z 21-miesięcznym czasem przeżycia. Rozplam nowotworowy o typie oponiaka z drobnymi skupieniami ziaren niklu (strzałka A) i drobnymi zwapnieniami (strzałka B). H.-E. Pow. 175 \times .

Fig. 9. Rat with 22 months of survival. Lack of glial reaction around implanted nickel oxide. Kanzler-Arendt. \times 175.

Ryc. 9. Szczur z 22 miesięcznym przeżyciem. Brak odczynu glejowego w otoczeniu wszczepionego tlenku niklu. Kanler-Arendt. Pow. 175 \times .

Fig. 10. Rat with 6 months of survival. Degeneration, atrophy and feature of regeneration of muscle in the surrounding of implanted nickel oxide. H.-E. \times 70.

Ryc. 10. Szczur z 6-miesięcznym przeżyciem. Objawy zwyrodnienia, zanik i słabo wyrażona odnowa włókien mięśniowych w otoczeniu wprowadzonego tlenku niklu. H.-E. Pow. 70 \times .

Fig. 11. Fragment of Fig. 10. \times 175.

Ryc. 11. Fragment Ryc. 10. Pow. 175 \times .

Fig. 12. Rat with 22 months of survival. Muscle; increase of macrophages and appearance of plasma cells at the periphery. Van Gieson. \times 175.

Ryc. 12. Szczur z 22-miesięcznym przeżyciem. Mięsień. Wzrost ilości komórek żernych i pojawienie się komórek plazmatycznych na obwodzie. Van Gieson. Pow. 175 \times .

DISCUSSION

In the presented investigations we attempted to gain an insight into the neuroectodermal and mesenchymal tissue reaction to implanted nickel oxide. In the brain two stages of changes were observed. The first, early stage — up to 12 months of duration of the experiment, was considered as a period of neoplasm latency. In this period we found in microscopic picture only fine connective tissue bundles and a small number of phagocytic cells and their giant forms. In the second stage after 14 months there was microscopic evidence of significant neoplastic growth around the small remainder of nickel oxide. The two tumours with similar structure, classified as sarcoma indicate that the origin of this growth might be from the connective tissue or the vascular wall elements. The development of a meningioma containing a slight residue of nickel granules in the centre may be due, presumably, to the cancerogenic effect of this compound on the meningoendothelial cells. The glial cells, on the other hand, showed no reaction, either in the white matter or in cortex.

In contrast to the cases described above, in the brains which did not seem to show any neoplastic growth only the features of aging of the connective tissue around the implanted nickel oxide were observed.

The absence of neoplastic growth in microscopic picture of the skeletal muscles should be stressed. In the dynamics of the evoked alterations in the muscles two stages could be distinguished. At the beginning up to 14 months the reaction of the muscle tissue appeared similar to the slight response to a foreign body. After 14 months of observation the number of phagocytes increased significantly and plasma cells appeared. These evidence seem to support the hypothesis of the progressive muscle tissue reaction on the nickel oxide, though there was no significant increase of the giant cells number and the connective tissue growth was not intensified. A higher resistance of the muscle tissue in Wistar rats, emphasized in the literature, probably occurred here (Basrur et al. 1967, Daniel 1967, Kasprzak et al. 1972).

Besides nickel oxide used as a cancerogen seems to have a much longer period of latency.

CONCLUSIONS

1. Intracerebrally administered nickel oxide is capable of inducing the neoplastic growth in the central nervous system.
2. The histological features seem to conform to the sarcoma or meningioma type.
3. The developed brain tumours originate presumably from connective tissue and meningoendothelial cells.
4. There was no reaction of the glial tissue to implanted nickel oxide.
5. In the skeletal muscle a gradually increasing reaction of connective tissue, phagocytic and plasma cells was noted.

E. Sosiński

ZMIANY W MÓZGU I MIĘŚNIACH SZCZURA W NASTĘPSTWIE WSZCZEPIENIA
TLENKU NIKLU (Ni_2O_3)

Streszczenie

Tlenek niklu (Ni_2O_3) w postaci pyłu wprowadzано dorosłym szczurom rasy Wistar domózwgowo (3 mg) i domięśniowo (10 mg). Do badań pobierano mózgowie i wycinek mięśnia po 5, 6, 12, 14, 16, 21 i 22 miesiącach obserwacji.

Mikroskopowo stwierdzono w otoczeniu wszczepionego domózwgowo tlenku niklu 3 nowotwory: 2 o typie mięsaka po 14 i 21 miesiącach, a jeden o typie oponiaka po 21 miesiącach obserwacji. Zwracał uwagę słaby odczyn tkanki łącznej i zupełny brak odczynu ze strony tkanki glejowej. W mięśniach, w miejscu wprowadzenia tlenku niklu stwierdzono od 16 miesiąca wzrost ilości komórek żernych i pojawienie się komórek plazmatycznych przy słabym rozplemie tkanki łącznej.

E. Сосиньски

ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ И МЫШЦАХ КРЫС
В РЕЗУЛЬТАТЕ ИМПЛАНТАЦИИ ОКИСИ НИКЕЛЯ (Ni_2O_3)

Резюме

Окись никеля (Ni_2O_3) в виде тонкого порошка вводили интерцеребрально (3 мг) и внутримышечно (10 мг) взрослым крысам линии Вистая. Для исследований брали мозг и кусочек мышцы через 5, 6, 12, 14, 16, 21 и 22 месяца наблюдения.

Вблизи имплантированной окиси никеля было обнаружено микроскопически 3 опухоли: две из них, типа саркомы, через 14 и 21 месяц, а третья, типа менингиомы, через 21 месяц от начала эксперимента. Обращала внимание слабая реакция соединительной ткани и полное отсутствие реакции глияльной ткани.

В мышцах в месте введения окиси никеля было отмечено увеличение числа макрофагов и появление плазмоцитов при слабой гиперплазии элементов соединительной ткани.

REFERENCES

1. Basrur P. K., Gilman J. P.: Morphologic and synthetic response of normal and tumor muscle cultures to nickel sulphide. *Cancer Res.*, 1967, 27, 1168—1177.
2. Daniel M.: Strain differences in the response of rats to the injections of nickel sulphide. *Brit. J. Cancer* 1967, 20, 886—895.
3. Kasprzak K. S., Marchow L.: Rakotwórcze działanie siarczku niklu — Ni_3S_2 . *Pat. Pol.*, 1972, 23, 135—142.
4. Sunderman F. W., Donnelly A. J.: Studies of nickel carcinogenesis: Metastazing pulmonary tumors in rats induced by the inhalation of nickel carbonyl. *Am. J. Path.*, 1965, 46, 1027—1041.

Author's address: Samodzielna Pracownia Patologii Chorób Układu nerwowego i Narządów Zmysłów AM, 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

I. PECHÁŇ, J. ŠIMEKOVÁ, L. HALČÁK

PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY OF NERVOUS TISSUE IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS

Department of Biochemistry, Medical Faculty of the Comenius Univeristy, Bratislava,
Czechoslovakia

Head: Doc. Dr. J. Križko, CSc

In our previous experiments we have found a marked increase of the activity of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase (CNPase) (EC 3.1.4.d) in the cerebral cortex and spinal cord of guinea pigs very early after their sensibilization with whole central nervous tissue homogenate in complete Freund's adjuvant (Pecháň, Šimeková 1972). It is possible that the increase of this enzyme activity could be either a manifestation of the generalized effect of the studied pathological process on the metabolism of ribonucleic acids, their presursors and/or products of their degradation, or a specific metabolic alteration of glia cells or myelin structures during the development of experimental allergic encephalomyelitis (EAE).

Therefore, the activities of some other phosphodiesterases have been studied, namely these of acid and alkaline ribonuclease and nonspecific phosphodiesterase in the cerebral cortex and spinal cord of guinea pigs sensibilized either with purified homologous basic encephalitogenic protein isolated from guinea pig brain or with whole central nervous tissue, both in complete Freund's adjuvant.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were performed on guinea pigs (400—500 g) fed a mixed diet with vitamin C added.

In the first group of experimental animals EAE was evoked by intracutaneous administration of a mixture containing homologous freeze dried brain (1.0 mg) and spinal cord (1.5 mg) in complete Freund's adjuvant (Difco) (0.1 ml).

The second group of animals was intracutaneously injected with a purified homologous encephalitogenic protein (100 ug) in complete Freund's adjuvant (0.1 ml). This basic protein with encephalitogenic activity was isolated from guinea pig brain by a modified (Halčák 1970) procedure originally proposed by Kies (1965).

Guinea pigs were decapitated and analyzed for enzyme activity at three different time periods after sensibilization; three days (early period), seven to eight days

(praeparalytic period) as well as after the appearance of a typical clinical picture of EAE, i.e. fourteen to twenty-one days after sensibilization of animals (paralytic period).

The third — control group of guinea pigs received an intracutaneous injection of complete Freund's adjuvant (0.1 ml) without nervous tissue. This group was analyzed for enzyme activity at the same time periods as the animals of the first and second groups.

Ribonuclease (EC 3.1.4.22) activity was estimated in 0.05 M sodium phosphate buffer at pH — 6,0 in the presence of 0.1% Triton X-100 as well as in 0.05 M Tris-HCl buffer at pH 7.8 in the presence of 10^{-4} M p-chloromercuribenzoate (Egami et al. 1964). Highly polymerized and purified yeast ribonucleic acid (Koch-Light Co., Colnbrook, England) was used as substrate.

The activity of nonspecific phosphodiesterase (EC 3.1.4.1) was estimated in 0.05 M sodium acetate buffer at pH 5.4 as well as in 0.05 M Tris-HCl buffer at pH 8.0 according to Sinsheimer and Koerner (1952) using bis-(p-nitrophenyl) phosphate (Calbiochem, Los Angeles, U.S.A) as substrate.

Subcellular fractionation of guinea pig brain was done according to our previous experience (Pechan, Tursky 1970) by differential and gradient centrifugation.

RESULTS

The estimation of the studied enzyme activities in the cerebral cortex and spinal cord of experimental animals during the development of EAE showed only a significant increase of alkaline ribonuclease activity in the central nervous tissue of guinea pigs with a clinical picture of the disease (Fig. 1): in the group of animals sensibilized with encephalitogenic basic protein in the cerebral cortex by 83.2%, in spinal cord by 77.3%; in the group of guinea pigs sensibilized with whole nervous tissue in the cerebral cortex by 113.3% and in the spinal cord by 133.5% as compared with the control group of animals.

Acid ribonuclease (Fig. 2) as well as nonspecific phosphodiesterase (Fig. 3 and 4) did not changed their activities during the development of the studied pathological process in the central nervous tissue either in the group of animals sensibilized with encephalitogenic protein, or with whole nervous tissue.

Analysis of these enzyme activities in subcellular fractions of guinea pig brain has shown an entirely different distribution of CNPase activity in comparison to other studied phosphodiesterase activities (Fig. 5).

DISCUSSION

The dynamic observation of the activities of the analyzed phosphodiesterases was very interesting with respect to the increase of the CNPase activity found in our previous experiments on this pathological process. In contrast to the activity of this enzyme the increase of which is apparent already in the early period of EAE, the

Fig. 1. Alkaline ribonuclease activity of the central nervous tissue of guinea pigs sensitized with brain encephalitogenic basic protein (a) and with whole nervous tissue (b) at different time periods of development of EAE: early (A), praeparalytic (B) and paralytic (C) period. Solid line: sensitized animals; broken line: control animals.

Ryc. 1. Aktywność zasadowej rybonukleazy w środkowym układzie nerwowym świnek morskich uczulonych zasadowym białkiem encefalitogennym (a), tkanką nerwową (b) w różnych okresach rozwoju EAE: w okresie wczesnym (A), przedporażennym (B) i porażonym (C). Linia ciągła — zwierzęta uczulone, linia przerywana — zwierzęta kontrolne.

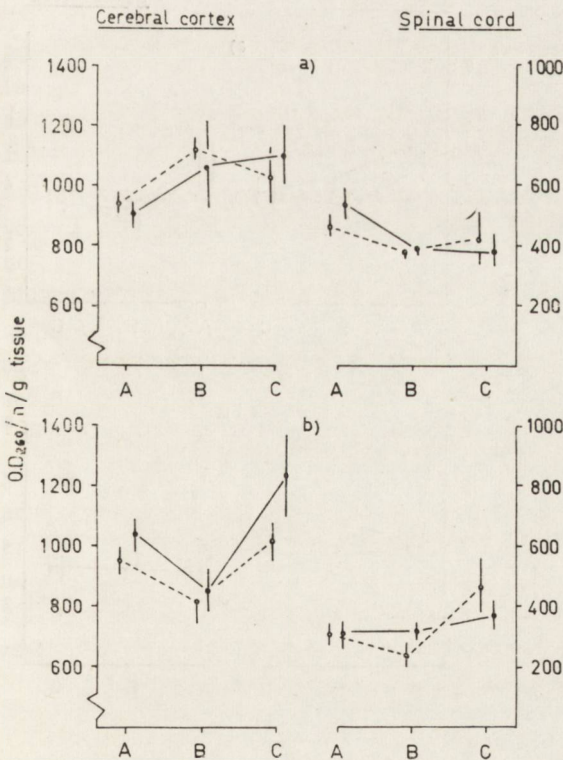
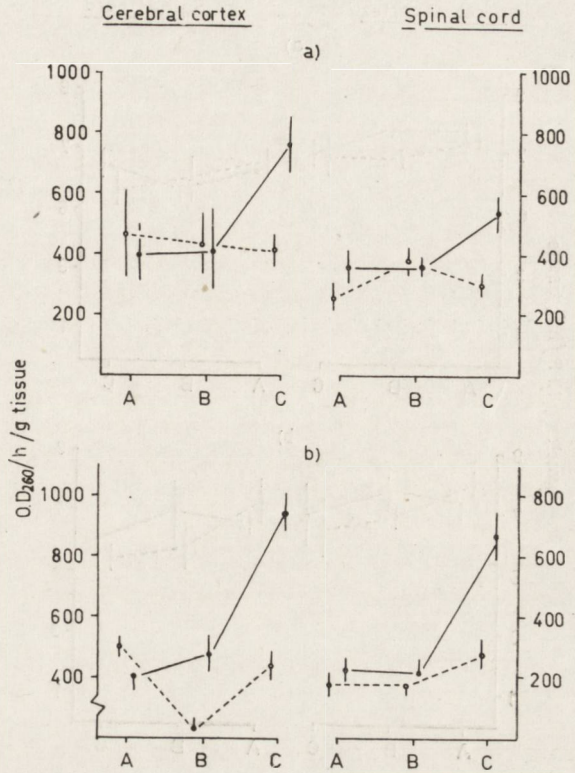


Fig. 2. Acid ribonuclease activity of the central nervous tissue of guinea pigs. Conditions and abbreviations as described in legend to Fig. 1.

Ryc. 2. Aktywność kwaśnej rybonukleazy w ośrodkowym układzie nerwowym świnek morskich. Warunki doświadczalne i oznaczenia jak na ryc. 1.

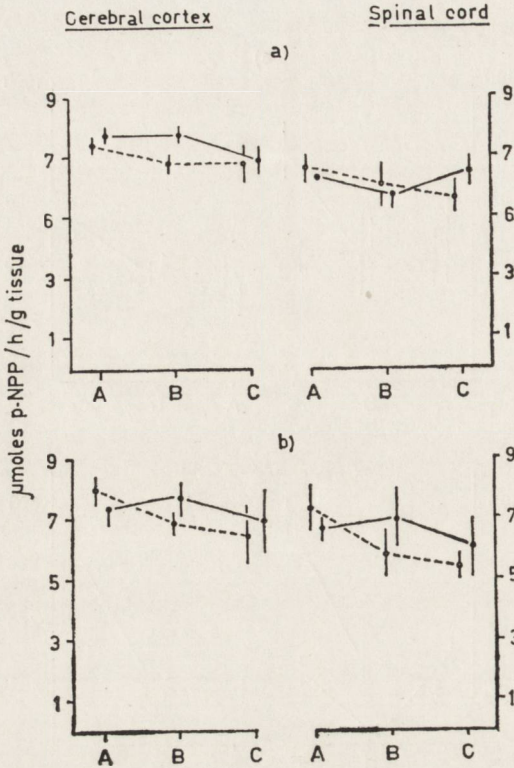


Fig. 3- Nonspecific phosphodiesterase activity of the central nervous tissue of guinea pigs estimated at pH 5.4. Conditions and abbreviations as described in legend to Fig. 1.

Ryc. 3. Aktywność nieswoistej fosfodwuesterazy w ośrodkowym układzie nerwowym świnek morskich oznaczanej przy pH 5.4. Warunki doświadczalne i oznaczenia jak na ryc. 1.

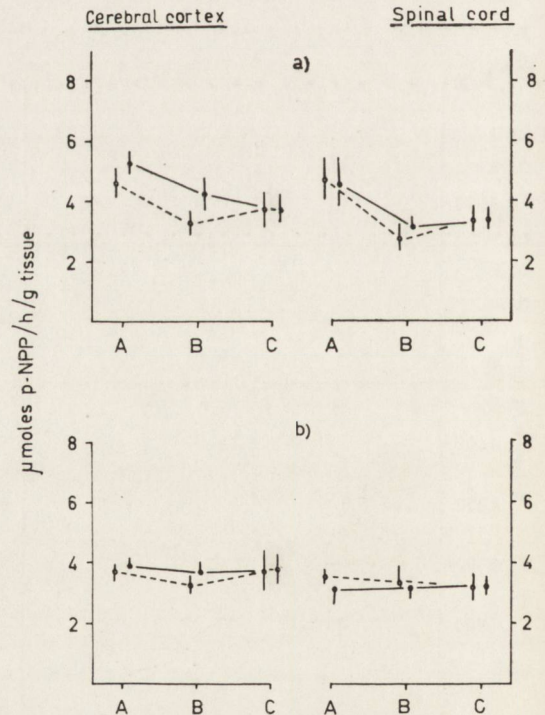
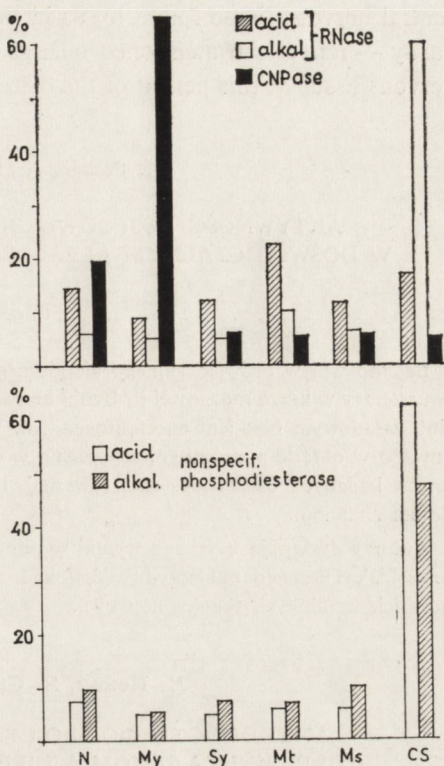


Fig. 4. Nonspecific phosphodiesterase activity of the central nervous tissue of guinea pigs estimated at pH 8.0. Conditions and abbreviations as described in legend to Fig. 1.

Ryc. 4. Aktywność nieswoistej fosfodwuesterazy w ośrodkowym układzie nerwowym świnek morskich oznaczanej przy pH 8.0. Warunki doświadczalne i oznaczenia jak na ryc. 1.

Fig. 5. Subcellular distribution of phosphodiesterase activities in the guinea pig brain. The bars represent the relative distribution of the total activity found. Abbreviations: N—nuclear fraction, My—myelin fraction, Sy—synaptosomal fraction, Mt—mitochondrial fraction, Ms—microsomal fraction, CS—cell sap.

Ryc. 5. Subkomórkowy rozkład aktywności fosfodwuesterazy w mózgu świnki morskiej. Słupki przedstawiają względny rozkład całkowitej aktywności. Oznaczenia: N—frakcja jądrowa, My—frakcja mielinowa, Sy—frakcja synapsomalna, Mt—frakcja mitochondrialna, Ms—frakcja mikrosomalna, CS—płyn komórkowy.



activities of acid ribonuclease and of nonspecific phosphodiesterase did not react to the onset and development of the pathological process by any change, and the activity of alkaline ribonuclease rose only in the period when the clinical picture of EAE appeared.

These observations lead to the suggestion that the activity of CNPase responds very specifically to the development of EAE and that the increase of its activity is not connected clearly with a generalized change in the activities of other phosphodiesterases. It could be possible that this alteration of the activity of CNPase may be a specific answer of certain compartments of the central nervous tissue because of the entirely different distribution of these enzyme activities among the subcellular fractions of guinea pig brain.

The significant increase of alkaline ribonuclease activity could be connected with the intervention of the pathological process with the metabolism of nucleic acids and their derivatives. Since this enzyme plays an important role in the degradation pathways of nucleic acids it is necessary to mention the paper of Osipova (1969) who found, after a significant rise of the ribonucleic acid level at earlier periods of EAE, its normalization or decrease in the paralytical period of this pathological process. Therefore, it is possible that the increase of alkaline ribonuclease activity in the

central nervous tissue found by us in the paralytic period of EAE could — at least partly — reflect the mentioned change of the ribonucleic acid level in the central nervous tissue at this period of the disease.

I. Pecháň, J. Šimeková, L. Halčák

AKTYWNOŚĆ FOSFODWUESTERAZY W TKANCIE NERWOWEJ
W DOŚWIADCZALNYM ALERGICZNYM ZAPALENIU MÓZGU I RDZENIA

Streszczenie

Badano wpływ doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia na aktywność fosfodwuesterazy w korze mózgowej i rdzeniu kręgowym świнок morskich, uczulonych tkanką nerwową i/lub zasadowym białkiem encefalitogennym. Wzrost aktywności zasadowej rybonukleazy obserwowano w okresie porażennym schorzenia w obu grupach zwierząt doświadczalnych. Aktywność innych badanych fosfodwuesteraz (kwaśnej rybonukleazy i nieswoistej fosfodwuesterazy) nie ulegała zmianom.

Autorzy dyskutują uzyskane wyniki w odniesieniu do uzyskanego poprzednio wzrostu aktywności 2'3'cyklicznego nukleotydu 3'fosfohydrolazy w korze mózgu i rdzeniu kręgowym świнок morskich uczulonych tkanką nerwową.

И. Пехан, Я. Симекова, Л. Галчек

АКТИВНОСТЬ ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ НЕРВНОЙ ТКАНИ
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ ГОЛОВНОГО
И СПИННОГО МОЗГА

Резюме

Исследовали влияние экспериментального аллергического воспаления головного и спинного мозга на активность фосфодиэстеразы в коре мозга и спинном мозге морских свинок, сенсibilизированных нервной тканью и/или основными белками энцефалитогенными. В обеих группах экспериментальных животных наблюдалось увеличение активности щелочной рибонуклеазы в паралитический период заболевания. Активность других исследованных фосфодиэстераз (кислой рибонуклеазы и неспецифической фосфодиэстеразы) не изменялась.

Авторы обсуждают полученные результаты в аспекте ранее полученного увеличения активности 3'-фосфогидролазы-2'3'-циклического нуклеотида в коре мозга и спинном мозге морских свинок, сенсibilизированных нервной тканью.

REFERENCES

1. Egami F., Takahashi R., Uchida T.: Ribonucleases in takadiastase: properties, chemical nature and applications. *Progr. Nucleic Acid Res. Molec. Biol.* 1964, 3, 59—101.
2. Halčák L.: Isolation and properties of encephalitogenic protein from bovine spinal cord. *Collection czechoslov. Chem. Commun.* 1970, 35, 2642—2649.
3. Kies M. W.: Chemical studies on an encephalitogenic protein from guinea pig brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1965, 122, 161—170.

4. Osipova J. K.: K topografii nukleinovykh kislot v centralnej nervnoj sisteme morskich svinok na raznykh stadijakh demielinizirujuščego processa. In: Ostryj encefalomyelit v eksperimente i klinike. Minsk. 1969, Izdat. Nauka i Technika, 78—84.
5. Pecháň I., Šimeková J.: 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase activity of the central nervous tissue in allergic encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 1972, 19, 557—558.
6. Pecháň I., Turský T.: Aktivita 5'-nukleotidazy v bunkovych strukturach mozgu morcat'a. *Biologia (Bratislava)* 1970, 25, 153—158.
7. Sinsheimer R. L., Koerner J. F.: A purification of venom phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 1952, 198, 293—296.

Author's address: Department of Biochemistry, Medical Faculty of the Comenius University, Sasinkova 4, 801 00 Bratislava (Czechoslovakia)

I. PECHÁŇ, L. HALČÁK

BIOCHEMICAL EFFECTS OF SENSIBILIZATION OF GUINEA PIGS WITH BASIC ENCEPHALITOGENIC PROTEIN

Department of Biochemistry, Medical Faculty of the Comenius University, Bratislava,
Czechoslovakia

Head: Doc. Dr. J. Križko, CSc

More than forty years ago, Rivers et al. (1933) evoked morphologically as well as clinically characteristic injuries of the central nervous tissue in monkeys by repeated administration of homologous nervous tissue. This at present pathogenetically well defined pathological unit was called experimental allergic encephalomyelitis (EAE). This term expresses the presumed mechanism of its development as the immunological answer of the organism to injected antigen which is a constituent of the central nervous tissue. Roboz-Einstein and Henderson (1959) as well as Kies and Alvord (1959) isolated a homogenous basic protein with distinct encephalitogenic properties from the brain. At present, it is generally accepted that EAE is a pathological process arising as an immunological response to this basic protein from the same kind of tissue.

To verify our previous results which have demonstrated some significant changes of the activities of hydrolytic enzymes in EAE evoked by administering whole nervous tissue as a multiantigenic material, we tried to repeat the estimation of the activities of these enzymes in experiments in which EAE was evoked by injecting a definite antigen — purified basic encephalitogenic protein isolated from the guinea pig brain. This protein has been previously analyzed for its physicochemical properties, homogeneity and biological properties.

In the cerebral cortex and spinal cord of guinea pigs sensitized with this antigen we studied the activities of some hydrolases that catalyze the reactions of amino acid and nucleotide metabolism: 5'-nucleotidase (5'-ribonucleotide phosphohydrolase — EC 3.1.3.5), adenosine deaminase (adenosine aminohydrolase — EC 3.5.4.4.) and asparaginase (L-asparagine aminohydrolase — 3.5.1.1).

MATERIAL AND METHODS

Female guinea pigs (400—500 g) were intracutaneously injected with 100 μ g homologous encephalitogenic basic protein in complete Freund's adjuvant (Difco). The animals were decapitated and their central nervous tissue was analyzed for

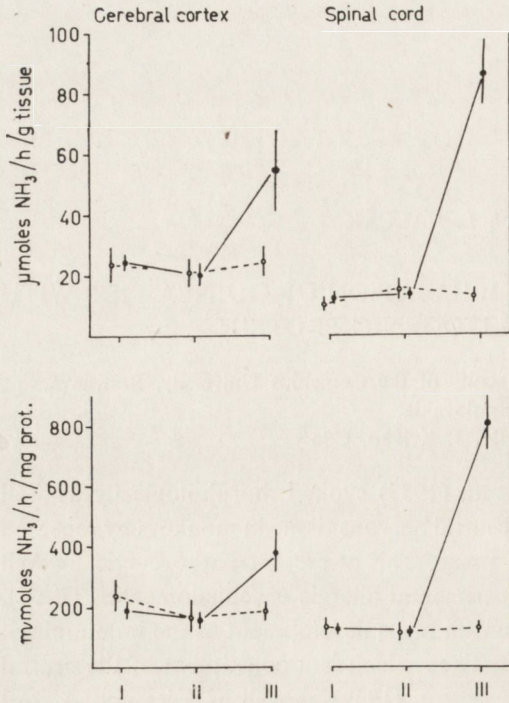


Fig. 1. Asparaginase activity in the central nervous tissue of guinea pigs at different time periods after their sensibilization with basic encephalitogenic protein: at early (I), prae-paralytic (II) and paralytic (III) periods of the disease. Solid line: sensibilized animals, broken line: control animals.

Ryc. 1. Aktywność asparaginazy w ośrodkowym układzie nerwowym świnek morskich w różnym okresie po uczuleniu zasadowym białkiem encefalitogennym: we wczesnym okresie (I), okresie przedporażnym (II) i w porażnym (III) okresie choroby. Linia ciągła — zwierzęta uczulone, linia przerywana — zwierzęta kontrolne.

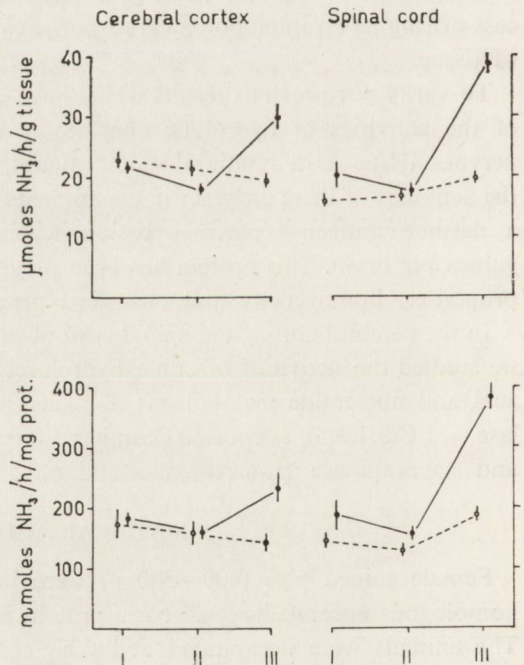
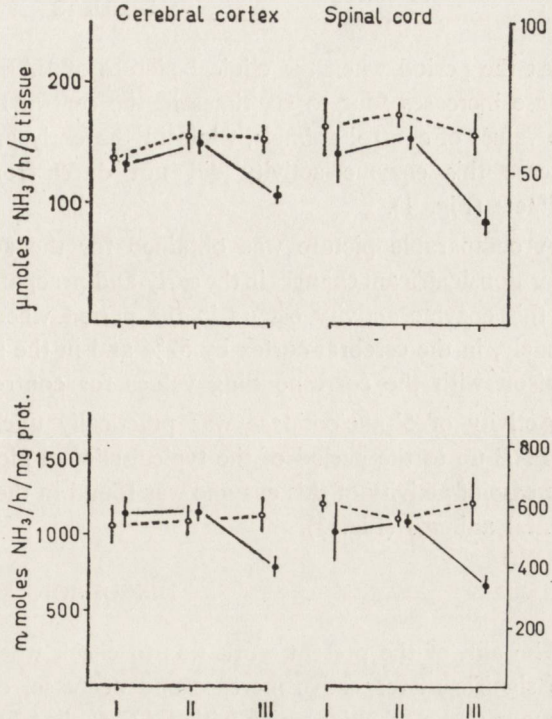


Fig. 2. Adenosine deaminase activity in the central nervous tissue of guinea pigs sensitized with basic encephalitogenic protein. For conditions and abbreviations see legend to Fig. 1.

Ryc. 2. Aktywność dezaminazy adozynowej w ośrodkowym układzie nerwowym świnek morskich uczulonych zasadowym białkiem encefalitogennym. Warunki doświadczalne i oznaczenia jak na ryc. 1.

Fig. 3. 5'-nucleotidase activity in the central nervous tissue of guinea pigs sensitized with basic encephalitogenic protein. For conditions and abbreviations see legend to Fig. 1.

Ryc. 3. Aktywność 5'-nukleotydazy w ośrodkowym układzie nerwowym świnek morskich uczulonych zasadowym białkiem encefalitogennym. Warunki doświadczalne i oznaczenia jak na ryc. 1.



enzyme activity at three different time periods: the early period (three days), the preparalytic period (seven to eight days) and the paralytic period (fourteen to twenty-one days after inoculation of animals). The control group of guinea pigs received complete Freund's adjuvant alone and their central nervous tissue was analyzed for enzyme activities at the same time periods.

Encephalitogenic basic protein has been isolated from guinea pig brain by acid extraction (Kies 1965) after previous delipidation of the tissue with a mixture of chloroform and methanol (2:1) (Halčák 1970). This protein of molecular weight around 21 000 was chromatographically (Sephadex G-100), electrophoretically (starch-gel electrophoresis in two buffer systems: in borate buffer, pH 8.48, and in sodium acetate buffer, pH 4.6) as well as ultracentrifugally (Beckman Analytical Ultracentrifuge in 0.1 M sodium chloride at 20°C) found to be a homogeneous product. It contained a high proportion of basic amino acids (23%) with only tryptophan residue (Halčák 1973).

Asparaginase activity was estimated in Tris-HCl-buffer at pH 8.2 according to Tursky and Valovičova (1964), the activity of adenosine deaminase in Tris-HCl-buffer at pH 7.2 (Mališeva et al. (1964), and 5'-nucleotidase activity in sodium barbital buffer at pH 7.5 with adenosine-5'-phosphate as substrate (Pecháň, Tursky 1969). The activity of nonspecific phosphomonoesterase was eliminated by incubation of a parallel tissue sample with a mixture of adenosine 2'- and 3'-phosphates (Loba Chemie, Wien, Austria).

RESULTS

At the period when the clinical picture of EAE appears, the activity of asparaginase increases four to six times in the central nervous tissue as compared with the values of control animals, while in the early and praeparalytical periods of the disease this enzyme activity did not differ from that in the control group of animals (Fig. 1).

A comparable picture was obtained for the activity of adenosine deaminase: after nonsignificant changes in the early and praeparalytic periods, a marked increase of this enzyme activity occurs in the period when the guinea pigs are paralyzed, namely, in the cerebral cortex by 52% and in the spinal cord even by 94% in comparison with the corresponding values for control animals (Fig. 2).

Activity of 5'-nucleotidase was practically unchanged during the development of EAE up to the period of the typical clinical picture of disease when a significant decrease of activity of this enzyme was found in the central nervous tissue of experimental animals (Fig. 3).

DISCUSSION

The aim of the present work was to check whether the information concerning the significant respective increase and decrease, of some enzyme activities in the nervous tissue of guinea pigs with EAE evoked by sensibilization with homologous brain and spinal cord tissue of guinea pigs is valid also in the case of sensibilization of guinea pigs with specific homogenous basic encephalitogenic protein. Central nervous tissue contains, namely, a complex of substances with antigenic properties which can provoke an immunological response without the morphological and clinical signs characteristic for EAE (Hatcher, MacPherson 1969; MacPherson, Liaskopoulou 1966).

Hoffman et al. (1973) compared the clinical picture and morphological changes in the central nervous tissue after sensibilization of experimental animals with whole spinal cord homogenate, isolated homogenous bovine encephalitogenic protein as well as a synthetic encephalitogenic peptide. It was observed that the inflammatory lesions and the clinical picture of the disease after administration of encephalitogenic protein and crude spinal cord homogenate, respectively, did not differ significantly, but demyelination in the central nervous tissue after sensibilization with encephalitogenic protein did not appear so often as in animals injected with spinal cord homogenate.

In the present study we have found practically the same changes in the activities of 5'-nucleotidase, adenosine deaminase and asparaginase during the development of EAE as they were described in our previous paper (Pecháň 1969) as well as by Valovičova et al. (1966) in the cerebral cortex and spinal cord of guinea pigs injected with whole central nervous tissue.

These findings allow us to suggest that the reported changes of enzyme activities in the central nervous tissue of experimental animals are not an answer to a multiantigenic stimulus of whole nervous tissue, but that they arise after a specific antigenic stimulus evoked by a definite homogenous protein also isolated from the guinea pig brain.

I. Pecháň, L. Halčák

ZMIANY BIOCHEMICZNE W MÓZGACH ŚWINEK MORSKICH UCZULONYCH ZASADOWYM BIAŁKIEM ENCEFALITOGENNYM

Streszczenie

Wstrzykiwanie homogennego zasadowego białka encefalitogennego, izolowanego z mózgow świnek morskich i zemulgowanego w adiuwancie Freund'a, prowadzi do wystąpienia zespołu klinicznego charakterystycznego dla doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia. Obserwowane zmiany aktywności niektórych enzymów hydrolitycznych (5'-nukleotyduazy, dezaminazy adenozykowej i asparaginazy) mają taki sam charakter jak zmiany obserwowane poprzednio u świńek morskich, którym wstrzykiwano pełną tkankę nerwową. Zdaniem autorów zmiany te mogą być traktowane jako jedna ze specyficznych odpowiedzi ustroju na proces patologiczny spowodowany przez wstrzyknięcie homologicznego antygenu.

И. Пехан, Л. Галчек

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ МОРСКИХ СВИНОК, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ ОСНОВНЫМ БЕЛКОМ ЭНЦЕФАЛИТОГЕННЫМ

Резюме

Инъекция гомогенного основного белка энцефалитогенного, выделенного из мозга морских свинок и эмульгированного в адьюванте Фрейнда, ведет к появлению клинической картины, характерной для экспериментального аллергического воспаления головного и спинного мозга. Характер наблюдаемых изменений активности некоторых гидролитических ферментов (5'-нуклеотидазы, аденозин-дезаминазы и аспарагиназы) такой же, как и изменений, наблюдаемых ранее у морских свинок, которым был введен гомогенат нервной ткани. По мнению авторов изменения эти можно рассматривать как одну из специфических реакций организма на патологический процесс, вызванный инъекцией гомологического антигена.

REFERENCES

1. Halčák L.: Isolation and properties of encephalitogenic protein from bovine spinal cord. Collection Czechoslov. Chem. Commun. 1970, 35, 2642—2649.
2. Halčák L.: Príspevok k štúdiu fyzikálno-chemických a biologických vlastností encefalitogénnej bielkoviny. Dissertation, Bratislava 1973.
3. Hatcher V. B., MacPherson C. F. C.: Studies on brain antigens. II. Water soluble antigenic proteins of bovine brains. J. Immunol. 1969, 102, 877—883.
4. Hofman P. M., Gaston D. D., Spittler L. E.: Comparison of experimental allergic encephalomyelitis induced with spinal cord, basic protein, and synthetic encephalitogenic peptide. Clin. Immunol. Immunopathol. 1973, 1, 364—371.

5. Kies M. W.: Chemical studies on an encephalitogenic protein from guinea pig brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1965, 122, 161—170.
6. Kies M. W., Alvord B. C., Jr.: Encephalitogenic activity in guinea pigs of water soluble protein fractions of nervous tissue. „Allergic” Encephalomyelitis. C. C. Thomas, Springfield 1959, 352.
7. MacPherson C. F. C., Liakopoulou A.: Studies on brain antigens. I. Water soluble antigenic proteins of rat brains. *J. Immunol.* 1966, 97, 405—457.
8. Mališeva M. K., Poljakova N. M., Emčuk T. I.: Ocistka ta vivcennja vlastivostej dezaminazi adenzozinu golovného mozku. *Ukraj. Biochim. Z.* 1964, 36, 323—333.
9. Pecháň I.: Activities of 5'-nucleotidase and of deaminases in the nervous tissue of guinea pigs with experimental allergic encephalomyelitis. *Z. Ges. Exp. Med.* 1969, 151, 222—231.
10. Pecháň I., Tursky T.: Estimation of 5'-nucleotidase activity in the nervous tissue. *Enzymologia* 1869, 37, 73—82.
11. Roboz E., Henderson N.: Preparation and properties of water-soluble proteins from bovine cord with „allergic” encephalomyelitis activity. „Allergic” Encephalomyelitis. C. C. Thomas, Springfield 1959, 352.
12. Tursky T., Valovičova E.: Asparaginase in the brain of guinea pig in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurochem.* 1964, 11, 99—108.
13. Valovičova E., Rajčani J., Tursky T., Brozman M.: Asparaginase bei der experimentellen allergischen Encephalomyelitis. IV. Die Beziehung der Asparaginase des Zentralnervensystems in Entwicklungsverlauf der experimentellen allergischen Encephalomyelitis bei Meerschweinchen. *Z. Ges. Exp. Med.* 1966, 140, 256—267.

Author's adress: Department of Biochemistry, Medical Faculty of the Comenius University, Sasinkova 4, 801 00 Bratislava (Czechoslovakia).

B. ZGORZALEWICZ, J. PATELSKI, J. JELJASZEWICZ

THE EFFECT OF STAPHYLOCOCCAL ALPHA-TOXIN UPON THE *IN VIVO*
AND *IN VITRO* ACTIVITY OF AMINO ACYL-sRNA SYNTHETASES* IN
THE RABBIT BRAIN**

Department of Neurology, Department of Biochemistry, Medical
Academy, Poznań and National Institute of Hygiene, Warszawa

Recent reports have implicated staphylococcal alpha toxin as the causative agent in a variety of pathological lesions. For review of the subject see Jeljaszewicz (1974). The involvement of the central nervous system after intravenous injection of this toxin was mainly found within the thalamic region (Edelwejn et al., 1971). Nevertheless the final localisation of staphylococcal alpha toxin action in the central nervous system, still has to be precisely determined.

In search for the site of toxin action at the molecular level, activation of amino acids by amino acyl-sRNA synthetases was studied in enzyme preparations of rabbit brains. The experiments were carried out in order to test whether the enzyme activity in the cerebral cortex and white matter might be influenced by staphylococcal alpha-toxin injected to rabbits and added to the reaction mixtures containing enzyme preparations from the injected and control animals. A preliminary report of these results has appeared elsewhere (Patelski et. al., 1972).

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Staphylococcal alpha-toxin (M.W. 44 000 daltons) was purified according to Bernheimer and Schwartz (1963). One microgram of the toxin used in this study contained 2 MHD (minimal hemolytic doses) when tested against rabbit erythrocytes. For experiments, saline solutions freshly prepared from freeze-dried toxin were used. The source of the other reagents has already been given (Patelski et al., 1972/73).

* Amino acid: tRNA-ligases (AMP) EC 6.1.1.

** These investigations were supported by the U.S. Public Health Service. Research Agreement No. 05-327-2.

Enzyme preparations

Belgian giant rabbits of either sex and approximately 5 kg body weight were used. The animals were injected in the marginal ear vein with staphylococcal alpha-toxin: 25 µg (Group II), 150 µg (III) and 250 µg (IV) in 5 ml saline, three times, every second day. Control animals (Group I) were injected with saline. The rabbits were sacrificed by decapitation twenty-four hours after the last injection and samples of cerebral cortex and white matter were taken and processed further as described by Zgorzalewicz (1973). Enzyme extracts from acetone and acetone-butanol powders were prepared and the amino acid activation was determined using the hydroxamic method of Hoagland (1955). Details of the methods were described previously (Patelski et al., 1972/73). Protein was estimated by the biuret method (Kingsley, 1942). Results are expressed in milliunits of enzyme specific activity, i.e. in nmoles of amino acid hydroxamates formed $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

RESULTS

The specific activities of amino acyl sRNA synthetases of acetone and acetone-butanol enzyme preparations obtained in the same control animals are shown in Table 1. The amino acid activation is higher in protein extracts of acetone-butanol powders than in those of acetone powders. The former were used for further investigations.

Table 1. Amino acid activation of enzyme preparations from acetone powders and acetone-butanol powders of rabbit brain

Preparation	Cerebral cortex		White matter	
	Protein mg/0.05 ml	Activity nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹	Protein mg/0.05 ml	Activity nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹
Acetone	1.40±0.22	6.8±2.2	1.39±0.25 ¹⁾	5.2±1.7
Acetone-butanol	1.38±0.21	7.5±1.9	1.38±0.21	7.1±1.2
Difference	0.02 (0.03)	0.7 (0.8)	0.01 (0.03) ²⁾	1.9 (0.7) ³⁾

¹⁾ Mean ± standard deviation obtained from 6 preparations

²⁾ Mean difference (standard error of the mean)

³⁾ The mean differences were estimated by Student's paired t test.

Statistically significant difference is indicated by + P ≤ 0.05

Enzyme activity was measured in 1 ml reaction mixtures consisting of MgCl₂; 10µmol; TRIS-HCl pH 7.8 175 µmol; equimolar mixture of 20 protein l-amino acids, 100 µmol; ATPNa₂, 10 µmol; inorganic pyrophosphatase (3.6.1.1.), 35 µg; and enzyme preparation 0.05 ml. Incubation at 37°C for 30 min.

No direct proportion between the amount of protein of the enzyme preparation and the amino acid hydroxamates formed in the reaction mixture was found (Figure 1). Therefore only similar protein concentrations in the enzyme preparations, were used.

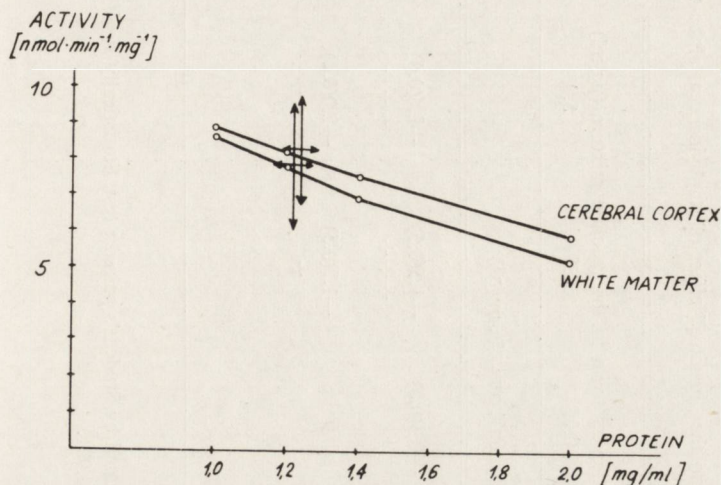


Fig. 1. Relation between the amount of protein of brain enzyme preparations in the reaction mixtures and the enzyme specific activity. Activities obtained with different volumes of the enzyme preparations from grey and white matter of rabbit brain are shown as circles (means from 4 series of determinations). Mean activities and protein concentration \pm standard deviations for 6 enzyme preparations from cerebral cortex and white matter are indicated by black dots with arrows. For experimental conditions see Table 1.

In control animals the specific activity of amino acyl sRNA synthetases of grey and white matter were statistically different, as compared by Student's paired t test (Table 2). After addition of increasing amounts of staphylococcal alpha toxin to the reaction mixtures, some differences in the enzyme activity appeared in control rabbits. In white matter the enzyme activities at a 0.025 μg toxin concentration in 1 ml of the reaction mixtures were enhanced. In the cerebral cortex, amino acid hydroxamate formation was not affected by the toxin in a 0.025—0.25 μg concentration range. Increasing concentrations of alpha toxin (0.5—10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) resulted in a considerable decrease in amino acid activation in the grey and white matter. These changes were more pronounced in the cerebral cortex than in the white substance in all experiments.

The enzyme activity in animals injected intravenously with staphylococcal alpha toxin in a total dosis of 75 to 150 μg was unchanged as compared with control (Table 3). In brain preparations obtained from animals injected with 750 μg of the toxin (group IV) an increase in the activity of the amino acyl sRNA synthetases in the white matter was found. Continuous decrease in the enzyme activities was noted in the presence of the toxin within the concentration range of 0.1—0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the reaction mixtures in groups III and IV, but not in control animals.

Table 2. Enzyme activities in grey and white matter of rabbit brain and the „in vitro” effect of staphylococcal alpha-toxin

Matter	Protein mg/0.05 ml	Activity	Concentration of toxin in the reaction mixture ($\mu\text{g/ml}$)					
			0.025	0.1	0.25	0.5	5.0	10.0
Difference in activity ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$)								
Grey	1.23 ± 0.04^1	8.2 ± 1.5	0	0	-0.3(0.5)	-1.5(0.5) ² +++	-2.4(0.6) +++	-4.4(0.9) ++++
White	1.22 ± 0.04	7.8 ± 1.8	0.5(0.2) +	0.1(0.4)	0	-1.2(0.5) +	-2.0(0.4) ++++	-3.4(0.7) ++++
Difference	0.01	0.4(0.16) +						

1) Mean \pm standard deviation obtained from 15 experimental animals

2) Mean difference (standard error of the mean). The mean differences were estimated by Student's paired t test. Statistically significant differences are indicated by: +P \leq 0.05; ++P \leq 0.02; +++P \leq 0.01; ++++P \leq 0.001.

For reaction mixture see Table 1.

Table 3. „In vivo” and „in vitro” effect of staphylococcal alpha-toxin on the activity of amino acyl-sRNA synthetases in rabbit cerebral grey and white matter

Mat- ter	Group ¹⁾	No of animals	Protein mg/0.05 ml	Activity	Concentration of the toxin in the reaction mixture (µg/ml)		
					0.025	0.1	0.25
					Difference in activity (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)		
Grey White	I	15	1.23±0.04 ²⁾	8.2±1.5	0	0	—0.3 (0.5)
			1.22±0.04	7.8±1.8	0.5 (0.2) ³⁾	0.1 (0.4)	0
					+		
Grey White	II	6	1.20±0.04	8.6±1.1			
			1.20±0.04	8.6±1.4			
Grey White	III	11	1.19±0.06	7.7±0.8	0	—1.2 (0.4)	—3.0 (1.0)
			1.19±0.05	7.0±1.2	0.2 (0.3)	—1.4 (0.4)	—2.7 (0.8)
					+++		
Grey White	IV	13	1.18±0.04	9.3±1.7	—0.4 (0.6)	—2.7 (1.2)	—2.8 (1.2)
			1.19±0.05	9.4±1.6	—0.3 (0.2)	—2.0 (0.6)	—2.5 (1.1)
					+++		

¹⁾ Animals injected intravenously with (I) saline or (II) staphylococcal alfa-toxin 25 µg; (III) 150 µg; (IV) 250 µg in 5 ml saline, every second day, three times.

²⁾ Mean ± standard deviation. The means were compared by Student's *t* test. The statistical significance is indicated by +P ≤ 0.05.

³⁾ Mean difference (standard error of the mean). The mean differences were estimated by Student's *t* test. Statistically significant differences are indicated by: +P ≤ 0.05; ++P ≤ 0.02; +++P ≤ 0.01.

For reaction mixture see table 1.

DISCUSSION

Differences in enzyme activities between the acetone-butanol and acetone powders obtained for white matter but not for cerebral cortex, can be explained by the known lipid composition of the two substances and extraction of phospholipids by butanol. The elevated enzyme activity in acetone-butanol powder of white matter, is still lower as compared with the appropriate value for the cerebral cortex. Thus, previous observations obtained, using only acetone powders of grey and white matter (Zgorzalewicz, 1973) are confirmed by the present results.

The use of acetone-butanol powders, rather than acetone powders, and possibly equal protein concentrations of enzyme extracts should be recommended, as indicated by the results. It is interesting, that in the brain the stimulatory effect of smaller doses of the toxin on amino acid activation both *in vivo* and *in vitro* is less pronounced than in the arterial wall (Patelski et al., 1974). The activity of particular amino acyl sRNA synthetases in nervous tissue of normal rabbits (Wender, Zgo-

rzalewicz, 1969) is also apparently lower than in the aorta (Patelski et al., 1972/73). This may depend on different toxin concentrations in the two organs. It is supported by previous experiments in rabbits given intravenously ^{131}J labelled staphylococcal alpha toxin, where different toxin concentrations were found in brain and other organs (Jeljaszewicz et al., 1969).

The cerebral cortex seems to be more sensitive to the inhibitory effect of the toxin in contrast to the white matter. Only the latter appears to be sensitive to the stimulatory effect of the toxin. The response of the brain enzymes to toxin action may be at least partially connected with its neurotoxic activity in the thalamus region (Edelwejn et al., 1971) and cerebral cortex (Edelwejn, Jeljaszewicz, 1973).

Although no marked increase in enzyme activity was seen in rabbits previously injected with the toxin, the *in vitro* inhibition of the amino acid activation was much stronger in these, than in control animals. Therefore, the possibility that the nervous tissue has been *in vivo* affected by the toxin cannot be excluded. However, the immunological mechanism of the toxin action in the central nervous system has to be elucidated.

B. Zgorzalewicz, J. Patelski, J. Jeljaszewicz

WPLYW ALFA TOKSYNY GRONKOWCOWEJ NA AKTYWNOŚĆ SYNTETAZ AMINOACYLO sRNA W MÓZGU KRÓLIKA *IN VIVO* I *IN VITRO*

Streszczenie

Badano wpływ alfa toksyny gronkowcowej na aktywność syntetaz aminoacylo sRNA w mózgu królika *in vitro* i po podaniu toksyny parenteralnie w łącznej dawce 75, 450 i 750 mikrogramów. Enzymy aktywujące aminokwasy otrzymywano z proszków acetonowych i acetonowo-butanolowych. Aktywację aminokwasów badano metodą hydroksamową w mieszaninach reakcyjnych zawierających po 5 mikromoli każdego z 20 l-aminokwasów. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono:

1. Wyższą aktywność właściwą syntetaz aminoacylo sRNA w preparatach enzymatycznych otrzymanych z proszków acetonowo-butanolowych niż z acetonowych
2. Wzrost aktywności enzymatycznej w istocie białej mózgu królika *in vivo* i *in vitro* przy niższych stężeniach alfa toksyny gronkowcowej
3. Działanie hamujące niezależne od sposobu wprowadzenia wyższych stężeń toksyny na aktywację aminokwasów w tkance nerwowej, w szczególności w korze mózgowej.

Dyskutowano mechanizm działania alfa toksyny gronkowcowej na wstępne etapy biosyntezy białka w ośrodkowym układzie nerwowym.

Б. Згожалевич, Я. Пательски, Я. Еляшевич

ВЛИЯНИЕ СТАФИЛОКОККОВОГО АЛЬФА ТОКСИНА НА АКТИВНОСТЬ АМИНОАЦИЛ-SPHK СИНТЕТАЗ В МОЗГУ КРОЛИКА *IN VIVO* И *IN VITRO*

Резюме

Исследовали влияние стафилококкового альфа-токсина на активность аминоксил-SPHK синтетаз в мозгу кролика *in vitro* и после внутривнутрибрюшинного введения токсина в общей дозе 75, 450 и 750 мкг. Ферменты, активирующие

аминокислоты, получали из ацетон-бутаноловых порошков. Активность аминокислот исследовали гидроксамовым методом в реакционных смесях, содержащих по 5 мкмоль каждой из 20 L-аминокислот.

В результате проведенных исследований было обнаружено:

1. Более высокая специфическая активность аминоксил-SPHK синтетаз в энзиматических препаратах, полученных из ацетон-бутаноловых порошков, чем из ацетоновых.
2. Рост энзиматической активности в белом веществе мозга кроликов *in vivo* и *in vitro* при более низких концентрациях стафилококкового альфа-токсина.
3. Ингибирующее влияние более высоких концентраций токсина, независимо от способа введения, на активирование аминокислот в нервной ткани, в особенности в коре мозга.

Обсуждается механизм действия стафилококкового альфа-токсина на начальные стадии биосинтеза белка в центральной нервной системе.

REFERENCES

1. Bernheimer, A. W., Schwartz, L. L.: Isolation and composition of staphylococcal alpha toxin. *J. Gen. Microbiol.* 1963, 30, 455—468.
2. Edelwejn, Z., Jeljaszewicz, J., Żak, C.: Localisation of neurotoxic activity of staphylococcal alpha hemolysin in the thalamus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1971, 19, 247—262.
3. Edelwejn, Z., Jeljaszewicz, J.: Influence of staphylococcal alpha-hemolysin on cortical sensory evoked potentials. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1973, 25, 1—6.
4. Hoagland, M. B.: An enzymic mechanism for amino acid activation in animal tissues. *Biochim. biophys. Acta* 1955, 16, 288—289.
5. Jeljaszewicz, J., Szmigielski, S., Żak, C.: Distribution of ¹³¹I labelled staphylococcal alpha hemolysin in the rabbit. *Zentralbl. Bakteriol.* 1969, 209, 310.
6. Jeljaszewicz J.: Toxins alpha, beta, delta. In: *The Staphylococci* (J. O. Cohen ed.) Wiley (Interscience), New York, 1974 (in press).
7. Kingsley, M.: The direct biuret method for the determination of serum proteins as applied to photoelectric and visual colorimetry. *J. Lab. clin. Med.* 1942, 27, 840—846.
8. Patelski, J., Waligóra, Z., Zgorzalewicz, B., Szulc, S.: Activation of amino acids in the aorta. *Enzyme* 1972/73, 14, 297—310.
9. Patelski, J., Zgorzalewicz, B., Szulc, S., Jeljaszewicz, J.: Wpływ alfa toksyny gronkowcowej na aktywację aminokwasów w ośrodkowym układzie nerwowym. VI Dzień Neurochemii Klinicznej, Zielona Góra 1972, 10.
10. Patelski, J., Zgorzalewicz, B., Szulc, S., Waligóra, Z., Jeljaszewicz, J.: In vivo and in vitro effect of staphylococcal alpha-toxin on amino acid activation in the aorta. *Biochem. Pharmacol.* 1974. To be published.
11. Wender, M., Zgorzalewicz, B.: Activation of amino acids in the developing rabbit brain. *Folia biol.* 1969, 17, 139—166.
12. Zgorzalewicz, B.: Activity of sRNA amino acyl synthetases in ontogenic development of rabbit brain. *Biol. Neonate* 1973, 23, 161—170.

Authors' address: Department of Neurology, Institute of Nervous and Sensory Organs Diseases, Medical Academy, 60-355 Poznań, Poland, 49 Przybyszewskiego Str.

F. W. RATH, D. FELICETTI

ZUR HISTOCHEMISCHEN DARSTELLUNG EINER DURCH ZINKAZETAT
STARK AKTIVierten SAUREN PHOSPHATASE IN FRÜHSTADIEN
N-ÄTHYL-N-NITROSOHARNSTOFF-INDUZIERTER TUMOREN
DES RATTENGROSSHIRNS

Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/DDR
Direktor: Prof. Dr. W. Jänisch

Im Grosshirn der Ratte lässt sich ein durch Zinkionen aktivierbares tartratresistentes Enzym aus der Gruppe der sauren Phosphatasen nachweisen. Dieses Enzym (ZT-SP) kann nach Isoelektrofokussierung in Polyakrylamidgelen nahezu selektiv erfasst und durch Gelfiltration auf Sephadex G 100 angereichert werden (Felicetti, Rath a). Durch die Tartratresistenz der ZT-SP bei gleichzeitiger Hemmung der anderen tartratresistenten sauren Phosphatasen durch Zinkionen ist dieses Enzym auch histotopochemisch darstellbar (Rath, Felicetti).

Wir untersuchten das Verhalten der ZT-SP in experimentell induzierten gliösen Mikrotumoren des Rattengrosshirns. Sie wurden erzeugt mit 85 mg/kg Körpergewicht N-Äthyl-N-Nitrosoharnstoff (ÄNH), der neugeborenen Ratten 12 Stunden post partum subkutan injiziert wurde. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 170 Tagen. Die Gehirne wurden unfixiert in Serienschritte zerlegt. Die histochemische Darstellung der Gesamtaktivität der sauren Phosphatasen erfolgte nach Barka und Anderson (1962) mit 1-Naphthylphosphat und hexazotiertem Pararosanilin. Zur Darstellung der ZT-SP wurden dem Inkubationsmedium 20 mM Zinkazetat und 10 mM D, L-Natriumtartrat zugesetzt.

In 6 Rattengrosshirnen wurden 20 Gliome gefunden, von denen 17 erst bei der mikroskopischen Untersuchung entdeckt werden konnten (Mikroglione). Bei ihnen handelte es sich um 9 Oligodendrogliaknötchen und um 8 gemischtzellige Gliome, bei denen 5 mal die Astrozytenproliferation im Vordergrund stand.

Die Oligodendrogliaknötchen zeigen eine histochemisch darstellbare Aktivität der sauren Phosphatasen, die nach Zugabe von Zinkazetat und Natriumtartrat zum Inkubationsmedium vollständig gehemmt wird. Dagegen ist in gemischten, besonders den astrozytenreichen Gliomen die ZT-SP deutlich aktiv, besonders in den perivaskulären Zellwucherungen. Iso- und polymorphzellige Mischgliome sowie Gliobla-

stome zeigen dabei ein einheitliches Enzymverhalten (Rath, Felicetti; Felicetti, Rath b).

Die Abb. 1 zeigt das Enzymverhalten in einem gemischtzelligen Mikroglom, das sich im Balken entwickelt hat. Die höchste Aktivität der sauren Phosphatasen findet sich im Tumor, im Plexus chorioideus und im Stratum pyramidale des Ammonshornes (Abb. 1a). Nach Zusatz von Zinkacetat und Natriumtartrat zum Inkubationsmedium wird die Aktivität des Stratum pyramidale ebenso wie die der anderen Hirnareale stark gehemmt, während der Mikrotumor und der Plexus chorioideus eine hohe Enzymaktivität behalten (Abb. 1b). Die ZT-SP-Aktivität des Plexus chorioideus ist in den Stromazellen lokalisiert, während bei Darstellung der Gesamtaktivität der sauren Phosphatasen die höchste Aktivität im Plexusepithel zu finden ist (Felicetti, Rath a). Abgesehen vom Stratum pyramidale, wird die Phosphataseaktivität des Ammonshornes durch Zink- und Tartrationen nur wenig beeinflusst. Dagegen wird die Aktivität der Hirnrinde komplett gehemmt. Unabhängig von der Tumorgroße und dem Grad der Iso- bzw. Polymorphie der gemischten Gliome bzw. Glioblastome weisen die perivaskulären Zellproliferationen eine sehr hohe Aktivität der ZT-SP auf (Abb. 1c).

Neben den gliösen Tumoren fanden sich in den 6 Rattengrosshirnen 5 Herde, die sich aus ihrer Umgebung durch eine deutliche Aktivität der ZT-SP heraushoben, ohne dass an entsprechender Stelle bei der Darstellung der Gesamtaktivität der sauren Phosphatasen oder bei der histologischen Untersuchung Veränderungen gefunden werden konnten (vgl. Abb. 4 bei Rath, Felicetti). Zinkaktivierte saure Phosphatasen sind bekannt, konnten bisher aber unseres Wissens weder im Gehirn biochemisch nachgewiesen noch topochemisch dargestellt werden (Felicetti, Rath a). Zur näheren Charakterisierung dieses Enzyms aus der Gruppe der sauren Phosphatasen und seinem Verhalten in normaler und tumoröser Glia sind weitere Untersuchungen notwendig.

F. Rath, D. Felicetti

BADANIE HISTOCHEMICZNE KWAŚNEJ FOSFATAZY AKTYWOWANEJ OCTANEM CYNKU I JEJ ZACHOWANIE SIĘ WE WĆZESNYCH OKRESACH ROZWOJU GUZÓW MÓZGU WYWOŁANYCH U SZCZURA DZIAŁANIEM ETYLO-NITROZO-MOCZNIKA

Streszczenie

Przedstawiono badanie histochemiczne kwaśnej fosfatazy, aktywowanej przez cynk i odpornej na działanie kwasu winowego, w glejowych mikroguzach mózgu wywołanych u szczurów działaniem etylnitrozo-mocznika. Proliferujące komórki oligodendrogleju nie wykazują obecności aktywowanej cynkiem fosfatazy, natomiast wysoką aktywność tego enzymu można wykazać histochemicznie w proliferujących astrocytach. Wyjątkowo rzadko obserwowano aktywność badanej fosfatazy w elementach komórkowych w przypadku okołonaczyniowego rozplemu. Stwierdzono ogniskowy wzrost aktywności badanego enzymu przed histologicznym ujawnieniem się zmian nowotworowych.

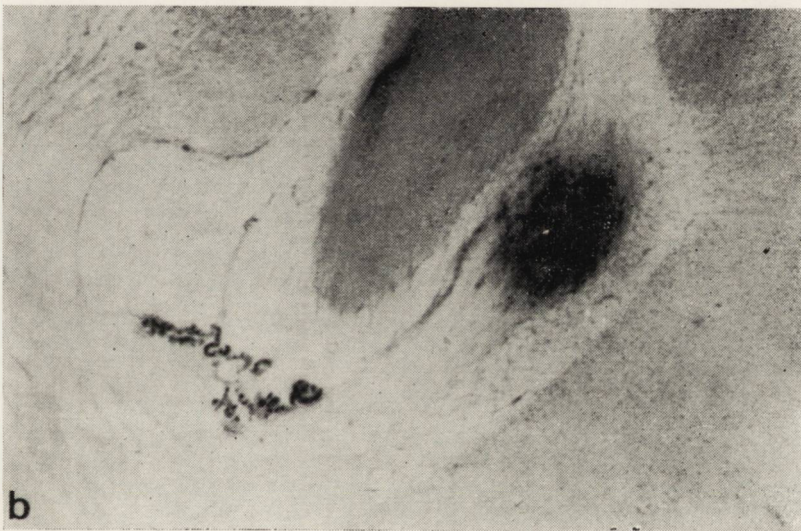


Abb. 1. a und b: Gemischtzelliges Gliom des Balkens. Ratte 545/2922. 26-fach; a. Gesamtaktivität der sauren Phosphatasen und b. ZT-SP-Aktivität.

Ryc. 1. a i b: glejak mieszanokomórkowy spoidła wielkiego. Szczur 545/2922. Pow. 26 ×; a. całkowita aktywność kwaśnej fosfatazy i b. aktywność kwaśnej fosfatazy aktywowanej octanem cynku

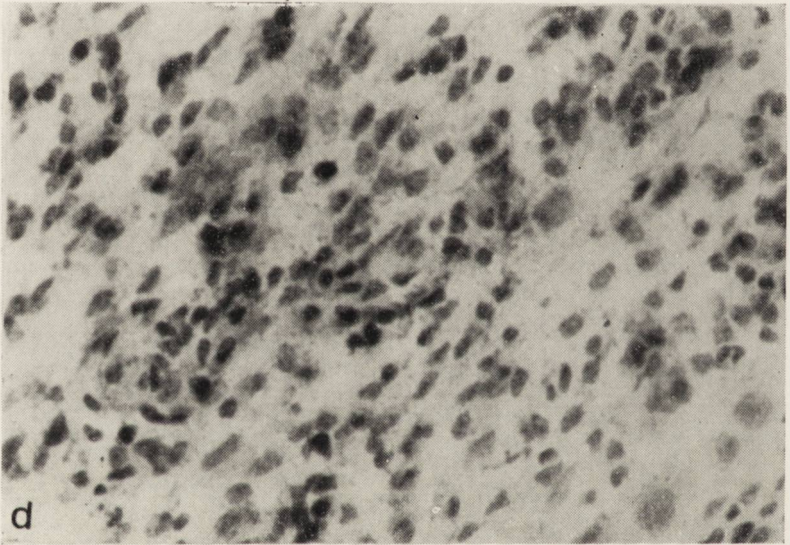
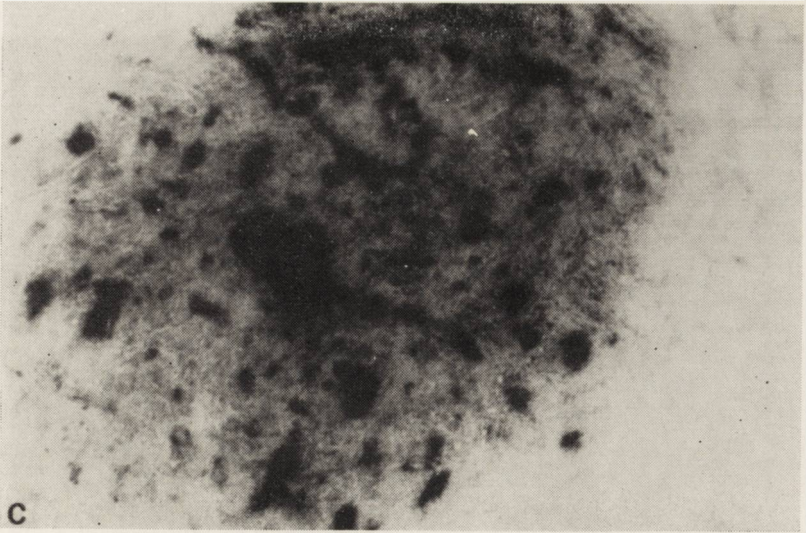


Abb. 1. c und d: Glioblastom. Ratte 545/2920; c. ZT-SP-Aktivität. 75-fach. d. Perivascularäre Zellproliferation des Tumors in c. Hämatoxylin-Eosin. 500-fach.

Ryc. 1. c i d: glioblastoma. Szczur 545/2920. c. aktywność kwaśnej fosfatazy aktywowanej octanem cynku. Pow. 75 × i d. okolonaczyniowy rozplem komórek guza. Pow. 500 ×.

Ф. Рат, Д. Фелицетти

ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КИСЛОЙ ФОСФАТАЗЫ,
АКТИВИРОВАННОЙ УКСУСНОКИСЛЫМ ЦИНКОМ,
НА РАННИХ СТАДИЯХ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА, ВЫЗВАННЫХ
У КРЫС ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЭТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНОЙ

Резюме

Представлены гистохимические исследования кислой фосфатазы, активированной цинком и устойчивой на действие винной кислоты, в глияльных микроопухолях мозга, вызванных экспериментально этилнитрозомочевинной. В пролиферирующих клетках олигодендроэпия не обнаруживалось активированной цинком кислой фосфатазы, в то же время этот фермент можно было гистохимически определить в пролиферирующих астроцитах. При оксососудистой гиперплазии клеточных элементов исключительно редко можно было наблюдать активность исследуемой фосфатазы. Очаговые увеличения активности исследуемого фермента наблюдались до гистологического проявления опухолевых изменений.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Barka T., Anderson P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 1962, 10, 741—753.
2. Felicetti D., Rath F. W. (a): Zum Vorkommen und zur Isolierung einer durch Zink stark aktivierbaren sauren Phosphatase im Grosshirn der Ratte. *Acta histochem. (Jena)*. Im Druck.
3. Felicetti D., Rath F. W. (b): Zu einer durch Zink stark aktivierbaren sauren Phosphatase im Rattengehirn und ihrer histochemischen Darstellung in experimentellen Hirntumoren der Ratte. *Sympos. „Experimentelle Geschwülste des Nervensystems“ Ges. Neuropath. DDR, Halle/S., Sept. 1973. Wiss. Z. Univ. Halle.* Im Druck
4. Rath F. W., Felicetti D.: Histochemische Darstellung einer durch Zink aktivierten tartratresistenten sauren Phosphatase in experimentell induzierten gliösen Mikrotumoren des Rattengrosshirns. *Acta histochem. (Jena)*. Im Druck.

Anschrift des Verfassers: Pathologisches Institut der Martin-Luther-Universität, DDR — 402 Halle (Saale), Leninallee 14.

D. HEINRICH, W. MÜLLER, CH. M. HEINRICH, R. FISCHER

VORKOMMEN UND HÄUFIGKEIT LEUKÄMISCHER KNÖTCHEN (LEUKEMIC NODULES) IM GEHIRN

Pathologisches Institut der Universität zu Köln
Direktor: Prof. Dr. med. R. Fischer

Ein Mitbefall des Zentralnervensystems im Rahmen leukämischer Erkrankungen in Form von meningealen und intracerebralen Infiltraten ist lange bekannt. Eine besondere Manifestation stellen die leukämischen Knötchen, die sog. Leukemic nodules, dar. Auf den ersten Blick erscheinen sie wie Infiltrate, die bekanntlich perivascular liegen und sich nur gelegentlich bis in die Hirnsubstanz selbst erstrecken. Somit stellen leukämische Knötchen eine unterschiedlich ausgeprägte Ansammlung leukämischer Zellen bevorzugt in der weissen Substanz des Gehirnes dar, in deren Bereich allenfalls einzelne Erythrocyten liegen und eine Gefässwand — zumindest in der HE-Färbung — nicht erkennbar ist (Abb. 1). Häufig sind die Leukemic nodules jedoch von einem hämorrhagischen Randsaum umgeben. Durch Konfluenz solcher Herde können ausgedehnte Blutungen entstehen. Gelegentlich kann es schwierig sein, derartige Veränderungen von Blutungen mit Entmischungsercheinungen der weissen Blutzellen zu unterscheiden.

Typisch für die leukämischen Knötchen ist ihr Sitz in der weissen Substanz des Hirnes, wo sie makroskopisch häufig als zierstecknadelkopfgrosse, gräuliche Herdchen erscheinen, so dass sie im anglo-amerikanischen Schrifttum auch als „gray nodules“ bezeichnet werden. Kommt es jedoch zu Blutaustritten um die Knötchen mit Konfluenz der einzelnen Herde, kann die graue Substanz mitbetroffen sein. Makroskopisch können derartige Herde als Massenblutungen imponieren (Abb. 2). Betrachtet man aber ein solches Präparat genauer, so erkennt man neben den ausgedehnten Blutungen, die Mark und Rinde betreffen, immer wieder blutig imbibierte Bezirke, die ausschliesslich in der weissen Substanz liegen (Abb. 3). Bei einem solchen Befund sollte man bei entsprechenden Grundkrankheiten bereits makroskopisch den Verdacht auf das Vorliegen von leukämischen Knötchen stellen.

In unserem Sektionsgut fanden sich in den Jahren 1965 bis 1973 106 Fälle mit Leukosen unterschiedlicher Art (Tab. 1). Unter diesen waren in 11 Fällen leukämische Knötchen vorhanden; in 8 Fällen lag eine unreifzellige myeloische und in 3 Fällen eine chronische myeloische Leukämie vor.

Tabelle 1. Aufschlüsselung der untersuchten 106 Fälle nach Grundkrankheit und nach Auftreten von leukämischen Knötchen (Leukemic nodules)

Tabela 1. Zestawienie 106 przebadanych przypadków wg rozpoznań z uwzględnieniem częstości występowania grudek białaczkowych (Leukemic nodules)

Grundkrankheit Schorzenie podstawowe	Zahl der Fälle Liczba przypadków	Fälle mit leukemic nodules Przypadki z grudkami białaczkowymi
Unreife myeloische Leukämie Białaczka szpikowa niedojrzałokomórkowa	60	8
Promyelocytenleukämie Białaczka promielocytarna	5	
Monocytenleukämie Białaczka monocytarna	3	
Erythramie Czerwienica	1	
Lymphoblastenleukämie Białaczka limfoblastyczna	1	
Plasmazell-Leukämie Białaczka plazmocytna	1	
Stammzell-Leukämie Białaczka z kom. podstawowych	1	
Chron. myeloische Leukämie Przewlekła białaczka szpik.	16	3
Chron. myeloische Leukämie mit Blastenschub Przewlekła białaczka szpik. z rzutem blastoma- tycznym	3	
Chron. lymphatische Leukämie Przewlekła białaczka limfat.	15	
Gesamt Razem	106	11

Die formale Genese der leukämischen Knötchen ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Leidler u. Russel wiesen bereits 1945 auf die Bedeutung der Leukostase bei Fällen mit Leucemic nodules hin. Unter einer Leukostase versteht man bekanntlich eine Ansammlung leukämischer Blutzellen in dilatierten, dünnwandigen Gefäßen, zwischen denen keine oder nur wenige Erythrocyten liegen. Eine derartige Leukostase konnte bei den 106 Fällen mit Leukosen 18 mal gefunden werden. Bei unseren 11 Patienten mit Leucemic nodules fand sich bei 10 gleichzeitig eine Leukostase. Nur in einem Falle wurde sie also vermisst. Nach Groch et al. (1954) soll es im Rahmen einer Leukostase zum Austritt einer Permeabilitätsstörung der Gefäßwand mit Austritt einer eiweißreichen Flüssigkeit in das perivaskuläre Gewebe mit

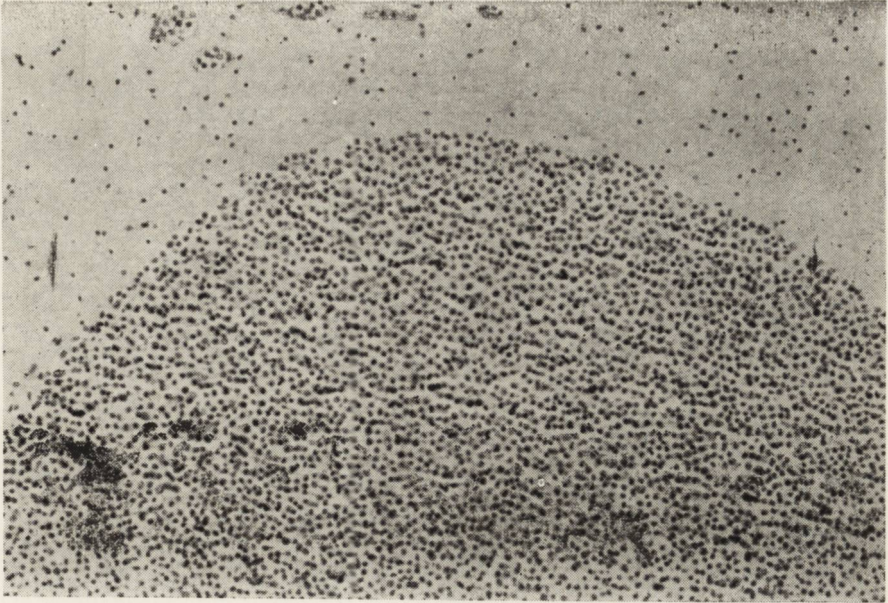


Abb. 1. Randgebiet eines leukämischen Knötchens mit scharfer Abgrenzung gegen das Hirnparenchym. HE-Färbung. Vergr. 140 ×.

Ryc. 1. Otoczenie grudki białaczkowej ostro odgraniczonej od tkanki mózgowej. H.-E. Pow. 140 ×.

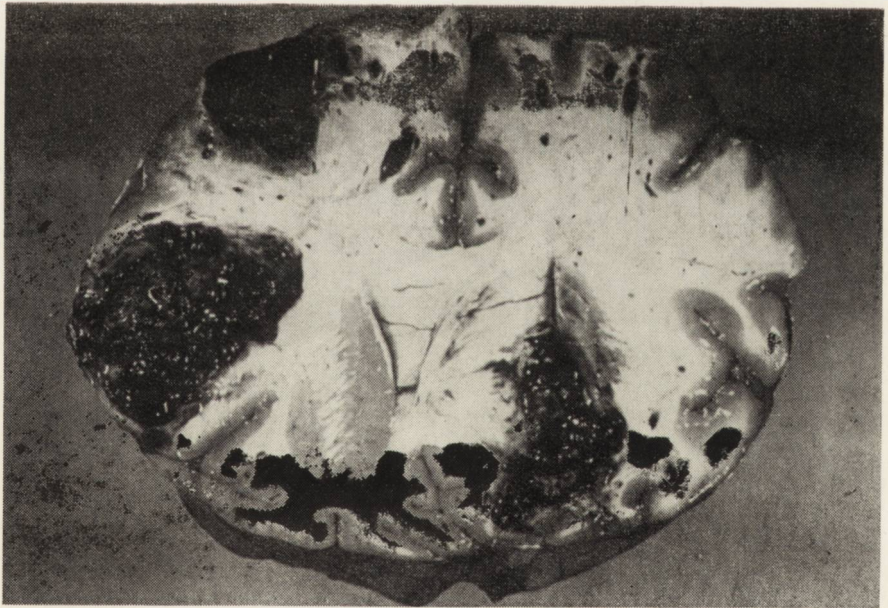


Abb. 2. Durch Konfluenz leukämischer Knötchen sind grosse Massenblutungs-ähnliche Herde entstanden.

Ryc. 2. W następstwie zlewania się grudek białaczkowych powstają ogniska podobne do dużych krwotoków śródmiaższowych.



Abb. 3. In der weissen Substanz lokalisierte, teils blutig imbibierte „Leukemic nodules“
Ryc. 3. Zlokalizowane w istocie białej grudki białaczkowe, częściowo ukrwotocznione.

anschliessender Diapedese leukämischer Zellen kommen. Durch Proliferation dieser Zellen, die zunächst auf die Virchow-Robin'schen Räume beschränkt ist, resultiert eine Grössenzunahme der Herde mit Kompression benachbarter Kapillaren. Diese Kompression wird für das Auftreten der Blutungen in die Umgebung leukämischer Knötchen verantwortlich gemacht.

Freireich et al. (1960) halten wie Groch u. Mitarb. (1954) die Leukostase ebenfalls für den entscheidenden Faktor in der Genese der Leucemic nodules. Allerdings stellt nach Freireich et al. (1960) nicht die Permeabilitätsstörung, sondern die aktive intravasale Proliferation leukämischer Zellen innerhalb der durch Leukostase verschlossenen Gefässe die wesentliche Ursache dar. Durch diesen Mechanismus soll es zur Zerstörung der Gefässwand mit Ausbildung der Leucemic nodules kommen.

Während früher bereits ein Zusammenhang zwischen Leukostase und leukämischen Knötchen vermutet wurde, untersuchte die Arbeitsgruppe um Thomas (Fritz et al. 1959) erstmals die Abhängigkeit der Höhe der peripheren Leukocytenzahl vom Auftreten einer Leukostase bzw. den leukämischen Knötchen. Bei peripheren Leukocytenzahlen über 300 000/mm³ fanden sie sowohl Leukostase als auch Leucemic nodules, bei Werten zwischen 200 000 und 300 000/mm³ immer Leukostase und selten Leucemic nodules, bei Werten zwischen 100 000 und 200 000/mm³ selten Leukostase und keine Leucemic nodules und bei Werten unter 50 000/mm³ weder Leukostase noch Leucemic nodules. Neben der absoluten Höhe der peripheren Leukocytenzahl ist nach Freireich et al. (1960) vor allem der Anteil an Blasten entscheidend. Unabhängig von der Zellzahl sind unreife Vorstufen weisser Blutzellen grösser als die reiferen Formen und erhöhen insofern die Blutviskosität stärker als die letzt genannten Formen. Desweiteren haben unreife und reife myeloische Zellen ein grösseres Volumen als vergleichbare Zellen der lymphatischen Reihe, so dass das Auftreten leukämischer Knötchen bei lymphatischen Leukämien seltener beschrieben wurde (Phair et al. 1964). Dem entsprechen unsere Beobachtungen insofern, als dass Leucemic nodules ausschliesslich bei Patienten mit myeloischen Leukämien gefunden wurden.

Welche der oben genannten Theorien über die formale Genese der leukämischen Knötchen zutrifft, lässt sich aus unserem Material nicht eindeutig beantworten. Wie erwähnt, wurde bei einem der 11 Fälle mit leukämischen Knötchen keine Leukostase beobachtet. Möglicherweise scheint die Leukostase nicht die unabdingbare Voraussetzung für das Auftreten der Knötchen zu sein.

Obwohl die leukämischen Knötchen nur eine besondere Manifestation der Grundkrankheit darstellen, können sie durch ihre Lokalisation und durch ihre Neigung zur Ausbildung ausgedehnter Blutungen eine lebensbedrohliche Komplikation ausmachen. Die klinische Verdachtsdiagnose kann gestellt werden, wenn bei hohen peripheren Leukocytenzahlen plötzlich cerebrale Symptome auftreten. Eine Sicherung der Diagnose ist freilich nur nach Autopsie des Gehirnes möglich.

D. Heinrich, W., Müller. C. M., Heinrich, R. Fischer

WYSTĘPOWANIE I CZĘSTOTLIWOŚĆ GRUDEK BIAŁACZKOWYCH

Streszczenie

Pod pojęciem grudek białaczkowych rozumie się różnie obfite skupienia komórek białaczkowych, przede wszystkim w istocie białej mózgu, w obrębie których elementy strukturalne ściany naczyniowej są niewidoczne. Grudki te otoczone są często brzeżnym rąbkim krwotocznym. Zlewanie się tych ognisk może prowadzić do powstania rozległych wynaczynień o charakterze masywnych krwotoków.

Wśród 106 przypadków reprezentujących różne postaci białaczek w 11, ujawniono obecność grudek białaczkowych. Były to wyłącznie przypadki dojrzało- i niedojrzałokomórkowych białaczek szpikowych.

Dyskutując różne możliwości patogenetyczne autorzy przypisują główną rolę w powstawaniu grudek białaczkowych zastojowi leukocytnemu. Za taką interpretacją przemawia również fakt występowania grudek białaczkowych u pacjentów z wybitnie zwiększoną ilością leukocytów we krwi obwodowej.

Д. Хайнрих, В. Мюллер, Х. М. Хайнрих, Р. Фишер

НАЛИЧИЕ И ЧАСТОТА ЛЕЙКЕМИЧЕСКИХ ГЛЫБОК

Резюме

Под понятием лейкемических глыбок подразумевается в различной степени обильные скопления лейкемических клеток, прежде всего в белом веществе мозга, в пределах которых структурные элементы сосудистой стенки невидимы. Эти глыбки окружены часто кровоточивым ободком. Слияние этих очагов может привести к возникновению обширных кровоизлияний, носящих характер массивных кровотечения.

Среди 106 случаев, представляющих различные виды лейкемии, в 11 было обнаружено присутствие лейкемических глыбок. Это исключительно были случаи зрело- и незрелоклеточной миелоидной лейкемии.

Обсуждая различные патогенетические возможности авторы приписывают главную роль в возникновении лейкемических глыбок лейкоцитарному застою. В пользу такой интерпретации говорит также факт, что лейкемические глыбки выступают у пациентов с исключительно увеличенным числом лейкоцитов в периферической крови.

LITERATUR

1. Freireich E. H., Thomas L. B., Frei E., Fritz R. D., Forkner C. E. jr.: A distinctive type of intracranial hemorrhage associated with „blastic crisis” in patients with leukemia. *Cancer* 1960, 13, 146—154.
2. Fritz R. D., Forkner C. E. jr., Freireich E. J., Frei E., Thomas L. B.: The association of fatal intracranial hemorrhage and „blastic crisis” in patients with acute leukemia. *New Engl. J. Med.* 1959, 261, 59—64
3. Groch S. N., Sayre G. P. Heck F. J.: Cerebral hemorrhage in leukemia. *Arch. Neurol.* 1954, 2, 439—451.
4. Leidler F., Russel W. C.: The brain and leukemia. A clinicopathologic study of twenty cases with a review of the literature. *Arch. Path.* 1945, 40, 14—33.
5. Phair J. P., Anderson R. E., Namiki H.: The central nervous system in leukemia. *Amer. Intern. Med.* 1964, 61, 863—875.

Anschrift der Verfasser: Pathologisches Institut der Universität, Joseph-Stelzmann-Str. 9 D-5000 Köln 41

F. MATAKAS, J. CUYPERS, J. CERVÓS-NAVARRO

DISTURBANCES OF CEREBRAL MICROCIRCULATION AFTER CEREBRAL ISCHEMIA

Department of Neuropathology, Klinikum Steglitz, Freie Universität Berlin, GRF

Since the work of Ames et al. (1968) it has been known that after cerebral ischemia wide areas of the brain are not perfused with blood. Ultrastructural examination of these areas revealed narrowing and obstruction of capillaries (Chiang et al., 1968, Hills 1964). The following experiments were undertaken to examine how the capillary lesions develop and whether they are influenced by postischemic conditions. If it is true that nerve cells survive anoxia of much more than 10 minutes (Hossmann, Olsson 1970), it is of eminent importance to know how to avoid postischemic disturbances of the cerebral microcirculation.

MATERIAL AND METHODS

12 adult cats and 6 baboons were anesthetised with pentobarbital (35 mg/kg i.m.), relaxed, intubated, and artificially ventilated. Arterial and epidural pressure, EEG, ECG and body temperature were constantly recorded. Blood gases were checked regularly. For CBF-measurements the Xenon clearance technique was used. If the animals survived more than 3 hours water and electrolytes were balanced. For producing cerebral ischemia the brachiocephalic trunk and the left subclavian artery were clamped for 20 minutes in the cats. In the baboons cerebral ischemia was produced for 20 min by inflating an epidural balloon until epidural pressure equalled systemic arterial pressure. Mean arterial blood pressure during ischemia was reduced to 70 to 80 mm Hg by intravenous Arfonad. After ischemia blood pressure in the first group of 12 animals was not influenced unless it did not drop to less than 80 mm Hg. 6 animals were sacrificed 1 hour after ischemia. 3 animals survived 3 to 6 hours, and 3 animals 12 to 48 hours. In the second group of 6 animals, which were all killed after 1 hour, blood pressure was elevated to 180—200 mm Hg for at least 10 minutes and was then allowed to fall to values not lower than 100 mm Hg. 50 ml of carbon suspension were quickly injected into the inferior vena cava of all animals before they were killed.

Immediately after the animals' death tissue samples of the parietal lobe including

gray and white matter were removed for electron microscopy. In 4 control animals a carbon suspension was injected without previous impairment of cerebral circulation.

RESULTS

During ischemia the EEG became isoelectric within 15 seconds. The blood pressure first rose and tended to fall to subnormal values after ca. 5 minutes.

In the first group of animals the blood pressure of which was maintained at a level of 80—120 mm Hg epidural pressure rose and reduced intracranial perfusion pressure considerably. CBF measurements showed no postischemic hyperemia, but a gradually decreasing blood flow. Potassium in the blood serum decreased. After 6 hours polyuria (300—500 ml/24 hours in cats) developed. Perfusion of the brain with colloidal carbon 1 hour after ischemia showed that wide areas of the cerebrum were not perfused (Fig. 1). The extension of the no-reflow phenomenon was correlated to the duration of the postischemic period. After 12 hours the whole brain was not perfused. Ultrastructural examination revealed brain edema and moderate endothelial swelling in capillaries and venules (Fig. 2). The degree of brain edema and vascular lesions increased with the duration of the postischemic period. After 6 hours many capillaries were obstructed by endothelial swelling or blebs.

In the second group of animals in which the blood pressure was raised to high values only slight intracranial pressure developed. There was extreme hyperemia (200—300%) as long as arterial hypertension lasted. CBF diminished to normal values when the blood pressure fell to its initial value. Potassium in the blood and urine production were normal. Perfusion of the brain with carbon suspension showed no or only minor defects 1 hour after ischemia. Ultrastructural analysis revealed only mild brain edema. Endothelial swelling was observed only in a few capillaries.

COMMENT

If brain edema is so severe that it produces intracranial pressure approaching mean arterial pressure, complete breakdown of the cerebral circulation and brain death occur (Zaren et al., 1970). It was evident from the physiological and morphological findings that the first group of animals developed brain death (Matakas et al., 1975, Schneider et al., 1969). The circulatory arrest in brain death is caused by various mechanisms. While the first cause may be compression of intracranial veins and thus reduction of perfusion pressure, later all capillaries are obstructed by endothelial swelling. The results of our experiments demonstrate that capillary changes after ischemia increase in number and degree with duration of postischemic brain edema.

The fact that all animals with a considerable no-reflow phenomenon had developed intracranial hypertension and showed no capillary obstruction before 1 hour after ischemia indicates that capillary changes are of secondary nature. In our case they

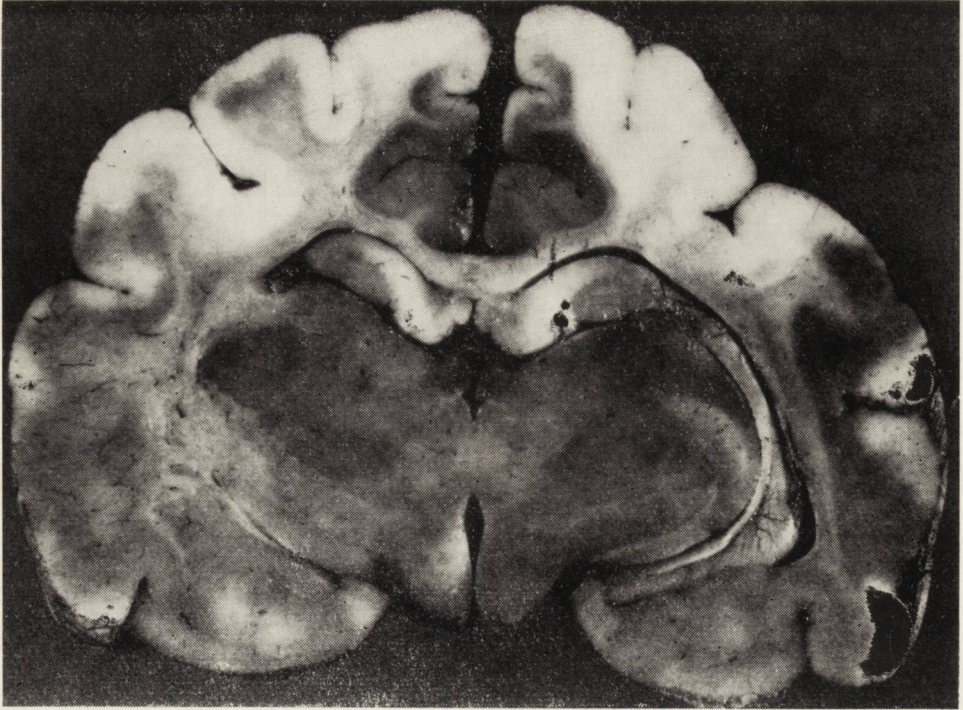


Fig. 1. Cat group 1. One hour recirculation after ischemia. Perfusion defects in the superior gyri.

Ryc. 1. Kot z grupy 1. Jedna godzina recyrkulacji po ischemii. Brak perfuzji w górnych zawojach.

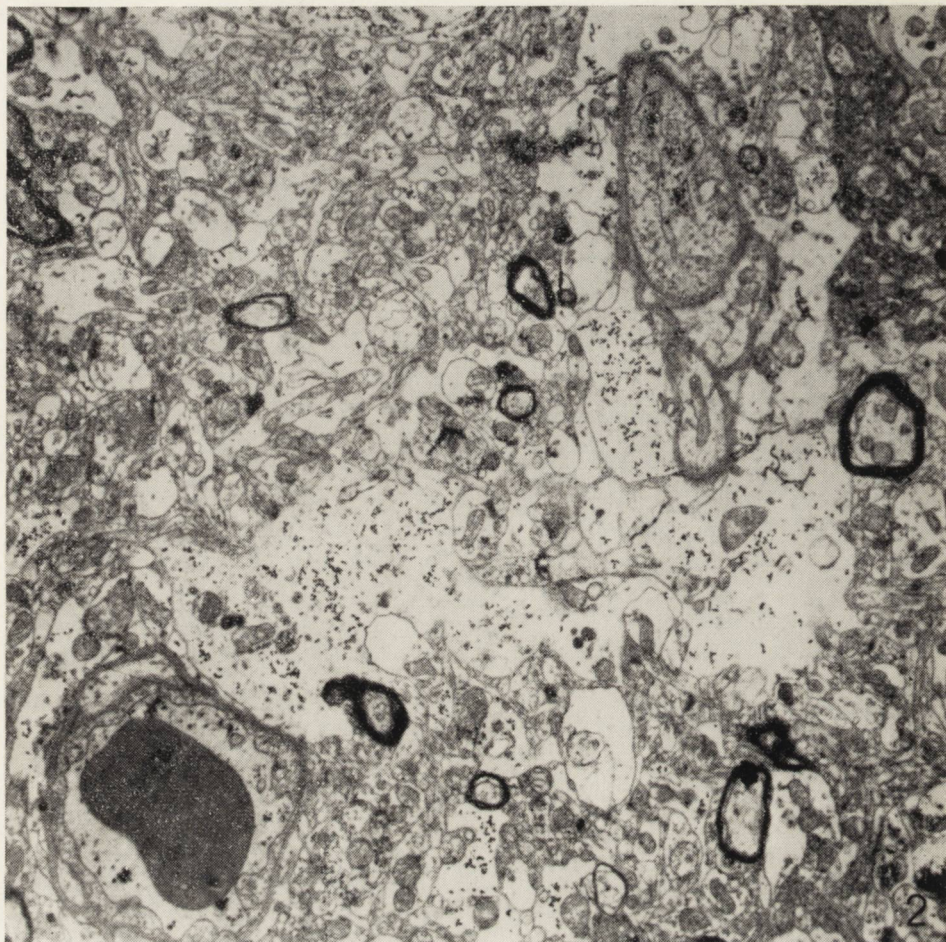


Fig. 2. Cat group 1. 6 hours after ischemia. Two capillaries. Both capillaries contain carbon particles within the lumen. The endothelium of one capillary is swollen and obstructs the lumen. The second capillary is normal. Moderate edema of astrocytes. $\times 3000$.

Ryc. 2. Kot z grupy 1. Sześć godzin po ischemii. Dwa naczynia włosowate. W świetle obu tych włosniczek znajdują się cząsteczki węgla. Śródbłonki jednej włosniczki obrzękłe, zwężają światło. Druga włosniczka prawidłowa. Mierny obrzęk astrocytów. Pow. $3000 \times$.

seemed to be the result rather than the cause of circulatory arrest. Capillary obstruction was observed later than incomplete perfusion. The non-perfused areas were large and must have been caused by obstruction of large vessels, possibly veins. Thus, it seems that the no-reflow phenomenon is enhanced by hindrance of venous drainage which occurs in intracranial hypertension (Hekmatpanah, 1970).

In our second series of experiments a slight no-reflow phenomenon was observed only occasionally. The animals showed no signs of brain death. Brain edema and intracranial pressure were only moderate. Instead, there was significant hyperemia obviously caused by arterial hypertension and postischemic vasoparalysis (Langfitt et al., 1965). Since in these cases, in contrast to the first series, neither severe brain edema nor a significant no-reflow phenomenon developed within the first hour after ischemia we may conclude that both phenomena are closely related to each other. Moreover, postischemic hypertension did not enhance the development of brain edema in our cases as has been reported by several authors (Marshall et al., 1969, Zaren et al., 1970).

F. Matakas, J. Cuypers, J. Cervós-Navarro

ZABURZENIA MIKROKRAŻENIA MÓZGOWEGO PO NIEDOKRWIENIU MÓZGU

Streszczenie

Badano w okresie poniedokrwiennym zachowanie się układu mikrokrążenia oraz przepływ mózgowy u kotów i pawianów. Niedokrwienie mózgu u kotów uzyskiwano zamykając na okres 20 minut pień ramiennie-głowy i tętnicę podobojczykową lewą, u pawianów — przez ucisk balonika umieszczonego nadtwardówkowo, wypełnianego do momentu wyrównania poziomów ciśnienia wewnątrzczaszkowego i tętniczego ciśnienia układowego. Zmiany mózgowego przepływu krwi kształtowały się różnie w obu modelach doświadczalnych a nasilenie i rozległość zmian we włóscinkach były zależne od obrzęku mózgu, który powstał w okresie po niedokrwieniu.

Ф. Матакас, Я. Куиперс, Х. Сервос-Наварро

НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОЙ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ ПОСЛЕ ИСХЕМИИ МОЗГА

Резюме

Исследование состояния системы микроциркуляции и мозговой кровотока у кошек и павианов в постисхемический период.

Исхемию мозга получали у кошек перекрытием левой подключичной артерии на 20 минут, а у павианов посредством давления эпидурально помещенного пузырька, наполняемого до момента выравнивания уровней внутрочерепного и артериального давления. Изменения мозгового кровотока проявлялись в этих двух экспериментальных моделях неодинаково, а распространенность нарушений в капиллярах зависела от отека мозга, развившегося в постисхемический период.

REFERENCES

1. Ames A., Wright L., Kowada M., Thurston J. M., Majno G.: Cerebral Ischemia. II. The no-Reflow Phenomenon. *Am. J. Pathol.* 1968, 52, 437—453.
2. Chiang J., Kowada M., Ames A., Wright R. L., Majno G.: Cerebral Ischemia. III. Vascular Changes. *Am. J. Pathol.* 1968, 52, 455—476.
3. Hekmatpanah J.: Cerebral circulation and perfusion in experimental increased intracranial pressure. *J. Neurosurg.* 1970, 32, 21—29.
4. Hills C. P.: Ultrastructural changes in the capillary bed of the rat cerebral cortex in anoxic-ischemic brain lesions. *Am. J. Pathol.* 1964, 44, 531—551.
5. Hossmann K. A., Olsson Y.: Suppression and recovery of neuronal function in transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 1970, 22, 313—325.
6. Langfitt T. W., Weinstein J. D., Kassell N. F.: Cerebral vasomotor paralysis produced by intracranial hypertension. *Neurology (Minneapolis)* 1965, 15, 622—641.
7. Marshall W. J. S., Jackson J. L. F., Langfitt T. W.: Brain swelling caused by trauma and arterial hypertension: Hemodynamic aspects. *Arch. Neurol.* 1969, 21, 545—553.
8. Matakas F., Cervós-Navarro J., Schneider N.: Experimental brain death. I. Morphology and fine structure of the brain. *J. Neurol., Neurosurg. Psychiatr.* 1973, 36, 497—508.
9. Schneider H., Masshoff W., Neuhaus G. A.: Klinische und morphologische Aspekte des Hirntodes. *Klin. Wschr.* 1969, 47, 844—859.
10. Zaren H. A., Weinstein J. D., Langfitt T. W.: Experimental brain swelling. *J. Neurosurg.* 1970, 32, 227—235.

Authors address: Priv. Doz. Dr. F. Matakas, Klinikum Steglitz, 1 Berlin 45, Hindenburgdamm 30.

H. KROH

PERIVASCULAR CALCIFICATIONS IN THE MOUSE BRAIN

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

Head: Prof. Dr. M. J. Mossakowski

Ageing domestic and some laboratory animals sometimes exhibit perivascular deposits of calcareous compounds (Frauchiger, Fankhauser, 1957). In horses over six years old, calcium-iron deposits were found in the globus pallidus, internal capsule and caudate nucleus. Perivascular calcifications have been observed in the wild hare brain (Bürgisser et al., 1959). Several authors have pointed out the similar localization of calcifications in animal and human brains.

As yet, no mineral deposits have been observed in the brain of the normal mouse, rat and guinea pig (Innes, Saunders, 1962). This can be ascribed partly to the unfrequent use of old laboratory animals for routine experimental investigations.

The calcifications described in this work were observed accidentally in the brains of mice used in various experiments. Because of repeated findings it was decided to determine the frequency of this phenomenon, the topography and composition of the deposits.

MATERIAL AND METHODS

Altogether 455 mouse brains without cerebella were investigated. The following strains were used: C3H (289 mice), R III (140 mice), DBA (13 mice) and Swiss (13 mice).

The material was divided into four groups. **Group I** consisted of 208 mice which after intracerebral implantation of a methylcholanthrene pellet at 8 weeks of age did not show any morphological signs of neoplastic process after 9 to 149 weeks. **Group II** consisted of 182 mouse brains with methylcholanthrene-induced gliomas and gliosarcomas at various stages of development; these were examined at an age from 20 to 129 weeks. **Group III** consisted of 30 mouse brains after cerebral implantation of graphite; these were examined between the 9th and 59th week. **Group IV** consisted of 35 healthy mouse brains collected at the age from 9 to 135 weeks.

The formol-fixed paraffin material was, if possible, cut serially. The sections were stained with H-E, cresyl violet, toluidine blue, according to the method of van Gieson, Perls, Turnbull, Kossa, with Alizarin red, Schiff's reagent, Astra blue, Alcian blue, Sudan black B.

RESULTS

The frequency of deposits depending on age is presented in Table 1. The frequency of deposits depending on age in particular strains of mice is shown in Table 2 and further according to the character of brain involvement in Table 3. The appearance of deposits was the same in all the experimental groups. In no case was any cellular reaction accompanying the deposits observed.

As a rule, the deposits were localized perivascularly. Sometimes they were connected with the capillary wall lying intraparietally or protruding into the lumen (Fig. 1). Mostly they had the appearance of separate calculi, less frequently they formed grape-like perivascular conglomerates (Fig. 2). The concretions were composed of concentric layers differing by their staining properties. Often the central part of the deposit formed a well-defined core (Figs 1, 4, 7). The arrangement in concentric layers was revealed both by histological and histochemical methods (Figs 3, 4).

Staining according to Kossa method was positive in all the deposits observed but differed in respect of reaction intensity from circular blackening of the peripheral and internal layers separated by lighter zones to complete blackening of the whole concretion (Fig. 5). Staining with Alizarin red revealed the deposits as being of non-uniform orange colour and showing distinct layers of various intensity.

Almost all the deposits exhibited a distinct PAS-positive reaction, whereas the staining with Astra blue and Alcian blue presented the deposits as built of many alternate zones of different intensity (Fig. 6).

Both the reactions for iron in the concretions were negative.

Fig. 1. Multiple perivascular and intravascular calcifications. Uneven staining of individual layers. Group I, 68th week of life. H-E. $\times 200$.

Ryc. 1. Mnogie zwapnienia przynaczyniowe i śródnaczyniowe. Nierównomierne wysycenie barwnikiem poszczególnych warstw. Grupa I, 68 tydzień życia. H-E. Pow. $200 \times$.

Fig. 2. Multiple perivascular calcifications. A deposit in the course of formation is visible among other well-defined calcifications. Group IV, 89th week of life. H-E. $\times 400$.

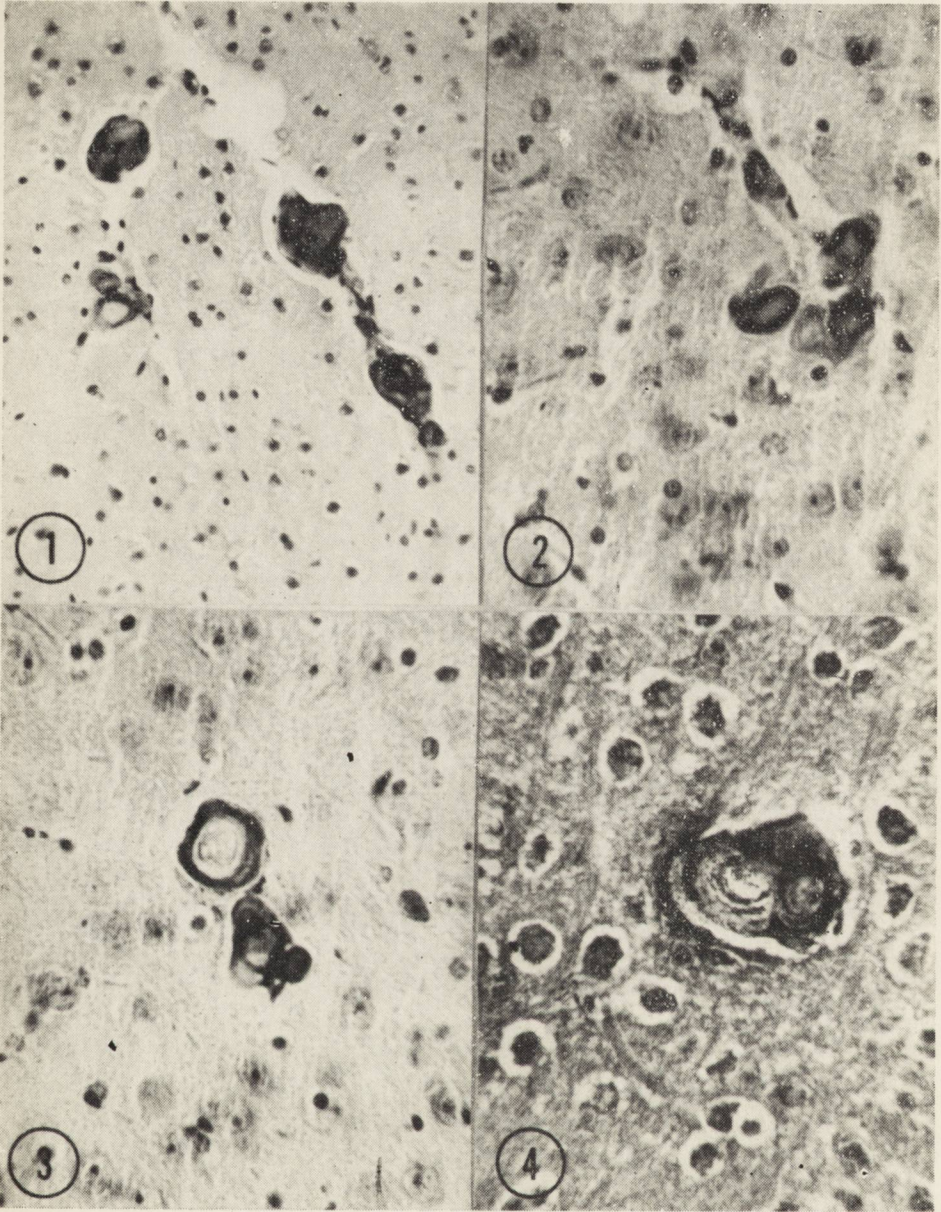
Ryc. 2. Mnogie zwapnienia przynaczyniowe. Pomiedzy złoгами wysyconymi widoczny jeden słabo zaznaczony. Grupa IV, 89 tydzień życia. H-E. Pow. $400 \times$.

Fig. 3. Deposits with concentrically arranged layers of variable stain affinity. Morphotic remains are visible in the centre of the calcifications. Group IV, 64th week of life. H-E. $\times 400$.

Ryc. 3. Złogi o układzie koncentrycznym, o różnej barwliwości. W centrum złożeń resztki elementów morfotycznych. Grupa IV, 64 tydzień życia. H-E. Pow. $400 \times$.

Fig. 4. Circular structure of calcium deposits. Group I, 103rd week of life. Kossa meth. $\times 400$.

Ryc. 4. Obrączkowy, warstwowy układ złożeń wapnia. Grupa I, 103 tydzień życia. Kossa. Pow. $400 \times$.



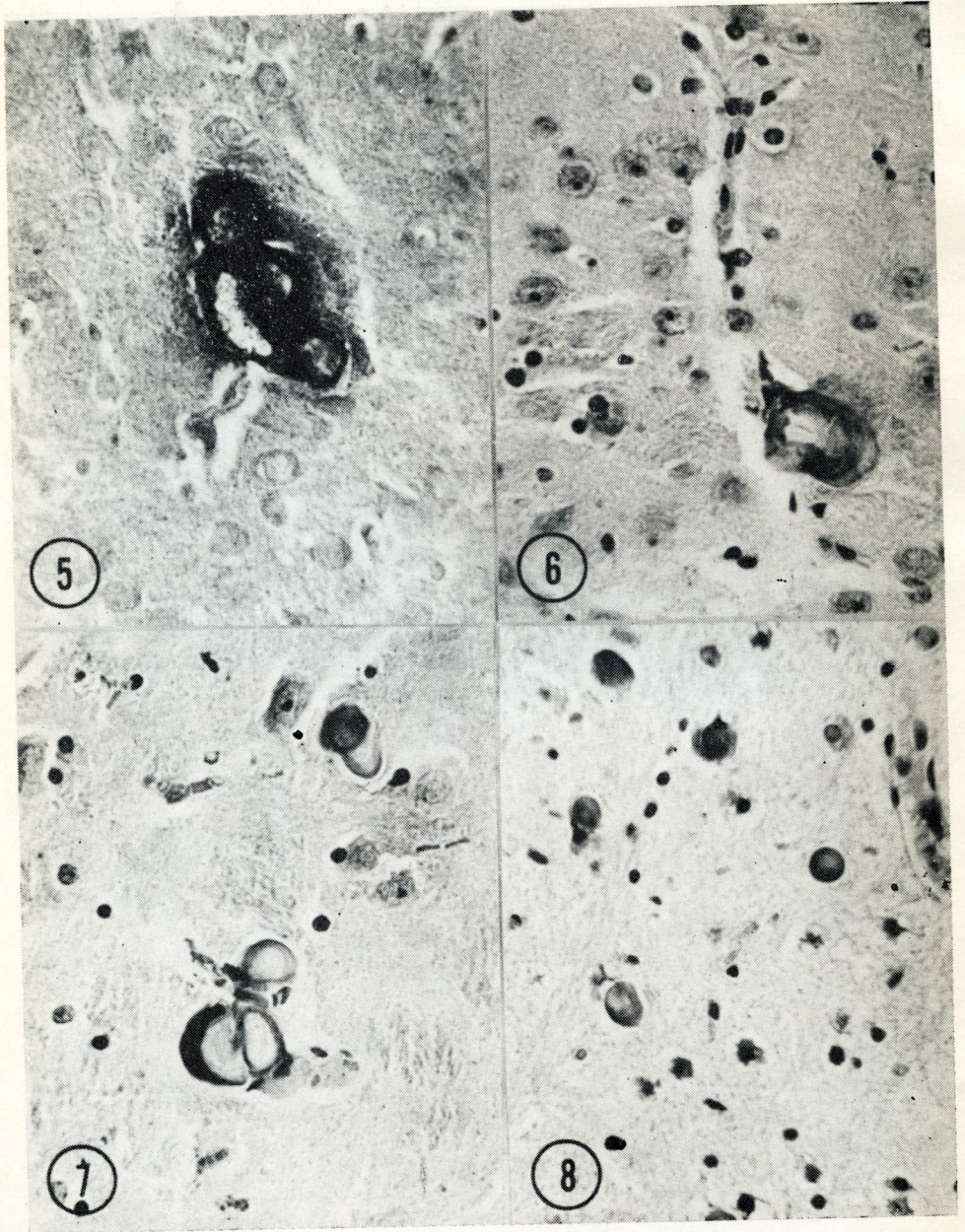


Table 1. Incidence of deposits depending on age of mice
 Tabela 1. Częstość występowania złogów w zależności od wieku myszy

Weeks of life Tygodnie życia	Groups: I, II, III (experimental) Grupy: I, II, III (doświadczalne)	Group IV (normal) Grupa IV (norma)
9—19	0/53+)	0/1
20—29	2/61	0/8
30—39	6/69	0/3
40—49	7/80	2/5
50—59	7/61	3/5
60—69	7/40	2/4
70—79	2/16	1/2
80—89	7/16	3/3
90—99	2/7	—
100—109	4/11	3/3
110—119	0/1	—
120—129	2/2	—
130—139	1/2	1/1
140—149	1/1	—

+) Ratio of brains with deposits to total number of brains examined
 Stosunek liczby mózgow z złogami do liczby mózgow zbadanych

Staining with Sudan black B did not show the reaction with the deposits.

Usually the deposits occurred multifocally (Fig. 7). Sometimes they were present at several points of a single section, and sometimes there were single deposits on several sections. In about one third of all the cases examined, concretions were localized almost symmetrically in both hemispheres.

All the concretions were confined to the thalamus and in no case were they found outside that structure. The majority was present in the dorso-medial part of nucleus

Fig. 5. Heavily impregnated perivascular calcification. Group IV, 87th week of life. Kossa meth. $\times 400$.

Ryc. 5. Silnie wysycone zwapnienie przynaczyniowe. Grupa IV, 87 tydzień życia. Kossa. Pow. $400 \times$.

Fig. 6. Concentric formation of perivascular calcifications. Group IV, 87th week of life. PAS. $\times 400$.

Ryc. 6. Koncentryczny układ złogów przynaczyniowych. Grupa IV, 87 tydzień życia. PAS. Pow. $400 \times$.

Fig. 7. Multiple perivascular and intravascular calcifications. The cellular nucleus is the center of the deposit. Group I, 59th week of life. H-E. $\times 400$.

Ryc. 7. Mnogie zwapnienia śród- i przynaczyniowe o różnych stopniach wysycenia. Jądro komórki stanowi centrum osadzonych złogów. Grupa I, 59 tydzień życia. H-E. Pow. $400 \times$.

Fig. 8. Multiple cellular calcifications. Group I, 36th week of life. H-E. $\times 400$.

Ryc. 8. Mnogie warstwowe zwapnienia komórkowe. Grupa I, 36 tydzień życia. H-E. Pow. $400 \times$.

Table 2. Incidence of deposits depending on age in particular mouse strains

Tabela 2. Częstość występowania złogów w zależności od wieku w badanych szczepach zwierząt

Weeks of life Tygodnie życia	Groups: I, II, III (experimental) Grupy: I, II, III (doświadczalne)			Group IV (normal) Grupa IV (norma)		
	Strain: Szczep: C3H	R III	DBA	Strain: Szczep: C3H	DBA	Swiss
9—19	0/12 ⁺	0/41	—	—	—	0/1
20—29	2/30	0/31	—	—	0/4	0/4
30—39	6/53	0/16	—	—	—	0/3
40—49	6/47	1/28	0/5	—	—	2/5
50—59	6/38	1/19	0/4	3/5	—	—
60—69	7/35	0/15	—	2/4	—	—
70—79	2/16	—	—	1/2	—	—
80—89	7/16	—	—	3/3	—	—
90—99	2/7	—	—	—	—	—
100—109	4/11	—	—	3/3	—	—
110—119	0/1	—	—	—	—	—
120—129	2/2	—	—	—	—	—
130—139	1/2	—	—	1/1	—	—
140—149	1/1	—	—	—	—	—

+) Ratio of brains with deposits to total number of brains examined

Stosunek liczby mózgow z złogami do liczby mózgow zbadanych

ventralis thalami. Less frequently they could be observed in the medial, dorso-lateral, anterior and posterior thalamic nuclei.

Only in one case, in group I, the appearance and location of the deposits differed from the others. Beside the perivascular ones, there were some which looked like calcified cells, but neither their neuronal nor glial character could be determined (Fig. 8). Several of them were situated in the posterior part of the lateral thalamic nucleus.

Cellular reaction surrounding the deposits was not a feature.

Histochemical reactions demonstrated the same properties as revealed by perivascular concretions.

DISCUSSION

The occurrence of mineral deposits in the experimental and normal mouse brain turned out to be a frequent phenomenon. The results show a marked increase of the rate of deposits, depending on the age in both groups of animals. The higher

Table 3. Incidence of deposits depending on age in four experimental group
 Tabela 3. Częstość występowania złożeń w zależności od wieku w poszczególnych grupach doświadczalnych

Weeks of life Tygodnie życia	Group I (methylchol.) Grupa I (metylochól.)	Group II (neoplasm) Grupa II (nowotwór)	Group III (graphite) Grupa III (grafit)	Group IV (normal) Grupa IV (norma)
9—19	0/45 ⁺	—	0/8	0/1
20—29	2/51	0/3	0/7	0/8
30—39	2/20	4/40	0/9	0/3
40—49	2/26	4/48	1/6	2/5
50—59	3/25	4/36	—	3/5
60—69	5/20	2/20	—	2/4
70—79	1/4	1/12	—	1/2
80—89	2/4	5/12	—	3/3
90—99	2/4	0/3	—	—
100—109	3/5	1/6	—	3/3
110—119	—	0/1	—	—
120—129	1/1	1/1	—	—
130—139	1/2	—	—	1/1
140—149	1/1	—	—	—
	25/208 12.0%	22/182 12.0%	1/30 3.3%	15/35 42.0%

+) Ratio of brains with deposits to total number of brains examined

Stosunek liczby mózgow z złożami do liczby mózgow zbadanych

proportion of deposits in the brains of normal mice can be explained by systemic checking of serial sections, whereas the brains of experimental animals were often disfigured, some parts of tissue removed for other studies, so that some deposits could be easily overlooked. Judging by the comparable period of the experiment, it seems that the C3H strain has greater tendency to develop concretions than the R III strain.

The type of pathological process does not seem to influence the rate of deposits; the percentage in the whole group I and II is identical, though it seems that in these groups the deposits develop several weeks earlier than in the brains of normal mice. The consistent location of deposits — only in the thalamus — and their frequent symmetrical distribution may be assigned to a specific tissue metabolism in this region of the brain, in the sense of the pathoclysis theory or to special circulatory conditions.

When applying the concepts of human neuropathology and considering known animal cases it can be supposed that the observed mineral deposits are of primary, endogenous origin. This is evidenced by the occurrence of deposits in the brains of healthy animals, lack of any pathological foci other than the experimental ones and the constant location of the concretions.

The multilayered structure of the concretions suggests that their development is connected with a long-lasting process leading to consecutive zone formation. This supposition is additionally favoured by the nearby presence of deposits in various stages of their development. The constant localization of the deposits near the capillaries points at the connection of the calcification process with the vascular system of the brain. It was already observed that in mouse gliomas as well as in areas of brain edema, minute pools of neutral and acid mucopolysaccharides lie close to small vessels (Szumańska, Kroh, 1974) which together with the enzymatic changes demonstrated in vascular walls of oedematous and neoplastic areas (Kroh, 1970) indicate blood-brain barrier permeability disturbances. The identical character of the deposits in normal and experimental animals suggests that their origin can be ascribed to the same process, most probably to the changed permeability of the capillaries in aged individuals (Morel, Wildi, 1952).

The concretions are built of alternate layers of calcium carbonates and phosphates (positive Kossa and Alizarin red reactions) and of acid mucopolysaccharides (positive Astra and Alcian blue reaction). The lack of iron compounds which are considered a standard component of such calcareous concretions in other animals and humans may indicate that in mice deposit formation differs from that in other species.

CONCLUSIONS

1. Perivascular calcifications in the mouse brain are the result of the ageing process.
2. The calcifications represent a primary process; their development is most probably connected with blood vessels permeability disturbances in the anatomically predilected structures.
3. The main components of the deposits are calcium salts and mucopolysaccharides.

H. Kroh

PRZYNACZYNIOWE ZWAPNIENIA W MÓZGU MYSZY

Streszczenie

W czasie badań morfologicznych 455 mózgow myszy pochodzących ze szczepów C3H, R III, DBA i Swiss napotkano złogi przynaczyniowe. Złogi występowały w mózgow myszy badanych od 9 do 149 tygodnia życia i użytych do implantacji karcinogenu (bez oznak nowotworzenia), w mózgow myszy z doświadczalnymi glejakami i glejako-mięsakami, w mózgow myszy po implantacji grafitu i w mózgow myszy zdrowych. Lokalizacja złogów u wszystkich myszy dotyczyła wybiórczo wzgórza, jedno- lub obustronnie. Złogom nie towarzyszył odczyn komórkowy. Budowa złogów wykazywała na ich okresowe narastanie. Zidentyfikowano główne składniki złogów jako węglany i fosforany wapnia oraz kwaśne mukopolisacharydy.

Stwierdzono, że ilość mózgow ze zwapnieniami zwiększa się w miarę starzenia się zwierząt. Zwapnienia są pochodzenia endogennego, a patomechanizm ich powstawania jest prawdopodobnie związany z zaburzeniami przepuszczalności naczyń w anatomicznie predysponowanych strukturach.

Г. Крох

ОКОЛОСОСУДИСТОЕ ОТЛОЖЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В МОЗГЕ МЫШЕЙ

Резюме

Во время морфологических исследований 455 мозгов мышей линий СЗН, R III, DBA и Swiss встречались околососудистые отложения кальция. Отложения выступали в мозге мышей, исследованных на 9 до 149 недели жизни и использованных для вживления карциногена (без признаков новообразований), в мозге мышей с экспериментальными глиомами и глиобластомами, в мозге мышей с имплантацией графита и в мозге здоровых мышей.

Локализация отложений у всех мышей избирательно ограничивалась таламусом, одно- или двусторонне. Отложения не сопровождалась клеточной реакцией. Структура отложений указывала на их постепенное накопление. Были идентифицированы главные составные отложений, такие как углеродные и фосфорные производные кальция, а также кислые мукополисахариды. Было обнаружено, что число мозгов с кальциевыми отложениями увеличивается по мере старения животных; кальцификация является эндогенного происхождения, а патомеханизм его возникновения вероятно связан с нарушениями проницаемости сосудов в анатомически предрасположенных структурах.

REFERENCES

1. Bürgisser, H., Fankhauser, R., Klingler, P., Schneider, P.: Beiträge zur Neuropathologie der Wildtiere. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1959, 101, 112—134.
2. Frauchiger, E., Fankhauser, R.: Vergleichende Neuropathologie des Menschen und der Tiere. Springer Verl. Berlin, 1957, pp. 91—92, 96.
3. Innes, J., Saunders, L.: Comparative Neuropathology. Acad. Press, N. Y., London, 1962, pp. 659—665.
4. Kroh, H.: Morphological and histoenzymatic features of mouse brain gliomas induced by methylcholanthrene. Folia Cytochem. Histochem. 1970, 8, 329—352.
5. Morel, F., Wildi, E.: General and cellular patochemistry of senile and presenile alterations of the brain. Proc. I. Inter. Cong. Neuropath. Roma, 1952, 2, 347.
6. Saunders, L.: Cerebrovascular siderosis in horses. AMA Arch. Path. 1953, 56, 637—642.
7. Szumańska, G., Kroh, H.: Mucopolysaccharides and glycogen in chemically induced CNS gliomas. Proc. VII. Inter. Cong. Neuropath. Budapest 1974. In press.

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

LECH IWANOWSKI, MARIA OSTENDA

ULTRASTRUCTURE OF RAT CEREBRAL VESSELS 4 MONTHS AFTER GAMMA IRRADIATION

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

Warsaw, Poland

Head: Prof. M. J. Mossakowski, M. D.

The purpose of this paper was to check the current opinion that one of the late postirradiation changes is early senility (Maxwell, Kruger, 1964). The postirradiation changes of the brain parenchyma are well known from the literature; therefore our investigation is limited to brain capillaries and their closest vicinity. This paper constitutes a fragment of a larger work on the role of connective tissue in the ageing brain. Previous studies on this problem were presented this year at the VIIIth Intern. Congress of Neuropathology in Budapest (Iwanowski, 1974) and at the IVth Annual Meeting of Neuropathologists of German Democratic Republic in Mühlhausen (Iwanowski, Ostenda, 1974).

MATERIAL AND METHOD

Six Wistar male rats of the same brood, about 3 months old, were irradiated over the whole body with gamma rays using cobalt bomb „Gammatron 3”. Three rats were exposed to a dose of 400 r. and three to 800 r. The chosen doses were the lowest and the highest, provoking brain edema but still not lethal (Bacq, Alexander, 1961; Ojak, Maruchin, 1966). Four months after the exposure the rats were perfused with 4% glutaraldehyde intracardially and decapitated. Brain specimens were taken from frontoparietal cortex, lateral ventricle wall, from *corpus callosum* and *griseum pontis*. The samples were routinely handled for ultrastructural studies. Observations were performed under electron microscopes JEM 7A and Tesla 500 BS.

RESULTS

Findings in the cerebral vessels of both groups of animals were similar and could be qualified as follows:

Endothelium. The group irradiated with 400 r. showed the amount of microvilli and free ribosomes similar to those of healthy rats of the same age. Endothelium contained numerous pinocytotic vesicles. Mitochondria occasionally were

swollen, with disintegrated cristae. The group irradiated with 800 r. revealed thickening of endothelium and swollen mitochondria (Fig. 1) as well as marked increase pinocytosis (Figs. 2, 5). Some of vesicles were coated with bristles (Fig. 3). Vacuoles and dense bodies were rare in the group irradiated with 800 r. The lipid droplets were occasionally observed (Fig. 5). Myelin-like bodies in endothelium appeared seldom. Occasionally they were located in mitochondria (Fig. 6). Tight junctions generally were preserved (Figs. 6 and 7). Only in 800 r. group junctions with enlarged, electron lucent clefts were observed sporadically.

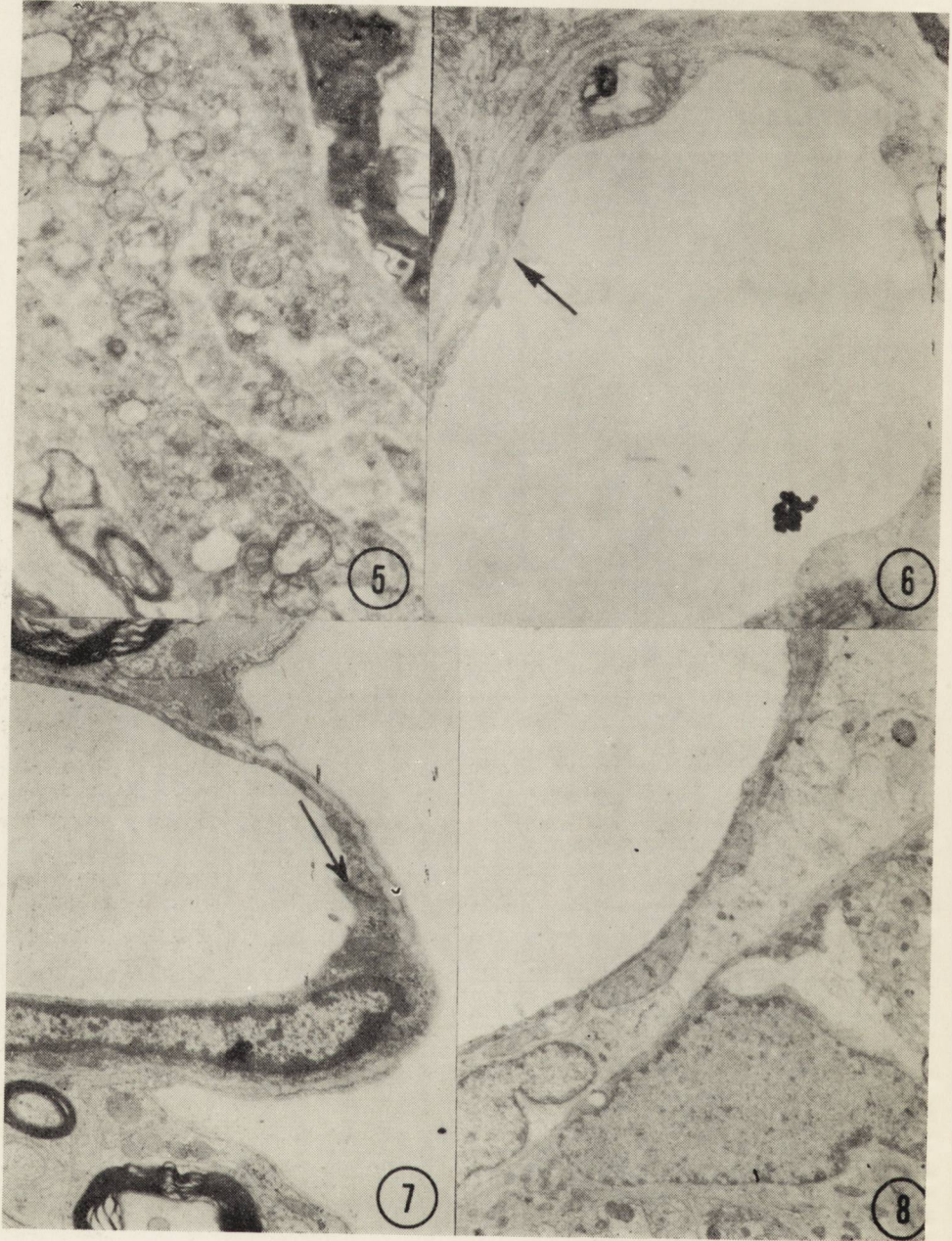
Basement membrane. Its thickness and electron density was similar to that observed in normal adult rats (Fig. 3). Endothelial processes found in basement membrane showed far advanced degenerative changes like increase of electron density of cytoplasm, profiles of destroyed organelles and dense bodies.

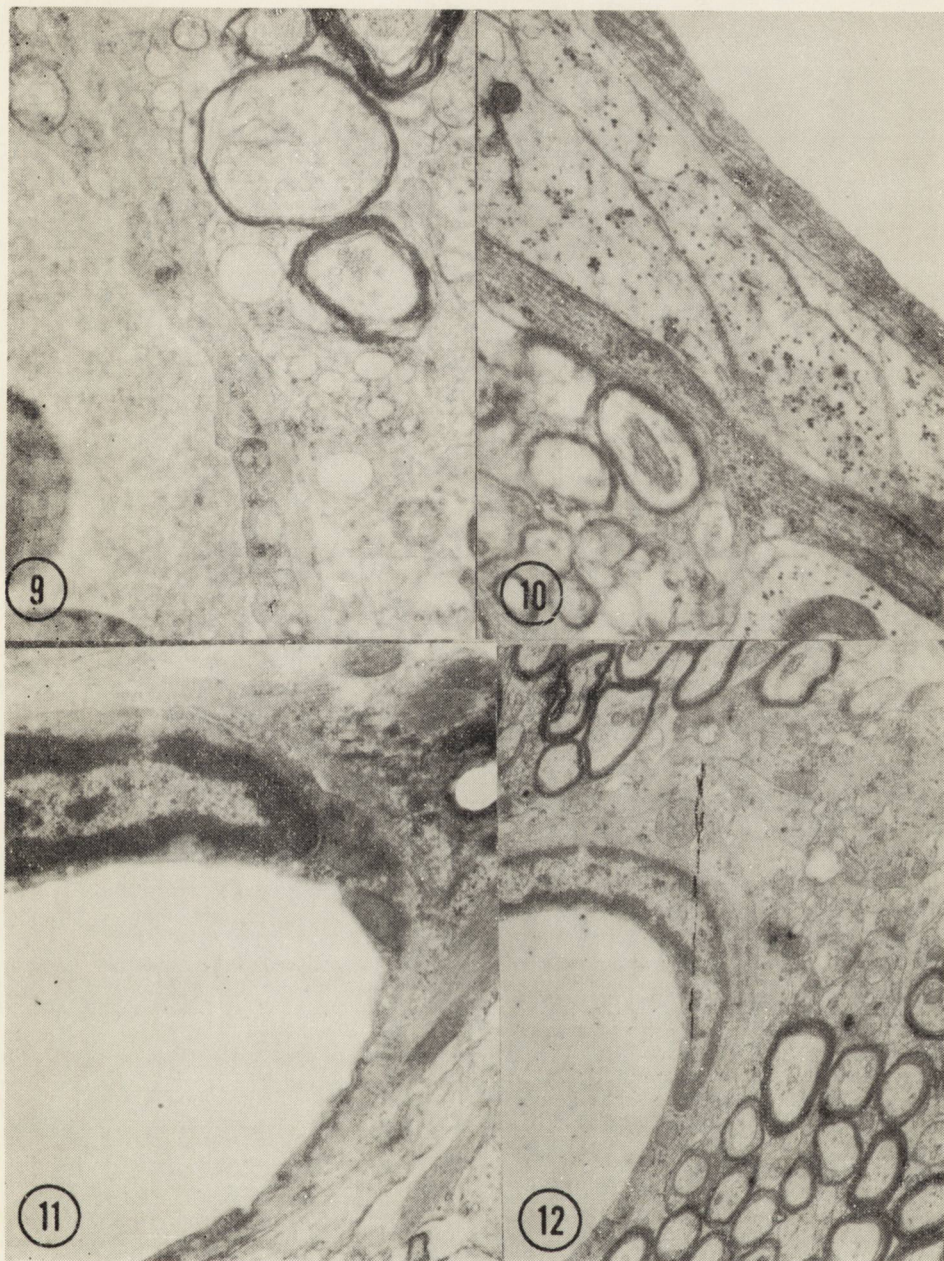
The closest vicinity of vessels wall. Astrocytic processes, surrounding vessels walls showed marked changes (Figs. 3, 8 and 9): an increase of electron lucency of cytoplasm containing the debris of destroyed organelles. Some processes contained rich deposits of glycogen granules (Fig. 10). Dense bodies in astrocytic processes were found seldom. Occasionally, bundles of fibrils appeared (Fig. 11). Cytoplasm of oligodendrocytes adjacent to vessels contained numerous enlarged channels of Golgi apparatus and dense bodies (Fig. 12). Some axons showed different phases of myelination (Figs. 7 and 12). In some of them marked thickening of neurofibrils was observed. Extracellular spaces adjacent to vessels mostly formed typical gap junctions with clefts of ca 200 Å. Not rare there were found masses of marked electron density, which filled the clefts in short segments (Figs. 6 and 10). Dense bodies, now and then membranaceous, were occasionally found in neuropil (Fig. 2).

DISCUSSION

The observations made in vessel walls and their closest vicinity can be summarized to have revealed the following features: an evidence of increased permeability and edema, features of edema of sucker feet of astrocytes and degenerative changes in the form of vacuoles and myelin-like bodies in endothelium, dense bodies in cellular processes and neuropil and appearance of fibrils in astrocytes cytoplasm. The last may be indicative of productive process. Besides there were observed changes in axons and myelin sheaths, like segmental thickening of neurotubules and early phases of myelination, inadequate to animal age. These changes suggest that remyelination accompanied the Vallerian degeneration process. In the group of animals, which obtained higher dose of irradiation all changes observed were more marked. The pathological changes in vessels wall were less prominent than in the brain parenchyma. The above was more pronounced in the group irradiated with lower dose of gamma rays. Lesion of vessels walls qualified as a feature of changed permeability together with the swelling of astrocytic processes could be a morphological mani-







LEGENDS FOR FIGURES

Fig. 1. After exposure to 800 r dose. Thickened endothelium containing numerous pinocytic vesicles and edematous mitochondria. $\times 41\ 000$

Ryc. 1. Dawka 800 r. W śródbłonku liczne pęcherzyki pinocytarne i obrzękłe mitochondria. Pow. 41 000 \times .

Fig. 2. After exposure to 400 r dose. Dense body of marked size in neuropil, showing granular and membranous structure. $\times 72\ 000$

Ryc. 2. Dawka 400 r. W neuropilu widoczne ciała gęste znacznych rozmiarów o budowie ziarnisto-błoniastej. Pow. 72 000 \times .

Fig. 3. Exposure to 400 r dose. Numerous pinocytic vesicles in endothelium, some of them coated with bristles, other empty profiles with single membrane. Adjacent to vessel glial process with very low electronoptic density including fragments of cellular membranes. $\times 41\ 400$

Ryc. 3. Dawka 400 r. W śródbłonku liczne pęcherzyki pinocytarne pokryte kolcami oraz optycznie puste profile z pojedynczą błoną. Przylegająca do naczynia wypustka glejowa ma niską gęstość elektrono-optyczną, widoczne są w niej jedynie fragmenty błon komórkowych. Pow. 41 400

Fig. 4. After exposure to 800 r dose. In vessel wall numerous profiles including organellae of low optical density. The profiles are of different sizes, some of them including double membrane and remnants of cristae. $\times 9\ 000$

Ryc. 4. Dawka 800 r. W ścianie naczynia liczne profile organelli o niskiej gęstości elektronowej. Rozmiary profilów różne, w niektórych, podwójnie obłonionych profilach widoczne resztki grzebieni. Pow. 9 000 \times .

Fig. 5. After exposure to 800 r dose. Thickened endothelium containing numerous pinocytic vesicles, optically empty vacuoles in various stages of damage. Lipid droplets are seen. $\times 18\ 000$

Ryc. 5. Dawka 800 r. Pogrubiały śródbłonek zawiera liczne pęcherzyki pinocytarne, wodniczki optycznie puste oraz uszkodzone w różnym stopniu mitochondria. Widoczne są kule lipidowe. Pow. 18 000 \times .

Fig. 6. After exposure to 400 r dose. Edematous mitochondrion containing myelin structure. In endothelium numerous pinocytic vesicles. A short bridge closes tight junction. (arrow). Some fragments of extracellular spaces filled with optically dense mass. $\times 12\ 000$

Ryc. 6. Dawka 400 r. Obrzękłe mitochondrium zawierające struktury mielinopodobne. W śródbłonku liczne pęcherzyki pinocytarne. Złącze ściśle zamknięte krótkim mostkiem (strzałka). W przestrzeniach międzykomórkowych widoczne krótkie odcinki wypełnione optycznie gęstymi masami. Pow. 12 000 \times .

Fig. 7. After exposure to 400 r dose. Tight junction in endothelium (arrow). Adjacent to the vessel astrocytic process of low electronoptic density, free of organellae. In white matter axons in various phase of myelination. $\times 25\ 800$

Ryc. 7. Dawka 400 r. W śródbłonku znajduje się zespolenie ściśle (strzałka). Do naczynia przylega wypustka astrocytu o małej gęstości elektronooptycznej, pozbawiona organelli. W istocie białej widoczne włókna osiowe w różnych stadiach mielinizacji. Pow. 25 800 \times .

Fig. 8. After exposure to 800 r dose. Adjacent to vessel astrocytic process of low electronoptic density, containing „empty” shapeless profiles with single membrane. $\times 18\ 000$

Ryc. 8. Dawka 800 r. Do naczynia przylega wypustka astrocytarna o małej gęstości elektrono-optycznej, zawierająca „puste”, niekształtne profile, pojedynczo obłonione. Pow. 18 000 \times

Fig. 9. After exposure to 800 r dose. Pinocytic vesicles in endothelium. Empty vacuoles, mostly with single membrane, in astrocytic process adjacent to vessel. $\times 32\ 400$

Ryc. 9. Dawka 800 r. W śródbłonku pęcherzyki pinocytarne. W wypustce astrocytarnej, przylegającej do ściany naczynia optycznie puste wodniczki, przeważnie pojedynczo obłonione. Pow. 32 400 \times

Fig. 10. After exposure to 400 r dose. Short bridges in the tight junction. Astrocytic process adjacent to vessel contains numerous glycogen granules. Spaces between astrocytic processes are partially filled with optically dense mass. $\times 48\ 000$

Ryc. 10. Dawka 400 r. W śródbłonku znajduje się zespolenie ściśle rzadko spotykanej długości, połączone krótkimi mostkami. W przylegających wypustkach astrocytarnych liczne ziarna glikogenu. Przestrzeń między wypustkami astrocytów częściowo wypełniona optycznie gęstą masą. Pow. 48 000 \times .

Fig. 11. After exposure to 400 r dose. Bundles of small fibrils (gliofibrils?) running in various directions in perivascular space. $\times 25\ 000$.

Ryc. 11. Dawka 400 r. W przestrzeni okołonaczyniowej znajdują się pasma drobnych włókienek (gliofibril?), przebiegające w różnych kierunkach. Pow. 25 000 \times .

Fig. 12. After exposure to 400 r dose. Oligodendrocyte adjacent to vessel wall with numerous channels of smooth endoplasmic reticulum and dense bodies. In white matter axons in various phases of myelination. $\times 25\ 800$

Ryc. 12. Dawka 400 r. Przylegający do ściany naczynia oligodendrocyt z licznymi kanałami gładkiej siatki endoplazmatycznej i ciałami gęstymi. W istocie białej aksony w różnych stadiach mielinizacji. Pow. 25 800 \times .

festation of edematous readiness. The resemblance to senile changes consists in two elements: the features of changed permeability with increased number of tight junctions in extracellular spaces and degenerative changes in vessels walls and neuropil. Both elements are nonspecific. The difference between postirradiation changes and senile ones consists in more intensive pinocytosis in endothelium of irradiated rats and less intensive degenerative changes in the vessels of irradiated rats. The period of 4 months survival after irradiation was too short to demonstrate senile changes of the cerebral vessels.

CONCLUSIONS

The late effect of irradiation with 400 r. and 800 r., in the conditions of our experiment, was more pronounced in brain parenchyma than in cerebral vessels. The changes in the vessels could be qualified as morphological exponent of edematous readiness.

Basing on our observations we could not state that postirradiative changes in cerebral vessels were of the character of initiating senility.

L. Iwanowski, M. Ostenda

OBRAZ ULTRASTRUKTURALNY NACZYŃ KRWIONOŚNYCH MÓZGU SZCZURA 4 MIESIĄCE PO NAPROMIENIANIU GAMMA

Streszczenie

Autorzy przebadali w mikroskopie elektronowym mózgi dorosłych szczurów w 4 miesiące po napromienianiu gamma dawką 400 oraz 800 R. Badania dotyczyły naczyń i ich najbliższego otoczenia. Celem pracy było zweryfikowanie poglądu jakoby jedną ze zmian popromiennych było wczesne starzenie się. Stwierdzono, że późny efekt działania czynnika uszkadzającego jest bardziej uchwytany w tkance nerwowej niż w naczyniach mózgu. Zmiany w naczyniach dają się sprowadzić do wykładników morfologicznych pogotowia obrzękowego. Uzyskane wyniki nie upoważniają do stwierdzenia, że późne zmiany popromienne mają charakter zaczynających się zmian starczych.

Л. Ивановский, М. Остенда

КАРТИНА УЛЬТРАСТРУКТУРЫ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ МОЗГА КРЫС ЧЕРЕЗ 4 МЕСЯЦА ПОСЛЕ ГАММА-ОБЛУЧЕНИЯ

Резюме

Авторы провели электронно-микроскопические исследования мозга взрослых крыс через 4 месяца после облучения дозой 400 и 800 р. Исследования касались сосудов и прилегающей области. Целью исследования было установление достоверности суждения, что одним из изменений, вызванных облучением, является преждевременное старение. Результаты исследований показали, что более поздний эффект повреждающего фактора является более уловимым в парен-

химе мозга, чем в его сосудах. Изменения в сосудах можно расценивать как морфологические показатели отечной готовности. На основе исследованного материала нельзя установить, что более поздние изменения в сосудах мозга, вызванные облучением, носят характер начинающихся старческих изменений.

REFERENCES

1. Bacq A., Alexander M.: Fundamentals of Radiobiology. Pergamon Press, New York, 1961.
2. Iwanowski L.: The role of connective tissue in the brain ageing. VIIth Intern. Congress of Neuro-pathology, Budapest, 1974. Proceedings — in press.
3. Iwanowski L., Ostenda M.: Ultrastructural changes in the brain capillaries of old rats. 4 Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR, Mülhausen, 1974, Proceedings — in press.
4. Iwanowski L., Ostenda M.: Dojrzewanie i inwolucja włóściczków mózgu szczura w obrazie mikroskopu elektronowego. In preparation, 1974.
5. Maxwell D. S., Kruger L.: Electron microscopy of radiation induced laminar lesions in the cerebral cortex of the rat — vasculature. In: Halej T., Snider R. S.: Response of the nervous system to ionizing radiation. Second Intern. Symposium on Ionizing Radiation, Los Angeles. Ed. Little Brown Co, Boston, 1964.
6. Ojak M., Maruchin A.: Zmiany morfologiczne w mózgu szczurów napromienianych różnymi dawkami promieni gamma. Patol. Pol. 1966, 17, 163—170.

Authors' address: Department of Neuropathology, Medical Research Centre, 02-093 Warszawa, Pasteura Str. 3, Poland.

KOMUNIKAT

w sprawie Międzynarodowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Lekarskiego,
Warszawa — Kraków, 9—15.VIII.1976 r.

W związku z 200 rocznicą powołania w Polsce Komisji Zdrowia będącej pierwowzorem Ministerstwa Zdrowia i 110 rocznicą pierwszego Zjazdu Lekarzy i Przyrodników Polskich, Polskie Towarzystwo Lekarskie organizuje w dniach od 9 do 15 sierpnia 1976 r. Międzynarodowy Zjazd w Warszawie i Krakowie.

Celem Zjazdu jest zaprezentowanie dorobku medycyny polskiej oraz osiągnięć społecznych naszego kraju, a także zapoznanie polonii zagranicznej i społeczeństwa polskiego z wkładem Polaków w rozwój medycyny światowej. Zjazd będzie służył również poszerzeniu i pogłębieniu przyjaznych kontaktów, stworzy klimat i warunki do nawiązywania bezpośredniej współpracy między lekarzami praktykami i naukowcami środowisk polonijnych i lekarzami polskimi w kraju.

Program Zjazdu obejmuje 3-dniowe obrady w Warszawie i 3-dniową sesję wyjazdową w Krakowie.

Główne tematy obrad plenarnych:

1. Problemy współczesnego kształcenia i doskonalenia lekarzy,
2. Rehabilitacja i lecznictwo uzdrowiskowe.

Istnieje możliwość zorganizowania spotkań i dyskusji naukowych na inne tematy w zależności od zgłoszonych wcześniej zainteresowań uczestników.

W dniach od 16 do 23 sierpnia przewiduje się kilkudniowe wycieczki po Polsce, których trasy umożliwią zwiedzenie najważniejszych centów kulturalnych Polski oraz sanatoriów i uzdrowisk. Bliższe informacje o zjeździe dla lekarzy polskiego pochodzenia przesyła Polskie Towarzystwo Lekarskie na prośbę zainteresowanych. Korespondencję w tej sprawie należy kierować na adres: Polskie Towarzystwo Lekarskie — Komitet Organizacyjny Międzynarodowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa — Al. Ujazdowskie 24, 00-478 Warszawa.

U w a g a: Przedstawiciele krajowych środowisk lekarskich i naukowych zostaną zaproszeni do udziału w Zjeździe bezpośrednio przez Polskie Towarzystwo Lekarskie.

KOMUNIKAT

Główna Komisja Badania Zbrodni Hitlerowskich w Polsce informuje, że kończy prace nad rejestrem strat osobowych inteligencji polskiej w latach 1939—1945, w tym środowiska naukowego.

W przygotowaniu jest publikacja poświęcona **upamiętnieniu pracowników nauki — ofiar wojny i okupacji**. W związku z tym prosi się zainteresowanych o nadesłanie:

- 1 — uzupełnień do opublikowanych już życiorysów lub biografów;
- 2 — materiałów o osobach, o których nie ma dotąd informacji w piśmiennictwie. Informacja powinna zawierać: nazwisko i imię, datę i miejsce urodzenia, stopień i tytuł naukowy, pełnione funkcje, dyscyplinę naukową, najważniejsze dzieła, działalność społeczno-zawodową przed wojną i podczas okupacji, martyrologię oraz datę, miejsce i okoliczności śmierci;
- 3 — fotografii, odpisów lub fotokopii dokumentów dotyczących martyrologii i śmierci.

Kartotekę osobową strat naukowców polskich zamyka się w lutym 1976 r.

Korespondencję i materiały prosimy kierować na adres: Dr Marian Walczak, Polska Akademia Nauk, Warszawa — Pałac Kultury i Nauki.

T R E Ś Ć

Ch. Eggers: Zespoły halucynacyjne w wieku dziecięcym, wywołane przez zatrucia	297
H. Schneider, R. Dicht, H. Schachinger: Neuropatologia zaburzeń oddechowych u niedo- szonych i donoszonych noworodków	305
Chr. Lipiński, W. Kratzer: Encefalopatia miokloniczna w wieku dziecięcym. Zagadnienia diagnostyczne i lecznicze	311
M. Simányi: Centralne i podstawne uszkodzenia mózgowia po ostrych urazach czaszkowo- -mózgowych	319
M. Radomska: Wpływ urazu czaszkowo-mózgowego na ujawnianie się tzw. samoistnych chorób układu nerwowego	327
H. Gross, H. Pfohl: Wyniki neuropatologiczne i korelacja kliniczna w encefalopatii alko- holowej	333
H. A. F. Schulze: Zastosowanie ilościowych metod badania architektоники kory mózgowej dla oceny wpływu czynników egzogennych na ośrodkowy układ nerwowy	343
W. Müller: Badanie uszkodzeń popromiennych ośrodkowego układu nerwowego	349
E. Klagge: Fizyczne podstawy uszkodzenia układu nerwowego prądem elektrycznym	355
R. Heidrich: Działanie prądu elektrycznego na układ nerwowy	359
R. Küstner: Wyniki badań neuropatologicznych po urazach elektrycznych u psów	363
H. Sowiński: Zmiany histochemiczne i morfologiczne w narządzie słuchowym i drodze słuchowej w następstwie doświadczalnego urazu akustycznego	367
I.B. Zelman, M.J. Mossakowski: Wybrane zagadnienia patomechanizmu uszkodzeń tkanki nerwowej w ostrym zatruciu tlenkiem węgla	375
M. Śmiałek: Aktywność oddechowa izolowanych neuronów ośrodkowego układu nerwo- wego szczura w doświadczalnym zatruciu tlenkiem węgla	381
L. Dydyk, M. Śmiałek, M. Dąbska: Aktywność oddechowa izolowanych komórek obrzy- mich opuszki i ultrastruktura neuronów pnia mózgu szczura w zatruciu tlenkiem węgla podczas ciąży	389
M. Sikorska, B. Gorzkowski, M. Szumańska, M. Śmiałek: Wbudowywanie ¹⁴ C-glukozy do glikogenu, oraz aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w mózгах szczurów w następstwie zatrucia tlenkiem węgla	397
M. Wender, B. Zgorzalewicz, A. Wajgt: Aktywność syntetaz sRNA amino acylowych w doświadczalnej encefalopatii cyjanowej	405
M. Wender, B. Zgorzalewicz, A. Piechowski: Aktywność syntetaz sRNA amino acylowych w obręku mózgu wywołanym zatruciem trójetylkciem cyny	415
M. Owsianowski: Przemiana cholesterolu w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii cyjanowej	423
M. Owsianowski: Biosynteza cholesterolu w mózgu szczura po zatruciu trójetylkciem cyny	433
M. Wender, O. Mularek, A. Piechowski: Ochronny wpływ cerebrolizyny przed następstwami zatrucia trójetylkciem cyny we wczesnym okresie życia pozapłodowego	441
M. Sikorska, B. Biczowa, W. Bicz, M. Skonieczna: Poziom glikogenu, aktywność glikoli- tyczna i oddechowa, oraz stężenia ATP, ADP, i AMP w mózgu szczura w następstwie zatrucia insektycydem fosforoorganicznym trichlorfonem (Dipterex)	447
J. Pachecka, A. Suliński; G. Ziółkowska: Aktywność wybranych esteraz mózgu szczura w następstwie zatrucia insektycydami fosforoorganicznymi dichlorofosem i trichlor- fonem	455
D. Sitkiewicz, Z. Zalewska: Wpływ fosforoorganicznych insektycydów na aktywność nie- których oksydoreduktaz w mitochondriach mózgu szczura	463
M. Śliżewski: Wpływ przewlekłego stosowania fungicydu octanu fenylortęciowego na obwodowy układ nerwowy szczura	471
E. Sosiński: Zmiany w mózgu i mięśniach szczura w następstwie wszczepienia tlenku niklu	479
I. Pecháň, J. Siméková, L. Halčák: Aktywność fosfodwuesterazy w tkance nerwowej w do- świadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia	485
I. Pecháň, L. Halčák: Zmiany biochemiczne w mózгах świnek morskich uczulonych zasadowym białkiem encefalitogennym	493
B. Zgorzalewicz, J. Patelski, J. Jeljaszewicz: Wpływ alfa-toksyny gronkowcowej na aktywność syntetaz amino acyl sRNA w mózgu królika <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i>	499
F. W. Rath, D. Felicetti: Badanie histochemiczne kwaśnej fosfatazy aktywowanej octanem cynku i jej zachowanie się we wczesnych okresach rozwoju guzów mózgu u szczura wywołanych działaniem etylnitrozomocznika	507
D. Heinrich, W. Müller, Ch. M. Heinrich, R. Fischer: Występowanie i częstotliwość guzków białaczkowych	511
F. Matakas, J. Cuypers, J. Cervós-Navarro: Zaburzenia mikrokrążenia mózgowego po niedokrwieniu mózgu	515
H. Kroh: Przynaczyniowe zwapnienia w mózgu myszy	519
L. Iwanowski, M. Ostenda: Obraz ultrastrukturalny naczyń krwionośnych mózgu szczura 4 miesiące po napromienianiu gamma	527

297 Ch. Eggers: Zespoły halucynacyjne w wieku dziecięcym, wywołane przez zatrucia
 H. Schneider, K. Dicht, H. Scheubinger: Neurobiologia zaburzeń oddychawczych u niedono-
 302 szonych i доноszonych noworodków
 Ch. Liniński, W. Krutecz: Encyfaloopatia miokloniczna w wieku dziecięcym. Zagadnienia
 311 diagnostyczne i lecznicze
 M. Simányi, Centralne i podstawne uszkodzenia mózgowia po ostrej urazach czaszkowo-
 319 mózgowych
 M. Radomska: Wpływ urazu czaszkowo-mózgowego na dławienie się tzw. samostatych
 327 chorób układu nerwowego
 H. Gross, H. Ploetz: Wpływ neuropatologiczne i kliniczne w encyfaloopatii miko-
 333 łowej

СОДЕРЖАНИЕ

H. A. F. Schuber: Zastosowanie losowania architekturalnej kory mózgowej
 343 dla oceny wpływu czynników czyniowych na rozwój układu nerwowego

W. M. M. Эггерс: Галлюцинационный синдром в детском возрасте, вызванный
 297 отравлениями

R. H. Шнейдер, P. Дихт, X. Шахингер: Нейропатология нарушений дыхания
 305 у недоношенных и доношенных новорожденных

H. L. Шнейдер, В. Кратцер: Миоклоническая энцефалоопатия у детей. Диаг-
 311 ностические и терапевтические вопросы

H. M. Симиани: Центральное и базальное повреждения головного мозга при
 319 острых черепно-мозговых травмах

H. M. Радомска: Влияние черепно-мозговой травмы на проявление, так назы-
 327 ваемых, идиопатических заболеваний нервной системы

H. Gross, X. Pfoelz: Невропатологические результаты и клиническая кор-
 333 реляция при алкогольной энцефалоопатии

M. Шулце: Применение количественных методов исследования архитек-
 343 тоники коры мозга для оценки влияния экзогенных факторов на
 центральную нервную систему

W. Mюллер: Исследования повреждений центральной нервной системы
 349 после облучения

E. Kлягте: Физические основы повреждений нервной системы электри-
 355 ческим током

P. Хайдрих: Действие электрического тока на нервную систему
 359

P. Кюстнер: Результаты невропатологических исследований при электри-
 363 ческой травме у собак

M. Овсиныски: Гистохимические и морфологические изменения в органе
 367 слуха и в слуховом пути после экспериментальной акустической
 травмы

I. B. Зельман, M. Я. Моссаковски: Избранные вопросы патомеханизма по-
 375 вреждений нервной ткани при отравлении окисью углерода

M. Смялек: Дыхательная активность изолированных нейронов ЦНС крысы
 381 при экспериментальном отравлении окисью углерода

J. Дыдык, M. Смялек, M. Домбска: Дыхательная активность изолирован-
 389 ных гигантских клеток ретикулярной формации и ультраструктура
 нейронов ствола мозга крысы при отравлении окисью углерода во
 время беременности

M. Сикорска, B. Рожковски, T. Шуманьска, M. Смялек: Включение ¹⁴C-
 397 глюкозы в гликоген и активность дегидрогеназы глюкозо-6-фосфата
 в мозге крыс после отравления окисью углерода

M. Вендер, B. Згожалевич, A. Вайтт: Активность аминоксил-SPHK-синтез
 405 при экспериментальной цианистой энцефалоопатии

M. Вендер, B. Згожалевич, A. Пеховски: Активность аминоксил-SPHK-син-
 415 тез при отеке мозга, вызванном отравлением трехокисью олова

M. Овсиныски: Обмен холестерина в мозге крыс при экспериментальной
 423 цианистой энцефалоопатии

M. Овсиныски: Биосинтез холестерина в мозге крысы после отравления
 433 триэтиловым оловом

M. Вендер, O. Мулярек, A. Пеховски: Защитное влияние церебролизина
 441 против последствий отравления триэтиловым оловом в раннем перио-
 де внеутробной жизни

M. Сикорска, B. Вичова, B. Бич, M. Сконачна: Уровень гликогена, глико-
 447 литическая и дыхательная активность, а также содержание АТФ,
 АДФ и АМФ вследствие отравления фосфоорганическим инсекти-
 цидом трихлорфоном (Диптерекс)

Я. Пахецка, А. Сулиньски, Г. Зюлковска: Активность некоторых эстераз мозга крысы после отравления фосфоорганическими инсектицидами Дихлорфосом и Трихлорфоном	455
Д. Ситкевич, З. Залевска: Активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы в митохондриях мозга крысы после отравления фосфоорганическими инсектицидами	463
М. Слижевски: Влияние хронического применения фунгицида фенилртутного ацетата на периферическую нервную систему крысы	471
Е. Сосиньски: Изменения в мозге и мышцах крыс в результате имплантации окиси никеля (Ni_2O_3)	479
И. Пехан, Я. Симекова, Л. Галчек: Активность фосфодиэстеразы нервной ткани при экспериментальном аллергическом воспалении головного и спинного мозга	485
И. Пехан, Л. Галчек: Биохимические изменения в мозге морских свинок, сенсibilизированных основным энцефалитогенным белком	493
Б. Згожалевич, Я. Пательски, Я. Еляшевич: Влияние стафилококкового альфа токсина на активность аминоксил-SPHK синтаз в мозгу кролика	499
Ф. Рат, Д. Фелицетти: Гистохимическое исследование кислой фосфатазы, активированной уксуснокислым цинком, на ранних стадиях опухоли мозга, вызванных у крыс воздействием этилнитрозомочевинной	507
Д. Хайнрих, В. Мюллер, Х.-М. Хайнрих, Р. Фишер: Наличие и частота лейкоэмических глыбок	511
Ф. Матакас, Я. Куиперс, Х. Сервос-Наварро: Нарушения мозговой микроциркуляции после ишемии мозга	515
Г. Крох: Околососудистое отложение кальция в мозге мышей	519
Л. Ивановски, М. Остенда: Картина ультраструктуры кровеносных сосудов мозга крыс через 4 месяца после гамма-облучения	527

CONTENTS

Ch. Eggers: Durch Vergiftungen hervorgerufene halluzinatorische Syndrome im Kindesalter	297
H. Schneider, R. Dicht, H. Schachinger: The neuropathology of respiratory disorders of the premature and mature neonate	305
Chr. Lipiński, W. Kratzer: Myoklonische Encephalopathie im Kindesalter. Diagnostische und therapeutische Probleme	311
M. Simányi: Zentrale und basale Läsionen nach akuten Schädelhirntraumen	319
M. Radomska: Die Bedeutung des Schädelhirntraumas für das Manifestwerden der sogenannten spontanen Nervensystemerkrankungen	327
H. Gross, H. Pfolz: Neuropathologische Befunde und klinisches Korrelat bei Alkohol-encephalopathien	333
H. A. F. Schulze: Quantitative Methoden der Hirnrindenarchitektonik zur Erfassung von Folgezuständen exogener Einwirkungen auf das Zentralnervensystem	343
W. Müller: Untersuchungen zur Strahlenschädigung des Zentralnervensystems	349
E. Klage: Physikalische Grundlagen bei elektrischer Verletzung des Nervensystems	355
R. Heidrich: Auswirkungen des elektrischen Stromes auf das Nervensystem	359
R. Küstner: Neuropathologische Befunde nach Elektrotraumen bei Hunden	363
H. Sowiński: Histochemical and morphological changes in the organ and pathways of hearing induced by experimental acoustic trauma	367
I.B. Zelman, M.J. Mossakowski: Some aspects of the pathomechanism of nerve tissue lesions in acute carbon monoxide intoxication	375
M. Śmiałek: Respiratory activity of isolated neurons from the rat central nervous system following carbon monoxide intoxication	381
L. Dydyk, M. Śmiałek, M. Dąbska: Respiratory activity of isolated giant cells of reticular formation and ultrastructure of neurons from rat brain stem in carbon monoxide intoxication during pregnancy	389
M. Sikorska, B. Gorzkowski, G. Szumańska, M. Śmiałek: Incorporation of ¹⁴ C-glucose into glycogen and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain following carbon monoxide intoxication	397
M. Wender, B. Zgorzalewicz, A. Wajgt: Activity of sRNA-amino acyl synthetases in experimental cyanide encephalopathy	405
M. Wender, B. Zgorzalewicz, A. Piechowski: Activity of sRNA-amino acyl synthetase in TET-induced brain edema	415
M. Owsianowski: Cholesterol metabolism in the rat brain during experimental cyanide encephalopathy	423
M. Owsianowski: Cholesterol biosynthesis by rat brain in triethyl tin intoxication	433
M. Wender, O. Mularek, A. Piechowski: On the protective influence of cerebrolysine against the effects of TET-intoxication at an early stage of extrauterine life	441
M. Sikorska, B. Biczowa, W. Bicz, M. Skonieczna: Glycogen content, glycolytic and respiratory activity and ATP, ADP, and AMP concentrations in rat brain following trichlorphon (Dipterex) intoxication	447
J. Pachecka, A. Suliński, G. Ziolkowska: The activities of some esterases of the rat brain after intoxication by organophosphate insecticides: dichlorvos and trichlorphon	455
D. Sitkiewicz, Z. Zalewska: Effect of organophosphate insecticides on some oxidoreductases in rat brain mitochondria	463
M. Śliżewski: Influence of chronic administration of phenylmercuric acetate on the peripheral nerve system of rat	471
E. Sosiński: Morphological changes in rat brain and skeletal muscle in the region of nickel oxide implantation	479
I. Pecháň, J. Siméková, L. Halčák: Phosphodiesterase activity of nervous system in experimental allergic encephalomyelitis	485
I. Pecháň, L. Halčák: Biochemical effects of sensibilization of guinea pigs with basic encephalogenic protein	493
B. Zgorzalewicz, J. Patelski, J. Jeljaszewicz: The effect of staphylococcal alpha-toxin upon the <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> activity of amino acyl-sRNA synthetases in the rabbit brain	499
F. W. Rath, D. Felicetti: Zur histochemischen Darstellung einer durch Zinkazetat stark aktivierten sauren Phosphatase in Frühstadien N-Athyl-N-Nitrosoharnstoff-induzierter Tumoren des Rattengrosshirns	507
D. Heinrich, W. Müller, Ch. M. Heinrich, R. Fischer: Vorkommen und Häufigkeit leukämischer Knötchen (leukemic nodules) in Gehirn	511
F. Matakas, J. Cuypers, J. Cervós-Navarro: Disturbances of cerebral microcirculation after cerebral ischemia	515
H. Kroh: Perivascular calcifications in the mouse brain	519
L. Iwanowski, M. Ostenda: Ultrastructure of rat cerebral vessels 4 months after gamma irradiation	527

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie — zł 100.—

półrocznie — zł 50.—

Informacji o warunkach prenumeraty udzielają urzędy pocztowe i Oddziały RSW „Prasa — Książka — Ruch”.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest droższa o 40% od prenumeraty krajowej, należy opłacać na konto PKO nr 1-6-100024 RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Biuro Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych, Warszawa, ul. Wronia 23.

Quarterly "Neuropatologia Polska" appearing since 1963, as an official Journal of Polish Association of Neuropathologists publishes papers in the field of: Clinical and Experimental Neuropathology, Neurooncology, Neurochemistry and Neuroanatomy.

Yearly subscription US \$ 12.— (prices in other currencies are the effective exchange rates in relation to the currency quoted above). Subscriptions from abroad should be paid to Ars Polona-Ruch account No 1595-006-71000 through the Bank Handlowy S.A. Warsaw, Poland.

Indeks 36910/36668

Zak. Graf. „Tamka”. Z. 2. Zam. 203. Pap. powlekany kl. V. 70 g. B1

Nakład 487+23 egz. Ark. druk. 15,0+1,75. B-58.