

egz

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

P18

NEUROPATOLOGIA POLSKA

51, -
~~Nelung~~ ~~PLS~~

TOM XVI

1978

ZESZ. 1

WARSZAWA

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XVI

STYCZEŃ—MARZEC

Nr 1

KOMITET REDAKCYJNY

Jerzy Dymecki (Warszawa), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Mirostlaw Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczysław Śmialek* (Warszawa), *Mieczysław Wender* (Poznań), *Irmína Zelman* (Warszawa)

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA SCISŁA

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

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Irmína Zelman*
Sekretarz Redakcji: *Halina Kroh*

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



B. ZGORZALEWICZ*, V. NEUHOFF, T. V. WAEHNELDT

PROTEIN COMPOSITION OF PERIPHERAL MYELIN DURING ONTOGENESIS OF THE RAT

Max-Planck Institut für experimentelle Medizin, Forschungsstelle Neurochemie,
3400 Göttingen, GFR

Metabolic and chemical studies on peripheral nervous system (PNS) myelin protein composition have been carried out mainly on adult sciatic nerve of various mammals (Wolfgram, Kotorii, 1968; Adams et al., 1971; Rawlins, Smith 1971; Cseytey et al., 1972; Uyemura et al., 1972; Greenfield et al., 1973). By contrast, only few studies have been published on myelin protein patterns during development of myelin sheath in rat (Wood, 1973; Zgorzalewicz et al., 1974; Wiggins et al., 1975) and human PNS (Davison et al., 1973).

Myelination is both a prominent and unique morphological change in the developing nervous system. In accordance with the morphological development changes in the protein composition of PNS myelin occur. In the present study, we report shifts in the quantitative distribution of individual myelin proteins of rat sciatic nerve during ontogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Sampling of sciatic nerve. White Wistar rats (Wilh. Meyer-Arend, Bad Salzflun, GFR) of either sex (15, 20, 25, 30, 40, 60, 90 and 365 days old) were used. The litter size was limited to 10, ensuring a more consistent growth rate. Due to the small weight of sciatic nerve in young animals, up to four litters were used for one experiment to yield enough starting material. The animals were fed with Altromin Standart 1310 and tap water *ad libitum*. The rats were lightly anesthetized with chloroform before decapitation. The sciatic nerves were excised at the sciatic notch and the peroneal and posterior tibial bran-

* The work was supported by a research grant of the Alexander von Humboldt-Foundation in GFR.

ches of these nerves were taken at the level of the knee. The nerves were cleaned of connective tissue, weighed, and stored at -25°C .

Myelin purification. Frozen sciatic nerves were pulverized in a mortar according to Everly et al. (1973) and then processed at $0-4^{\circ}\text{C}$. Pulverized sciatic nerves were homogenized in 0.32 M sucrose in a glass homogenizer of 0.18 mm clearance (B. Braun, Melsungen, GFR) using 10 up- and- down strokes of a motor-driven teflon pestle (2.400 rpm), to give a 5% (w/v) homogenate. Myelin was further prepared by the procedure described by Norton (1971). Centrifugations were carried out in an Omega II ultracentrifuge (Heraeus-Christ, Osterode GFR) in a 3×30 ml swing out rotor.

Electrophoretic fractionation. Myelin was homogenized at room temperature in 0.4 percent (w/v) sodium dodecyl sulphate (SDS), 0.01 M tris-Cl, pH 7.0 (0.5 mg protein/ml) and was centrifuged at 150 000 g for 1 h. For electrophoretic fractionation SDS extracts were placed on 12% acrylamide gels as described in detail by Waehneltd and Mandel (1972). The gels were stained with coomassie blue (Agrawal et al., 1972). Gel scans were made with a Joyce-Loebl microdensitometer (England) using a filter of 620 nm. The areas under the peaks were cut out and weighed.

Molecular weight determination. Molecular weight determinations of sciatic nerve myelin proteins bands have been extrapolated from the densitometric tracings of SDS gel electrophoresis by comparing their mobilities with those of marker proteins of known molecular weight (Cytochrome C, ovalbumin, catalase, bovine serum albumin, human albumin and conalbumin) according to the procedure of Weber and Osborn (1969).

Protein estimation. Total protein in myelin sample was determined by the method of Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as a standard.

RESULTS

Sciatic nerve myelin protein composition

The patterns of sciatic nerve myelin showed the presence of 6 protein components. The electrophoretic profiles of PNS myelin proteins are illustrated in Figure 1. The basic proteins were weakly represented in sciatic nerve myelin. The molecular weight of the small basic protein (SBP) was found to be $1.38 \cdot 10^4$ daltons and $1.7 \cdot 10^4$ daltons for the large basic protein (LBP), as it is shown in Figure 2.

We did not detect a $1.2 \cdot 10^4$ dalton molecular weight for small basic protein, described by Greenfield et al. (1973) and Brostoff et al.

(1974) in the peripheral nerve myelin. In our experiments the molecular weights of the two basic PNS myelin proteins were found to approximate those of the CNS myelin sheath (Zgorzalewicz et al., 1974).

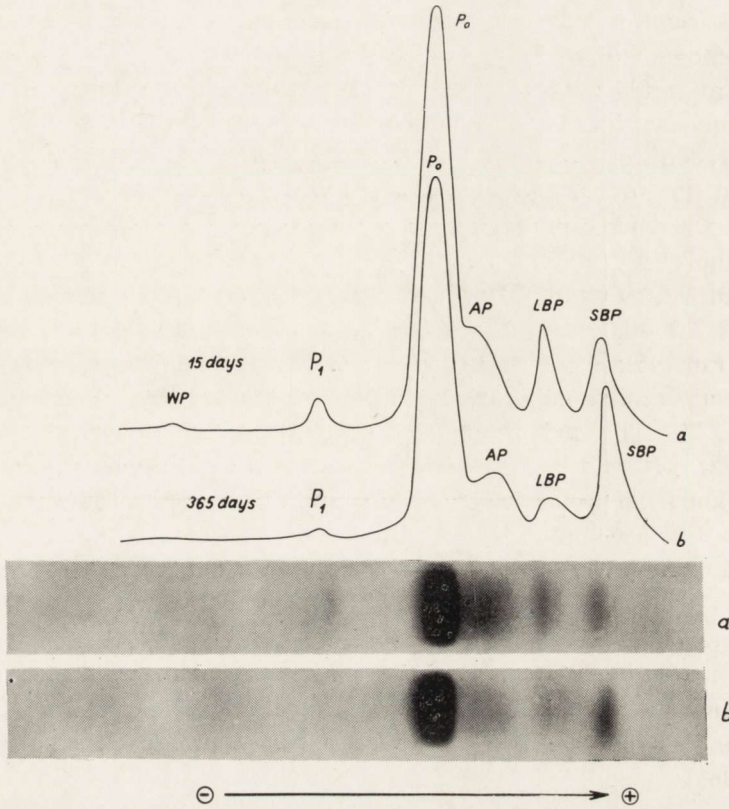


Fig. 1. Densitometric scans of myelin proteins (50 μg) of rat sciatic nerve on 5 (a) and 365 (b) days of age, following electrophoresis on 12% polyacrylamide gel in presence of SDS and staining with coomassie blue. For symbols see Fig. 2. *Ryc. 1.* Zapisy densytometryczne białek mieliny (50 μg) z nerwu kulszowego szczura, w wieku 5 (a) i 365 (b) dni, z elektroforezy na 12% żelu poliakrylamidowym zawierającym SDS, po barwieniu błękitem kumasyny. Oznaczenia jak w ryc. 2.

The next band which migrates directly ahead of the predominant PNS myelin protein P_0 (Greenfield et al., 1973) was tentatively labelled Agrawal protein (Agrawal et al., 1972) with a molecular weight of $2.1 \cdot 10^4$ daltons. The molecular weight of P_0 ($2.57 \cdot 10^4$ daltons) is in good agreement with recent published values (Eng, 1971) and is higher than that estimated by Zgorzalewicz et al. (1974) for CNS myelin proteolipid protein ($2.39 \cdot 10^4$ daltons). A protein of higher molecular weight ($3.89 \cdot 10^4$ daltons) than P_0 (P_1) was also found in small quantities in sciatic nerve myelin (Fig. 1). The question whether this is a genuine

PNS myelin protein or a contaminant has to remain unsolved for the time being. It may correspond to H₃ — one out of 3 high molecular weight myelin proteins described by Wiggins and Benjamins (1975) for rat sciatic nerve.

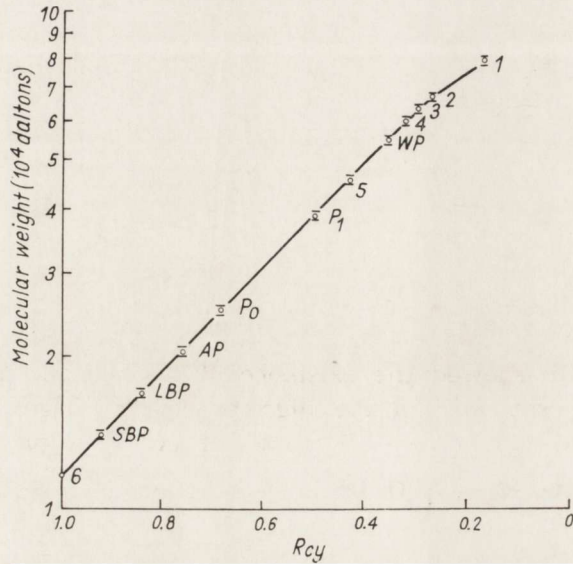


Fig. 2. Determination of the molecular weights of myelin proteins isolated from sciatic nerve of rat. The \log_{10} of molecular weights of a series of protein standards were plotted as function of R_{cy} . Each point represents the mean of 20 determinations with indicated SEM. Symbols: 1, conalbumin; 2, human albumin; 3, bovine serum albumin; 4, catalase; WP, Wolfgram protein; 5, ovalbumin; P₁, unidentified minor protein; P₀, predominant PNS myelin protein; AP, Agrawal protein; LBP, large basic protein; SBP, small basic protein; 6, cytochrome c.

Ryc. 2. Określanie ciężarów cząsteczkowych białek mieliny izolowanych z nerwu kulszowego szczura. \log_{10} ciężarów cząsteczkowych białek wzorcowych wykresowano jako funkcję R_{cy} . Oznaczenia: 1, albumina kurza; 2, albumina ludzka; 3, albumina bydłęca; 4, katalaza; 5, albumina jaja kurzego; P₁, niezidentyfikowane białko śladowe; P₀, dominujące białko mieliny; AP, białko Agrawala; WP, białko Wolfgrama; LBP, duże białko zasadowe; SBP, małe białko zasadowe; 6, cytochrom c. Punkty przedstawiają średnie z 20 oznaczeń z podanym błędem standardowym.

The high molecular weight protein ($5.5 \cdot 10^4$ daltons) which as to rate of migration fits the Wolfgram protein (Wolfgram, 1966) in CNS, was poorly represented in sciatic nerve.

Changes in electrophoretic profiles of myelin proteins during ontogenesis of rat sciatic nerve

The protein patterns of PNS myelin changed in the developing sciatic nerve, as illustrated on Figure 3. The SBP increased markedly during development with a concomitant decrease of the LBP during the time span studied (Table 1).

These ontogenetic changes in PNS were not as pronounced as those in various regions of rat CNS (Zgorzalewicz et al., 1974). The relative proportion of labelled tentatively Agrawal protein remained essentially unchanged during ontogeny. The major PNS myelin protein P_0 increased up to the 25th day of life and then decreased slightly in further development. An increase of P_0 up to 15th day was also observed by Wiggins and Benjamins (1975) in rat sciatic nerve myelin. In our study the relative values obtained for this predominant PNS myelin protein were higher than those estimated by Greenfield et al. (1973) for adult P_0 and by Wiggins and Benjamins (1975) for developing PNS myelin. Partially this may be due to different dyes used for staining and may also be a consequence of the loss of high molecular weight proteins after extensive myelin purification. By contrast, Wiggins and Benjamins (1975) showed the existence of many other prominent proteins in PNS, especially in the high molecular weight region of the gels. Thus, these proteins may be partly of axonal origin.

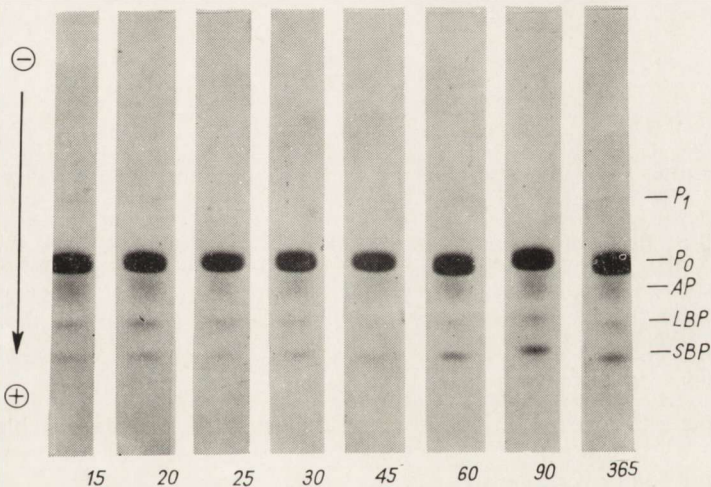


Fig. 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of sciatic nerve myelin proteins from developing rats. Each number refers to postnatal day. Approximately 50 μ g of protein were applied to each gel. Staining with coomassie blue. For symbols see Fig. 2.

Ryc. 3. Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym białek mieliny z nerwu kulszowego rozwijających się szczurów. Liczby oznaczają dni po urodzeniu. Na żele nanoszono po około 50 μ g białka. Barwiono błękitem kumasyny. Oznaczenia jak w ryc. 2.

DISCUSSION

One of the fundamental and necessary events in the normal development of vertebrate nervous system is the formation of a myelin sheath for insulation of the nerve axon. By electron microscopy, myelin

Table 1. Rat sciatic nerve myelin protein composition at various ages
 Tabela 1. Skład białek mieliny nerwu kulszowego szczura w różnym wieku

Myelin protein fraction Frakcja białka mieliny	Days of postnatal age Dni po urodzeniu							
	15	20	25	30	40	60	90	365
	% of total protein % całkowitego białka							
Small basic protein Małe białko zasadowe	4.2	7.3	7.1	7.1	7.3	9.8	11.1	11.4
Large basic protein Duże białko zasadowe	6.1	6.2	5.0	5.3	4.9	5.0	4.1	3.5
Agrawal protein Białko Agrawala	13.0	11.4	8.5	11.2	11.0	11.4	12.0	12.5
Predominant PNS myelin protein Dominujące białko mieliny n. obwodowych	73.6	73.0	77.3	74.3	75.0	72.4	71.4	71.4
Unidentified minor protein Niezidentyfikowane białko śladowe	2.6	1.7	1.7	1.7	1.3	1.2	1.1	0.9
Wolfgram protein Białko Wolfgrama	0.5	0.4	0.4	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3

The results are given in % of total myelin protein. Each data represent the mean of densitometric tracings of four polyacrylamide gels containing SDS. Staining with coomassie blue.

Wyniki przedstawiono w % całkowitego białka mieliny. Dane przedstawiają średnie zapisów densytometrycznych z czterech żeli poliakrylamidowych zawierających SDS. Barwienie błękitem kumasyny.

can already be detected in the sciatic nerve in the 2 day old rat, but only a small amount of myelin is present at this time which is followed by rapid accumulation of myelin over the next 2 weeks (Friede, Samorajski, 1968; Webster, 1971). In our study we observed the presence of the two basic proteins on the 15th day, which is in good agreement with the results recorded by Wood (1973). Kornguth et al. (1966) have observed a positive immune reaction to basic protein antibody preceding the appearance of weigert staining for myelin in the rat spinal cord by 2 days of extrauterine life. The appearance of the basic myelin-type protein immediately before active myelination suggests that the protein may be involved in the initiation of the process. According to Kornguth et al. (1966) this protein, elaborated by the neuron, stimulates the Schwann cell to initiate the winding process.

The PNS myelin basic protein is known to induce an autoimmune disease — experimental allergic neuritis (EAN), when injected with

Freund's complete adjuvant into certain laboratory animals. It is also implicated that the small basic PNS myelin protein is the factor responsible for EAN. In contrast the large myelin protein appears to play in PNS a far less important immunological role (Brostoff et al., 1974). The relative increase of the small basic myelin protein with a markedly decreasing proportion of large basic protein during ontogenetic development of sciatic nerve estimated in the present study may provide a clue to the acquirement of antigenetic properties of PNS myelin.

The major characteristics of PNS myelin which distinguishes it from CNS myelin is the predominant P₀ protein, which comprises 50—70 percent of the PNS myelin protein in all the species studied (Greenfield et al., 1973; Zgorzalewicz et al., 1974; Wiggins, Benjamins, 1975) and which appears to be a glycoprotein (Everly et al., 1973).

The occurrence of glycoprotein in peripheral nerve myelin may have important implications for myelin formation during development because oligosaccharide units of glycoproteins are involved in specific interactions between membranes, taking place during formation of the myelin sheath (Everly et al., 1973).

This glycoprotein consists of a protein moiety to which are attached galactose, mannose, and possibly other sugars. It is antigenically active when administered to guinea pigs and will produce sciatic nerve lesions similar to those described in EAN. It is also suggested from the amino acid analysis and its antigenic properties that the protein moiety of the glycoprotein may contain a sequence which is similar to that of the basic proteins of PNS myelin (Wood, Dawson, 1974).

Although many questions remain to be answered, the problem concerning the significance of the changes in relative proportions in myelin proteins in developing sciatic nerve could be of interest in recognition of the effect of different pathological events occurring at various stages of ontogenetic development.

B. Zgorzalewicz, V. Neuhoff, T. V. Waehneltd

SKŁAD BIAŁKOWY MIELINY OBWODOWEJ
W ROZWOJU ONTOGENETYCZNYM SZCZURA

Streszczenie

Skład białkowy osłonki mielinowej nerwu kulszowego szczura badano stosując elektroforezę na żelu poliakrylamidowym w roztworach buforowych zawierających dodecylu siarczan sodowy. W rozwoju ontogenetycznym elektroforegramy charakteryzowały się występowaniem 6 komponent białkowych. Dominujące białko o masie cząsteczkowej $2.57 \cdot 10^4$ daltonów i dotąd nieznanne białko z $3.89 \cdot 10^4$ daltonów masy cząsteczkowej były jedynie białkami mieliny obwodowego układu

nerwowego, podczas gdy pozostałe podobne były elektroforetycznie do białek występujących w osłonce mielinowej ośrodkowego układu nerwowego.

Ocena ilościowa densytogramów żeli barwionych błękitem brylantowym kumasy wykazała, że skład białkowy mieliny nerwu kulszowego wykazuje różnice zależne od wieku. Dominujące białko mieliny obwodowej ulegało obniżeniu w toku rozwoju ontogenetycznego, z jednoczesnym podwyższeniem komponenty lżejszej białka zasadowego o masie cząsteczkowej $1,38 \cdot 10^4$ daltonów. Znaczenie tych zmian dla nabywania właściwości antygenowych przez białko mieliny obwodowego układu nerwowego jest przedmiotem dyskusji.

B. Zgorzalewicz, V. Нойхофф, Т. В. Вехнелдт

БЕЛКОВЫЙ СОСТАВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО МИЕЛИНА ВО ВРЕМЯ ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗВИТИЯ КРЫСЫ

Резюме

Исследовали белковый состав миелиновой оболочки седалищного нерва крысы с помощью электрофореза на полиакриламидном геле в буферном растворе, содержащем додецилсульфат натрия. В онтогенетическом развитии электрофореграммы характеризовались наличием 6 белковых компонентов. Доминирующий белок с молекулярным весом $2,57 \cdot 10^4$ дальтонов и неизвестный до сих пор белок с молекулярным весом в $3,89 \cdot 10^4$ дальтонов оказались лишь белками миелина периферической нервной системы, в то время как остальные электрофоретически были похожи на белки, выступающие в миелиновой оболочке центральной нервной системы.

Количественная оценка денситограм гелей, окрашенных бриллиантовой синью кумасина показала, что белковый состав миелина седалищного нерва различен в зависимости от возраста. Доминирующий белок периферического миелина в ходе онтогенетического развития, при одновременном повышении более легкого компонента щелочного белка с молекулярным весом $1,38 \cdot 10^4$ дальтонов. Значение этих изменений в приобретении антигенных свойств белком миелина периферической нервной системы является предметом обсуждения.

REFERENCES

1. Adams C. W. M., Bayliss O. B., Hallpike J. F., Turner D. R.: Histochemistry of myelin — XII anionic staining of myelin basic proteins for histology, electrophoresis and electron microscopy. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 389—394.
2. Agrawal H. C., Burton R. M., Fishman M. A., Mitchell R. F., Prenskey A. L.: Partial characterization of a new myelin protein component. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2083—2089.
3. Brostoff S. W., Sacks H., Dal Cante M., Johnson A. B., Raine C. S., Wiśniewski H.: The P₂ protein of bovine root myelin: isolation and some chemical and immunological properties. *J. Neurochem.*, 1974, 23, 1037—1043.
4. Cseytey J., Hallpike J. F., Adams C. W. M., Bayliss O. B.: Histochemistry of myelin. XIV. Peripheral nerve myelin proteins: electrophoretic and histochemical correlations. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 1931—1935.
5. Davison A. N., Duckett S., Oxberry J. M.: Correlative morphological and biochemical studies of the human fetal sciatic nerve. *Brain Res.*, 1973, 58, 327—342.

6. Eng L. F.: Molecular weights of the major myelin proteins. *Fed. Proc.*, 1971, 30, 1248 (abstract).
7. Everly J. L., Brady R. O., Quarles R. H.: Evidence that the major protein in rat sciatic nerve myelin is a glycoprotein. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 329—334.
8. Friede R. L., Samorajski T.: Myelin formation in the sciatic nerve of the rat. A quantitative electron microscopic, histochemical and radioautographic study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 546—570.
9. Greenfield S., Brostoff S., Eylar E. H., Morell P.: Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 1207—1216.
10. Kornguth S. E., Anderson J. W., Scott E.: Temporal relationship between myelinogenesis and the appearance of a basic protein in the spinal cord of the white rat. *J. Comp. Neurol.*, 1966, 127, 1—17.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193, 265—275.
12. Morton W. T.: Recent developments in the investigation of purified myelin. In: *Chemistry and Brain Development*. Eds. F. Paoletti, A. N. Davison. Plenum Press. New York, London, 1971, 327—337.
13. Rawlins F. A., Smith M. E.: Myelin synthesis in vitro: a comparative study of central and peripheral nervous tissue. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 1861—1870.
14. Uyemura K., Tobari C., Hirano S., Tsukada Y.: Comparative studies on the myelin proteins of bovine peripheral nerve and spinal cord. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2607—2614.
15. Waehneltdt T. V., Mandel P.: Isolation of rat brain myelin, monitored by polyacrylamide gel electrophoresis of dodecyl sulfate-extracted proteins. *Brain Res.*, 1972, 40, 419—436.
16. Weber K., Osborn M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 4406—4412.
17. Webster H.: The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J. Cell. Biol.*, 1971, 48, 348—367.
18. Wiggins R. C., Benjamins J. A.: Appearance of myelin proteins in rat sciatic nerve during development. *Brain Res.*, 1975, 89, 99—106.
19. Wolfgram F.: A new proteolipid fraction of the nervous system. I. Isolation and amino acid analyses. *J. Neurochem.*, 1966, 13, 461—470.
20. Wolfgram F., Kotorii K.: The composition of the myelin proteins of the peripheral nervous system. *J. Neurochem.*, 1968, 15, 1291—1295.
21. Wood J. G.: The effects of undernutrition on the proteins of optic and sciatic nerves during development. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 423—429.
22. Wood J. G., Dawson R. M. C.: Some properties of major structural glycoprotein of sciatic nerve. *J. Neurochem.*, 1974, 22, 627—630.
23. Zgorzalewicz B., Neuhoff V., Waehneltdt T. V.: Rat myelin proteins. Compositional changes in various regions of the nervous system during ontogenetic development. *Neurobiology*, 1974, 4, 264—276.

Adress: B. Zgorzalewicz: Department of Neurology Institute of Diseases of the Nervous System and of Sensory Organs, Medical School, 49 Przybyszewskiego Str. 60—355 Poznań, Poland.

ZOFIA ADAMCZEWSKA

MYELIN LIPIDS IN THE DEVELOPING RAT BRAIN *)

Department of Neurology, Institute of Diseases of the Nervous System and of
Sensory Organs, Medical Academy, Poznań, Poland
Head: prof. M. Wender, M. D.

The changes of lipid components of the brain during ontogenetic development of the central nervous system have been described in various animal species: in rat (Cuzner et al., 1965; Wells and Dittmer, 1967; Cuzner and Davison, 1968; Norton and Poduslo, 1973), in quinea pig (Wender, 1965), in mice (Horrocks, 1968; Morell et al., 1972) and in rabbit (Dalal and Einstein, 1969).

It appeared from these studies, that there are no essential differences between the particular animal species with respect to qualitative developmental changes in the myelin lipid composition. In contrary to that, prominent quantitative differences have been observed, particularly in the early periods of myelinogenesis. These differences may be undoubtedly due to the variety of methods used for myelin preparation and analysis as well as to the fact that most authors isolated the myelin fraction from the whole brain. Such myelin fraction is heterogenous with respect to the origin of membranes and the advancement of myelination.

Therefore, this study was undertaken in the aim of analysing the lipid content and composition of myelin fraction from the white matter of rat brain at various periods of ontogenesis.

MATERIAL AND METHODS

White Wistar rats of either sex aged 7, 14, 21, 28, 90 and 120 days were used for the experiment. The animals were killed by decapitation after light ethyl-ether anesthesia, the brains were rapidly removed and weighed. The white matter was separated from the grey mat-

*) This investigation was supported by NIH PL 480 Research Agreement No. 05-027-1.

ter and obtained from the corpus callosum, the cerebral peduncles and the hemispheres. The white matter from brains of animals aged 14, 21 and 28 days was pooled in order to obtain a sufficient amount of material for isolation of the myelin fraction.

The myelin fraction was isolated by ultracentrifugation in a discontinuous sucrose density gradient (1 and 0.8 M sucrose) according to the method of Horrocks (1967). The purity of the fraction was checked in the electron microscope. Lipids were extracted from the myelin fraction by the method of Folch-Pi et al. (1957). The obtained total lipid extract was further separated by means of column and thin-layer uni- and bidirectional chromatography. Protein was determined according to Lowry et al. (1951). A detailed description of the chromatographic and analytic procedures may be found in the paper of Wender et al. (1975).

The developmental changes of lipid components occurring in the myelin were compared with changes of these components in the entire white matter.

The results were subjected to statistic analysis consisting of comparison of the means with the aid of variance analysis and with the Duncan test.

For determination of the myelination peak, the number of age groups was increased, using the brains from animals, aged 14, 17, 21, 25, 28, 60, 90, 120 and 160 days. The degree of myelination was calculated on the basis of myelin output in mg per brain per day. From each age group three parallel determinations were performed. (Fig. 1).

RESULTS

The myelin fraction from seven day old animals was not isolated since it appeared that even 100 brains would not be enough to obtain a sufficient amount of myelin for a single determination. The results concerning the lipid composition of rat brain myelin presented in percent of total myelin lipids indicate an increase of the total galactolipid content from 22% at the 14th day of life up to 32% in adult animals. The increase concerned both fractions of galactolipids, cerebroside and sulphatides. The cerebroside content increased from 18% in 14 day old rats to 23% in adult animals. Sulphatides during the same period increased from 4% to 9%. The reverse was observed with respect to the total phospholipid content, expressed mainly by a decline of phosphatidylcholine content from 20% in 14 day old animals to 15% in adults. Besides these main changes a slight elevation of the plasmalogen content was observed. All the changes were statistically signifi-

Table 1. The lipid composition of rat brain myelin during ontogenic development (in % of total myelin lipids)
 Tabela 1. Skład lipidów mieliny mózgu szczura podczas rozwoju ontogenetycznego (w % ogólnej zawartości lipidów mieliny)

Myelin fraction Frakcja mieliny	14 days dni	21 days dni	28 days dni	90–120 days dni
Protein g/g myelin Bialko g/g mieliny	0.021	0.024	0.041	0.043–0.044
Myelin, mg/brain Mielina, mg/mózg	3.90	23.70	28.30	65.20–82.20
Cholesterol	25.80 ± 0.91	24.60 ± 1.92	22.60 ± 0.70	19.90 ± 3.98
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.60 ± 0.17	1.20 ± 0.35	—	—
Total galactolipid Calkowite galaktolipidy	22.20 ± 0.89*)	23.00 ± 0.62*)	30.20 ± 1.25*)	32.30 ± 3.18*)
Cerebroside Cerebrozydy	18.20 ± 0.91*)	18.40 ± 0.55*)	22.90 ± 0.57*)	23.00 ± 2.94*)
Sulphatide Sulfatydy	4.00 ± 0.38*)	4.50 ± 0.36*)	7.30 ± 0.85*)	9.30 ± 2.20*)
Total phospholipid Calkowite fosfolipidy	51.60 ± 1.38*)	51.30 ± 1.78*)	47.20 ± 1.08*)	47.80 ± 2.49*)
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanoloamina	9.20 ± 0.23*)	8.70 ± 0.50*)	7.20 ± 0.48*)	6.20 ± 0.74*)
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	20.20 ± 1.02*)	18.70 ± 1.55*)	15.90 ± 1.29*)	15.30 ± 0.73*)
Sphingomyelin Sfingomielina	3.10 ± 0.12	3.10 ± 0.39	3.76 ± 0.29	4.30 ± 1.22
Phosphatidylinositol Fosfatydyloinozytol	0.75 ± 0.20	1.00 ± 0.41	1.00 ± 0.67	—
Phosphatidylserine Fosfatydyloseryna	6.20 ± 0.36	5.90 ± 0.58	5.90 ± 0.30	5.90 ± 0.24
Plasmalogens Plazmalogen	12.20 ± 0.49*)	13.90 ± 0.29*)	13.40 ± 0.73*)	16.10 ± 0.49*)

*) The changes with age were all statistically significant at the $P \leq 0.01$ level.
 Zmiany w zależności od wieku były statystycznie istotne przy poziomie istotności $P \leq 0.01$.
 The results are given as a mean ± SD
 Wyniki podano jako średnie ± odchylenie standardowe
 Number of animals in each group: 6
 Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

cant with a significance level of $P < 0.01$ (Table 1). The per cent content of phosphatidylserine remained essentially unchanged throughout the investigated period of ontogenic development.

Table 2. Mole ratios of myelin lipids of rat brain during ontogenic development
Tabela 2. Stosunki molowe lipidów mielin mózgu szczura podczas rozwoju ontogenetycznego

Myelin fraction Frakcje mieliny	14 days dni	21 days dni	28 days dni	90–120 days dni
Cholesterol	100	100	100	100
Cholesterol				
Total galactolipid (GL)	38	39	51	55
Całkowite galaktolipidy				
Cerebroside	33	33	41	41
Cerebrozydy				
Sulphatide	6	7	11	14
Sulfatydy				
Ratio: cerebroside/sulphatide	5.5	4.7	3.7	2.9
Stosunek: cerebrozydów/sulfatydów				
Total phospholipid (PL)	98	96	89	90
Całkowite fosfolipidy				
Phosphatidylethanolamine (PE)	36	35	31	26
Fosfatydyloetanolamina				
Phosphatidylcholine (PC)	37	34	29	28
Fosfatydylocholina				
Sphingomyelin	6	6	7	8
Sfingomieliina				
Phosphatidylinositol	2	1	1	0
Fosfatydyloinozytol				
Phosphatidylserine	11	10	11	11
Fosfatydyloseryna				
Plasmalogens (Plas)	25	28	27	33
Plazmalogen				
Mole ratio	0.97	1.02	1.06	0.92
Stosunek molowy: PE/PC				
Mole ratio	1.02	1.14	1.75	1.96
Stosunek molowy: GL/PC				
Mole ratio	0.25	0.29	0.30	0.36
Stosunek molowy: Plas/PL				
Mole ratio	0.69	0.80	0.87	1.26
Stosunek molowy: Plas/PE				

Data are calculated from values in Table 1.

Wyniki obliczono z danych w tabeli 1.

Cholesterol esters were detected only in the isolated myelin fraction obtained from 14 and 21 day old rats, but not in the remaining age groups.

The results of developmental changes of myelin lipids, calculated on a molar percentage basis, with the cholesterol content taken as 100 are presented in Table 2. As appears from this Table, cholesterol was the dominating lipid in all age groups, followed by phosphatidylethanolamine and cerebroside. In adult animals, cholesterol was followed by cerebroside and then by plasmalogens.

Table 3. The lipids composition of white matter rat brain during ontogenic development (in % of total white matter lipids)

Tabela 3. Skład lipidów istoty białej mózgu szczura podczas rozwoju ontogenetycznego (w % ogólnej zawartości lipidów)

Myelin fraction Frakcje mieliny	7 days dni	14 days dni	21 days dni	28 days dni	90–120 days dni
H ₂ O, % wet. wt. Zawartość H ₂ O w %	87.20	84.83	82.91	80.29	75.41
Cholesterol	22.20 ± 0.66	23.83 ± 1.40	23.42 ± 2.28	20.96 ± 2.05	22.38 ± 0.66
Cholesterol esters Estry cholesterolu	0.20 ± 0.13	0.18 ± 0.00	0.30 ± 0.30	0.32 ± 0.17	—
Total galactolipid Całkowite galaktolipidy (GL)	2.60 ± 0.77*	10.23 ± 0.65*	15.40 ± 3.33*	21.51 ± 2.27*	25.46 ± 1.29*
Cerebroside Cerebrozydy	1.80 ± 0.57*	7.84 ± 0.45*	11.45 ± 2.26*	16.07 ± 1.81*	19.16 ± 1.68*
Sulphatide Sulfatydy	0.80 ± 0.34*	2.39 ± 0.26*	3.95 ± 1.13*	5.44 ± 0.51*	6.30 ± 0.66*
Total phospholipid Całkowite fosfolipidy (PL)	74.90 ± 0.82*	35.75 ± 1.74*	60.89 ± 2.86*	57.40 ± 2.14*	52.18 ± 1.27*
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina	16.90 ± 0.82	13.98 ± 0.38	12.22 ± 0.94	10.27 ± 0.68	10.09 ± 0.46
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	36.90 ± 0.58*	32.01 ± 1.23*	26.55 ± 1.26*	22.88 ± 1.36*	19.01 ± 0.53*
Sphingomyelin Sfingomielina	1.90 ± 0.29*	2.39 ± 0.10*	3.92 ± 0.46*	4.60 ± 0.42*	4.83 ± 0.19*
Phosphatidylinositol Fosfatydyloinozytol	3.00 ± 0.49	1.93 ± 0.23	2.58 ± 0.68	1.91 ± 0.24	1.77 ± 0.22
Phosphatidylserine Fosfatydyloseryna	6.40 ± 0.59	5.17 ± 0.81	4.88 ± 0.46	4.56 ± 0.36	5.04 ± 0.41
Plasmalogens Plazmalogen	9.80 ± 0.20	10.27 ± 0.39	10.94 ± 0.72	13.18 ± 0.88	11.44 ± 0.47

For explanation see Table 1.
Objaśnienia podano w tabeli 1.

Table 4. Mole ratios of white matter lipids of rat brain during ontogenic development
 Tabela 4. Stosunki molowe lipidów istoty białej mózgu szczura podczas rozwoju ontogenetycznego

Myelin fraction Frakcje mieliny	7 days dni	14 days dni	21 days dni	28 days dni	90–120 days dni
Cholesterol	100	100	100	100	100
Total galactelipid (GL)	5	18	29	45	50
Całkowite galaktolipidy					
Cerebroside	3	15	22	35	40
Cerebrozydy					
Sulphatide	1	4	7	10	11
Sulfatydy					
Ratio: cerebroside/sulphatide	3.0	3.75	3.14	3.50	3.63
Stosunek: cerebrozydów/sulfatydów					
Total phospholipid (PL)	165	135	126	134	113
Całkowite fosfolipidy					
Phosphatidylethanolamine (PE)	40	31	27	26	24
Fosfatydyloetanolamina					
Phosphatidylcholine (PC)	80	65	54	52	40
Fosfatydylocholina					
Sphingomyelin	4	5	8	10	10
Sfingomielina					
Phosphatidylinositol	6	4	4	4	3
Fosfatydyloinozytol					
Phosphatidylserine	13	10	9	10	10
Fosfatydyloseryna					
Plasmalogens (Plas)	24	23	24	33	27
Plazmalogen					
Mole ratio:	0.50	0.47	0.50	0.50	0.60
Stosunek molowy: PE/PC					
Mole ratio	0.06	0.27	0.53	0.86	1.25
Stosunek molowy: GL/PC					
Mole ratio	0.14	0.17	0.19	0.24	0.23
Stosunek molowy: Plas/PL					
Mole ratio	0.60	0.74	0.88	1.26	1.12
Stosunek molowy: Plas/PE					

Data are calculated from values in Table 3.

Wyniki obliczono z danych w tabeli 3.

Results concerning the lipid composition of the white matter of rat brain in the respective age groups are presented in Table 3. The most evident changes were seen in the total galactolipids which increased from 2.6% in 7 day old rats to 24% in adult animals. However, the increase of cerebroside and sulphatides was much lower than in the myelin fraction. The other regularly observed change was a decline of the total phospholipid content from 74% at the age 7 days to 52% in adult animals. The decline of the phosphatidylcholine level was much greater than in the myelin fraction. All the above presented changes were statistically significant with the significance level of $P < 0.01$. Phosphatidylserine and cholesterol were the most stable components, their per cent content changing only slightly in the white matter during development. Cholesterol esters were detected in all

age groups except the group of adult animals. As compared to the developmental changes observed in the myelin fraction, in the white matter the plasmalogen level was slightly lower, while the increase of sphingomyelin content was much more pronounced. For comparative purposes the results of lipid composition of the white matter were presented in molar ratios. (Table 4).

The molar content of cerebrosides and sulphatides was much lower in the white matter than in the myelin fraction during the respective periods of development, particularly in 7, 14, 21 and 28 day old animals.

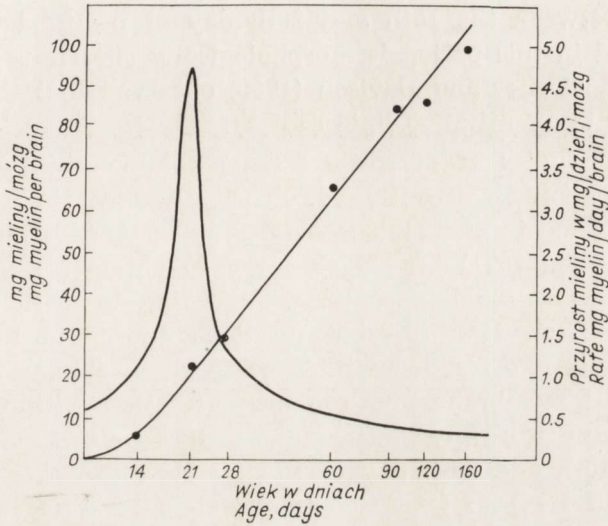


Fig. 1. The accumulation of myelin plotted as a logarithmic function of postnatal age. ● — represents yields of myelin in mg/brain (left ordinate). The rate of accumulation is plotted as a thick curve in mg myelin/day/brain (right ordinate).

Ryc. 1. Odkładanie się mieliny jako funkcja logarytmiczna wieku pozapłodowego. ● — Odpowiada wydajności mieliny w mg/mózg (rzędna po stronie lewej). Stopa przyrostu mieliny zaznaczona grubą linią w mg/dzień/mózg (rzędna po stronie prawej).

Fig. 1 presents myelin accumulation expressed as a logarithmic function of postfetal age. The diagram determined by the left ordinate (absolute myelin content in mg per brain) indicates that the absolute myelin increase per brain is directly proportional to the postfetal age. This type of increase takes place until the adult age, i.e. till the 160th day of life. The diagram determined by the ordinate on the right presents the daily myelin increase. The highest daily myelin increase, that is the peak of myelination, was found to occur on the 21th day of postfetal life with a value of 4.7 mg/day/brain.

DISCUSSION

In several experimental studies concerned with myelinogenesis all the authors agree that myelination is accompanied by changes in the lipid composition of the entire nervous tissue and particularly of the myelin sheath. The main change characteristic for the myelin fraction is the increase of total galactolipids with a simultaneous decline of total phospholipids (Horrocks, 1968; Cuzner and Davison, 1968; Dalal and Einstein, 1969; Norton and Poduslo, 1973).

These changes start at the end of the first decade of postfetal life simultaneously with the onset of myelin sheath formation (Bass and Hess, 1969). Histologically the process of myelination in the rat is the most active between the 15th and 20th day of postfetal life and the myelin formed in this period is morphologically similar to mature myelin. However, Cuzner and Davison (1968) observed that this similarity does not refer to quantitative lipid content.

Biochemical studies of myelin fractions obtained in the initial period of myelination on a continuous density gradient in 0.8 M sucrose and then subjected to osmotic shock (Eng and Noble, 1968; Agrawal et al., 1970; Davison, 1971) proved that the so obtained myelin is poor in cerebrosides and alkaline proteins. According to Norton (1971) this might indicate that two different fractions appear in the immature myelin, a myelin-like fraction with a composition similar to the oligodendroglial cell membrane and the other fraction with the composition resembling mature myelin. Therefore, the myelin fraction obtained between the 10th and 25th day of life by Horrocks et al. (1966) and by Cuzner and Davison (1968) containing less cerebrosides and more phospholipids may represent according to Norton (1971) a mixture of both fractions. Nevertheless, in the later study, Norton and Poduslo (1973) call attention to the fact that in the early period of myelinogenesis, when thin myelin sheaths prevail, consisting of one or two layers, it may be a great problem to distinguish myelin from other membranes. The other fact, causing diagnostic problems, is that most authors isolate myelin from the whole rat brain. Myelin fractions obtained in this way is heterogenous with respect to the origin of membranes.

In order to avoid these difficulties, we isolated the myelin fraction exclusively from the white matter of the brain. The obtained myelin fraction responded well to the biochemical criteria of purity defined by Horrocks (1967) and Smith (1969), i.e. the adequately high plasmalogen content, low lecithin and total phospholipid content, as well as ultrastructural criteria.

The analysis of lipid composition of the white matter during myelinogenesis confirmed the well known fact of significant increase of galactolipids with a simultaneous decline of phospholipids (Robins and Lowe, 1961). Nussbaum et al. (1969) report that deposition of galactolipids during myelinogenesis containing longchain fatty acids may contribute to the stability of myelin membrane structure. At the same time many authors, such as Davison (1968), Kishimoto et al. (1969), De Vries et al. (1972) observed that cerebrosides and sulphatides are present also in non-myelin fractions of the white matter. Norton (1973) achieved postulates that about 30% of the white matter cerebrosides are contained within non-myelin membranes.

The described systematic elevation of the galactolipids content, particularly of cerebrosides, seems to reflect structural changes occurring during maturation of the white matter in all of its components, that is in myelin in axons and in oligodendroglia. However, it must be pointed out that the nature of this elevation is different for the entire white matter, compared with the isolated from myelin fraction. While the galactolipid content of the white matter increases gradually since the early period of myelinogenesis throughout the entire period of development, in the myelin fraction obtained at the age of 14 and 21 day the level of galactolipids is already high, but without any tendency for elevation. At the age of 28 days the galactolipid content is considerably increased reaching a level almost characteristic for adult myelin. This type of increase of galactolipids distinguishing the myelin fraction from the white matter may indicate some qualitative structural changes occurring in the membrane of the myelin sheaths in the period between the 21st and 28th day of postfetal life.

Adams and Davison (1959) described physiological appearance of cholesterol esters in the brain in the early period of myelinogenesis, however, according to these authors this phase of Marchi-positive myelin is short-lasting, characteristic for immature myelin, which later undergoes transformation into mature myelin. Esterification of cholesterol in the myelin fraction during the early period of ontogenic development, as well as the slightly prolonged presence of cholesterol esters in the white matter of rat brain and in the white matter of human brain (Wender et al., 1973, 1974, 1975) may be according to Ramsey and Davison (1974) the reflection of increased biosynthesis of free fatty acids occurring in various components of the white matter.

Another proof for qualitative changes undergoing in the myelin membranes between the 21st and 28th day of postfetal life is the change of the ratio of galactolipids to phosphatidylcholine. This ratio, according to Norton and Poduslo (1973) is a sensitive index of myelin

membrane maturation. In our study it was respectively 1.02 and 1.14 for the myelin of 14 and 21 day old rats, while in the 28 day old myelin it amounted to 1.75 a value close to that characteristic for mature myelin (1.96). In the period of active myelination (21 day) the molar per cent contribution of the most important lipid components formed the following decreasing order: cholesterol, phosphatidylethanolamine, cerebrosides. The same sequence for 28 days old myelin was as follows: cholesterol, cerebrosides, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine. This fact suggest a qualitative differentiation of the myelin membrane during the development which gradually acquires the composition characteristic for mature myelin. This does not mean, however, that at the age of 28 days myelin is structurally completely mature as indicated by the increase of the molar percentage of plasmalogens prolonged over this period. In a completely mature myelin sheath plasmalogens constitute the third, with respect to its quantity lipid component.

The comparison of the results of our investigations on myelin increase with literature data is very difficult due to the heterogeneity of myelin fractions isolated from the whole brain, to the variety of methods of preparation and analysis used by different authors. The occurrence of subpopulations of myelin with different composition is well established (McMillan et al., 1972; Waehneltd and Mandel, 1972) and thus if one of the adopted methods isolated preferably a particular population, then the observed changes cannot be regarded as characteristic for myelin. A higher myelin increase, obtained in this study as compared with the results of Norton (1973) may be explained by the isolation of myelin fraction exclusively from the white matter considerably enriched in myelinated nerve fibres. The observed linear increase of myelin between the 14th and 120th day of life, confirms the opinions of Horrocks (1968), Davison (1971), Morell et al. (1972) that myelin deposition is a process spreading in time, far beyond the period of active myelinogenesis.

The demonstrated changes in lipid composition occurring in the myelin sheath seem to indicate that simultaneously with the quantitative myelin increase over the period of ontogenic development there occur qualitative changes in these membranes, leading to the formation of a structurally mature form.

Z. Adamczewska

LIPIDY MIELINY W ROZWIJAJĄCYM SIĘ MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Badano skład lipidów osłonki mielinowej oraz istoty białej mózgu szczura w różnych okresach ontogenezy. Frakcję mielinową wyodrębniano z nieciągniętego

gradientu gęstości sacharozy drogą wirowania różnicowego. Ilość mieliny była funkcją logarymiczną wieku pozapłodowego i wyrażała jej przyrost bezwzględny w procesie dojrzewania. Szczyt mielinizacji przypadał na 21 dzień życia szczura i wynosił 4,7 mg/dzień/mózg.

Zawartość poszczególnych lipidów mieliny określano ilościowo po rozdziale drogą chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej jedno i dwukierunkowej. W badaniach stwierdzono wzrost ogólnej zawartości galaktolipidów, głównie cerebrosydów i sulfatydów. Odwrotnością tych zmian był spadek ogólnej zawartości fosfolipidów, przede wszystkim frakcji fosfatydylocholinowej. Estry cholesterolu osłonki mielinowej występowały we wczesnym oraz aktywnym okresie mielinogenezy, natomiast w istocie białej mózgu pojawiały się we wszystkich badanych okresach ontogenezy.

Wykazano, że w okresie pomiędzy 21 a 28 dniem życia pozapłodowego dokonują się jakościowe zmiany strukturalne w osłonce mielinowej i że we wczesnym okresie mielinogenezy skład lipidowy podobny jest do składu błony komórkowej oligodendrogleju. W 28 dniu życia skład poszczególnych lipidów mieliny upodabniał się do składu lipidowego dojrzałej błony mielinowej, co może wskazywać na zakończenie jej chemicznego różnicowania się.

З. Адамчевска

ЛИПИДЫ МИЕЛИНА В РАЗВИВАЮЩЕМСЯ МОЗГЕ

Резюме

Исследовали состав липидов миелиновой оболочки, а также белого вещества мозга крысы в различные периоды онтогенеза. Миелиновую фракцию выделяли в градиенте плотности сахарозы путем дифференциального центрифугирования. Количество миелина являлось логарифмической функцией внеутробного возраста и представляло абсолютный его прирост в процессе созревания. Максимум миелинизации достигался на 21 день жизни крысы и равнялся 4,7 мг/день/мозг.

Содержание отдельных липидов миелина качественно определяли после разделения путем хроматографии на колонках тонкослойной одно- и двунаправленной хроматографии. В исследованиях был обнаружен рост общего содержания галактолипидов, в основном церебросидов и сульфатидов. Противоположностью этих изменений было снижение общего содержания фосфолипидов, прежде всего фосфатидилхолиновой фракции. Эфиры холестерина миелиновой оболочки выступали в раннем и активном периодах миелиногенеза, в то время как в белом веществе мозга появлялись во всех исследуемых периодах онтогенеза.

Было показано, что в период между 21 и 28 днем внеутробной жизни происходят качественные структурные изменения в миелиновой оболочке, и что в раннем периоде миелиногенеза липидный состав близок к составу клеточной мембраны олигодендроглии. На 28 день жизни состав отдельных липидов миелина становился похожим на липидный состав зрелой миелиновой мембраны, что может указывать на завершение ее химической дифференцировки.

REFERENCES

1. Adams C. W. M., Davison A. N.: The occurrence of esterified cholesterol in the developing nervous system. *J. Neurochem.* 1959, 4, 282—289.

2. Agrawal H. C., Banik N. L., Bone A. H., Davison A. N., Mitchel R. F., Spohn M.: The identity of a myelin-like fraction isolated from developing brain. *Biochem. J.* 1970, 120, 635—642.
3. Bass N. H., Hess H. H.: A comparison of cerebroside, proteolipid proteins, and cholesterol as indices of myelin in the architecture of rat cerebrum. *J. Neurochem.* 1969, 16, 731—750.
4. Cuzner M. L., Davison A. N., Gregson N. A.: Chemical and metabolic studies of rat myelin of the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1965, 122, 86—94.
5. Cuzner M. L., Davison A. N.: The lipid composition of rat myelin and subcellular fraction during development. *Biochem. J.* 1968, 106, 29—34.
6. Dalal K. B., Einstein E. R.: Biochemical maturation of the central nervous system. I. Lipid changes. *Brain Res.* 1969, 16, 441—451.
7. Davison A. N.: Lipid metabolism of nervous tissue. In: *Applied Neurochemistry*. Eds. A. N. Davison and J. Dobbing. Blackwell, Oxford 1968, 178—221.
8. Davison A. N.: Cellular aspects of neural growth and differentiation. Ed. D. C. Pease. University of California Press 1971, 365—429.
9. DeVries G. H., Norton W. T., Raine C. S.: Axons: Isolation from mammalian central nervous system. *Science* 1972, 175, 1370—1372.
10. Eng L. F., Noble E. P.: The maturation of rat brain myelin. *Lipids* 1968, 3, 157—162.
11. Folch-Pi, Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
12. Horrocks L. A., Meckler R. J., Collins R. L.: In: *Variations in chemical composition of the nervous system*. Ed. C. A. Ansell, Pergamon Press, Oxford, 1966, 46.
13. Horrocks L. A.: Composition of myelin from peripheral and central nervous system of the squirrel monkey. *J. Lipid Res.* 1967, 8, 569—576.
14. Horrocks L. A.: Composition of mouse brain myelin during development. *J. Neurochem.* 1968, 15, 483—488.
15. Kishimoto Y., Agranoff B. W., Radin N. S., Burton R. M.: Comparison of the fatty acids of lipids of subcellular brain fraction. *J. Neurochem.* 1969, 16, 397—404.
16. Lowry O. H., Rosenbrough H. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—275.
17. McMillan P. N., Williams N. J., Kaufman B., Day E. D.: The isolation and biochemical characterization of three subfractions of myelin from central nervous tissue of the adult rat. *J. Neurochem.* 1972, 19, 1839—1848.
18. Morell P., Greenfield S., Costantino-Ceccarini E., Wiśniewski H.: Changes in the protein composition of mouse brain myelin during development. *J. Neurochem.* 1972, 19, 2545—2554.
19. Norton W. T.: In: *Chemistry and brain development*. Ed. R. Paoletti and A. N. Davison. Plenum Press, New York 1971, 327—337.
20. Norton W. T., Poduslo S. E.: Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J. Neurochem.* 1973, 21, 759—773.
21. Nussbaum J. L., Neskovic N., Mandel P.: A study of lipid composition in brain of the „Jimpy” mouse, a mutant with myelin deficiency. *J. Neurochem.* 1969, 16, 927—934.

22. Ramsey R. B., Davison A. N.: Steryl esters and their relationship to normal and diseased human central nervous system. *J. Lipid Res.* 1974, 15, 249—255.
23. Robins E., Lowe J. P.: Quantitative histochemical studies of the morphogenesis of the cerebellum. I. Total lipid and four enzymes. *J. Neurochem.* 1961, 8, 81—95.
24. Smith M. E.: An in vitro system for the study of myelin synthesis. *J. Neurochem.* 1969, 16, 83—92.
25. Waehneltd T. V., Mandel P.: Isolation of rat brain myelin monitored by polyacrylamide gel electrophoresis of dodecyl sulfate-extracted proteins. *Brain Res.* 1972, 40, 419—434.
26. Wells M. A., Dittmer J. C.: A comprehensive study of the postnatal changes in the concentration of the lipids of developing rat brain. *Biochemistry* 1967, 6, 3169—3175.
27. Wender M.: Changes in the content of cerebral lipids during normal development of guinea-pigs and after prenatal X-irradiation. *Folia. biol.* 1965, 13, 323—334.
28. Wender M., Filipek-Wender H., Stanisławska J.: Cholesteryl esters in apparently normal white matter in multiple sclerosis. *Europ. Neurol.* 1973, 10, 240—348.
29. Wender M., Filipek-Wender H., Stanisławska J.: Cholesteryl esters of the brain in demyelinating diseases. *Clin. Chim. Acta*, 1974, 54, 269—275.
30. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Goncerzewicz A.: The lipid composition of brain myelin in experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 209—217.

Author's address: Department of Neurology, Medical Academy, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland.

JÓZEF SZCZECH

MIELINIZACJA UKŁADU LIMBICZNEGO W ROZWOJU ONTOGENETYCZNYM SZCZURA

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów AM
w Poznaniu

Kierownik: doc. dr hab. med. M. Kozik

Wśród dróg nerwowych układu limbicznego wyróżnia się dwie grupy (Zeman, Innes, 1963):

1) drogi łączące poszczególne struktury układu limbicznego, a mianowicie: a) obręcz — łącząca zakręt obręczy z hipokampem, b) prążki podłużne — łączące pole przegrodowe z hipokampem, c) pasmo przekątne Broca — łączące pole przegrodowe i jądro migdałowe.

2) drogi łączące układ limbiczny z innymi częściami mózgu: a) sklepienie — stanowiące połączenie pomiędzy strzępką hipokampa z ciętami suteczkowatymi i podwzgórzem, b) prążek krańcowy — łączący jądro migdałowe z podwzgórzem, c) pęczek przyśrodkowy przodomózgowia — łączący jądro migdałowe, pole przegrodowe i korę czołowo-podstawną ze strukturami podwzgórza i układem siateczkowatym pnia mózgu, d) prążek rdzenny wzgórza — łączący pole przegrodowe z jądrem uzdeczki. Układ tych dróg stanowi zamknięty obwód neuronalny wokół międzymózgowia ze stacjami przekaźnikowo-modulacyjnymi w strukturach jądrowych układu limbicznego.

Badania nad mielinizacją dróg układu limbicznego przeprowadzono ze względu na niejednoczesowe pojawianie się u szczurów różnych stanów emocjonalnych. Celem podjętych badań jest próba korelacji pomiędzy mielinizacją dróg nerwowych układu limbicznego i rozwojem podstawowych reakcji behawioralnych szczura (reakcje pokarmowe, obronne, lęku, agresywności, seksualne).

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na 36 szczurach szczepu Wistar, samicach i samcach, które dekapitowano w 1, 3, 8, 17, 40, i 60 dniu życia postnatalnego. Materiał do badań stanowiło mózgowie, z którego w sta-

nie nieutrwalonym sporządzano skrawki kriostatowe dla oznaczania aktywności dehydrogenaz lub po utrwaleniu w płynie Bakera w temp. 4°C przez 16 godzin, cięto skrawki na mikrotomie mrozeniowym dla oznaczenia aktywności fosfataz i esteraz.

Przeprowadzono badania aktywności następujących enzymów: dehydrogenazy α -glicero-fosforanowej (NAD⁺) — E.L. 1.1.1.8*), dehydrogenazy mleczanowej — E. L. 1.1.1.27, dehydrogenazy β -hydroksymaślanowej — E. L. 1.1.1.30, dehydrogenazy izocytrynianowej — E.L. 1.1.1.41, dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej — E.L. 1.1.1.49, dehydrogenazy bursztynianowej — E.L. 1.3.99.1, dehydrogenazy NADPH — E.L. 1.6.99.1, dehydrogenazy NADH — E.L. 1.6.99.3, tiaminowej pyrofosfatazy — E.L. 2.5.1.3 — według metody Novikoff'a i Goldfischer'a (1961), niespecyficznej esterazy — E.L. 3.1.1.1. — według metody Nachlas'a i Seligmann'a (1949), acetylocholinesterazy — E.L. 3.1.1.7 — według metody Gerebtzoff'a (1953), butyrylotiocholinesterazy — E.L. 3.1.1.8 — według metody Gerebtzoff'a (1953), fosfatazy zasadowej — E.L. 3.1.3.1. — według metody Gomori'ego (1953), fosfatazy kwaśnej — E.L. 3.1.3.2. — według metody Gomori'ego (1953), adenozyntrójfosfatazy — E.L. 3.6.1.3. — według metody Wachstein'a i Meisel'a (1957).

Dla oznaczania aktywności dehydrogenaz stosowano płyn inkubacyjny podstawowy zalecany przez Pearse i Hessa (1961) dla tkanki nerwowej z dodatkiem odpowiednich substratów.

Ponadto część materiału po utrwaleniu w płynie Bakera zatapiano w parafinie lub celoidynie, a sporządzone skrawki barwiono według metod Klüver-Barrera i Woelcke, Nissla oraz hematoksyliną — eożyną.

WYNIKI

W grupie zwierząt 1 i 3 dniowych zwraca uwagę gruba warstwa młodych, nieodróżnicowanych komórek macierzy zlokalizowana podwyściółkowo w otoczeniu układu komorowego (ryc. 1).

W tym okresie życia pozapłodowego nie obserwuje się mieliny w obrębie dróg układu limbicznego, podczas gdy drogi piramidowe i włókna prążkowie są już w trakcie mielinizacji. W drogach układu limbicznego pierwsze włókna zmielinizowane pojawiają się pomiędzy 3 a 8 dniem życia pozapłodowego.

W grupie szczurów 8 dniowych mielina dróg układu limbicznego wybarwia się bardzo słabo. W tym okresie życia zaobserwować można początki mielinizacji w prążku rdzennym wzgórza, prążku krańcowym i w strzępku hipokampa. W strzępku hipokampa widoczne są jeszcze

*) E.L. — numer listy enzymów (Florkin, Stotz, 1973)



Ryc. 1. Migracja niezróżnicowanych komórek macierzy w kierunku strzępka hipokampa i obręczy. Pierwszy dzień życia pozapłodowego. H—E. Pow. 90 ×.

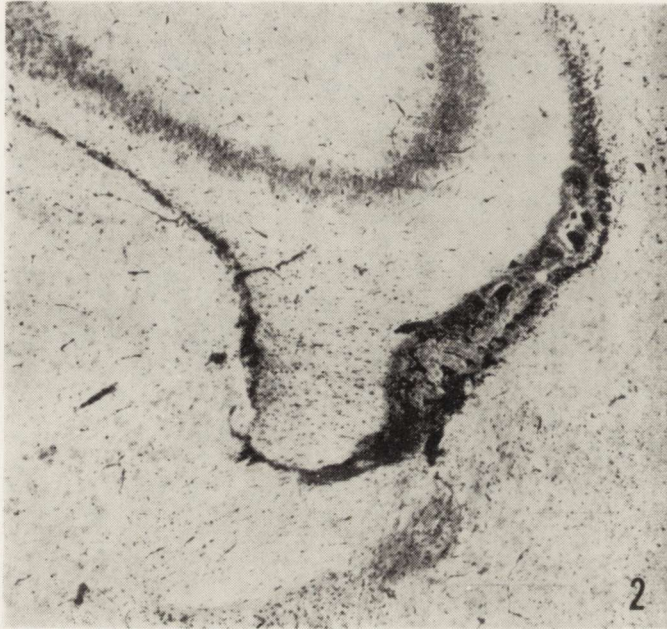
Fig. 1. Migration of undifferentiated matrix cells towards fimbria hippocampi and cingulum. First day of extrafoetal life. H—E. × 90.

liczne młode, niezróżnicowane komórki w postaci medulloblastów i spongioblastów. Równolegle można jednak zaobserwować pasma oligodendroblastów i oligodendrocytów (ryc. 2).

W 17 dniu życia pozapłodowego zwiększa się liczba włókien zmielinizowanych w omawianych strukturach a ponadto pojawia się mielina we włóknach nerwowych obręczy. W dalszym etapie mielinogenezy można zaobserwować systematyczny wzrost intensywności wybarwienia się osłonek mielinowych. W 40 dniu życia osłonniczego widoczne są już dobrze wykształcone osłonki rdzenne we włóknach obręczy (ryc. 3) oraz w strzępku hipokampa, zwraca jednak uwagę bardzo skąpa liczba włókien mielinowych w obrębie prążka krańcowego (ryc. 3). Stopień mielinizacji dróg układu limbicznego w grupie zwierząt 60 dniowych nie ulega wyraźniejszej zmianie.

Dehydrogenaza α -glicero-fosforanowa. Aktywność dehydrogenazy α -glicero-fosforanowej jest widoczna w drogach układu limbicznego szczurów 1 i 3 dniowych w różnicujących się komórkach macierzy. Od 3 do 8 dnia życia pozapłodowego obserwuje się wysoką aktywność tej dehydrogenazy w komórkach gleju mielinizacyjnego i w

ścianach naczyń krwionośnych. W 17 dniu życia pojawia się odczyn w oligodendrogleju i narasta aż do 40 dnia życia. Natomiast u szczurów 60 dniowych aktywność tego enzymu jest słabsza niż u zwierząt 40 dniowych.



Ryc. 2. Obok nieodróżnicowanej warstwy rozrodczej pasma oligodendroblastów i oligodendrocytów. Strzępek hipokampa. Ósmy dzień życia pozapłodowego Woelke. Pow. 90 \times .

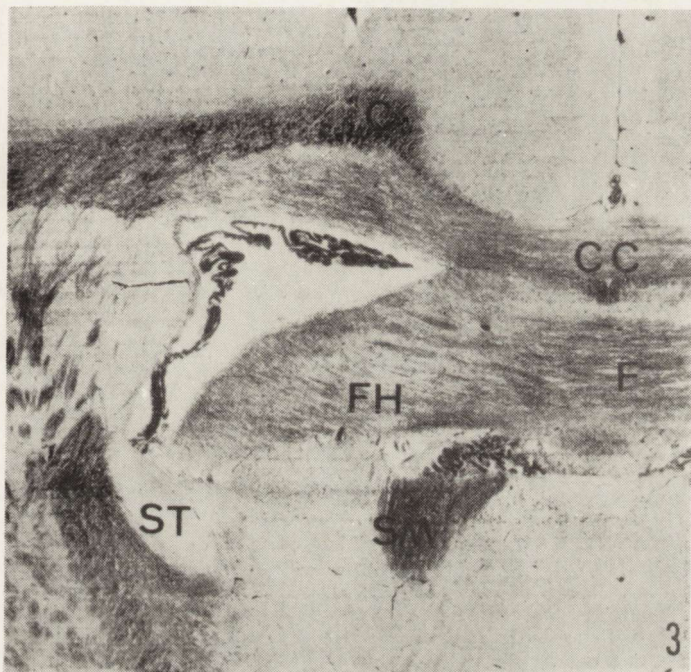
Fig. 2. The bands of oligodendroblasts and oligodendrocytes near undifferentiated matrix cells layer. Fimbria hippocampi. Eight day of extrafoetal life. Woelke. $\times 90$.

Dehydrogenaza mleczanowa. W 1 i 3 dniu życia pozapłodowego aktywność dehydrogenazy mleczanowej jest ograniczona do ścian naczyń krwionośnych dróg układu limbicznego. W grupie zwierząt 8- i 17-dniowych obserwuje się umiarkowaną aktywność tego enzymu w komórkach gleju mielinizacyjnego. W 40 dniu życia umiarkowana aktywność enzymatyczna występuje w oligodendrocytach. Odczyn ten u szczurów 60-dniowych jest nieco słabszy niż w grupie 40-dniowych.

Dehydrogenaza β -hydroksymaślanowa. Do 6 dnia życia pozapłodowego nie obserwuje się w drogach układu limbicznego dodatniego odczynu dla dehydrogenazy β -hydroksymaślanowej. W grupie szczurów 17-dniowych reakcja jest widoczna w oligodendrogleju obręczy i sklepienia. W drogach układu limbicznego enzym ten osiąga największe nasilenie aktywności w 40 dniu życia. Odczyn w oligodend-

rogleju zwierząt 60-dniowych jest nieco słabszy w porównaniu do poprzedniej grupy.

Dehydrogenaza izocytrynianowa. Aktywność tego enzymu pojawia się w naczyniach krwionośnych dróg układu limbicznego w 8 dniu życia pozapłodowego. U szczurów 17-dniowych reakcja jest widoczna w oligodendrocytach i narasta w nich do 40 dnia życia. U zwierząt 60-dniowych nasilenie odczynu w oligodendrogleju jest słabsze.



Ryc. 3. Dobrze wykształcone osłonki rdzenne we włóknach obręczy i strzępku hipokampa oraz nieliczne włókna mieliny w prążku krańcowym. Czterdziesty dzień życia pozapłodowego. Woelke. Pow. 36 \times . Objaśnienia: C — obręcz, CC — spoidło wielkie, F — sklepienie, FH — strzępek hipokampa, SM — prążek rdzenny, ST — prążek krańcowy.

Fig. 3. Well formed medullary sheaths of cingulum and fimbria hippocampi fibres. Few myelinated fibres in stria terminalis. Fortieth day of extrafoetal life. Woelke. \times 36. Explanations: C — cingulum, CC — corpus callosum, F — fornix, FH — fimbria hippocampi, SM — stria medullaris, ST — stria terminalis.

Dehydrogenaza glikozo-6-fosforanowa. Do 8 dnia życia pozapłodowego w drogach układu limbicznego nie występuje dodatni odczyn dla aktywności dehydrogenazy glikozo-6-fosforanowej. W 17 dniu życia obserwuje się aktywność enzymu w oligodendrogleju obręczy i sklepienia. Nasilenie odczynu w oligodendrogleju zwiększa

się u szczurów 40- i 60-dniowych. W grupie zwierząt najstarszych pojawia się także dyfuzyjne zabarwienie wypustek osiowych.

Dehydrogenaza bursztynianowa. Nasilenie odczynu na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej jest w drogach układu limbicznego słabsze niż pozostałych dehydrogenaz. W 8 dniu życia pozapłodowego odczyn jest widoczny w ścianie naczyń krwionośnych. W 17 dniu życia reakcja jest widoczna w oligodendrocytach. W grupie zwierząt 40-dniowych nasilenie odczynu słabnie, a u 60-dniowych reakcja enzymatyczna zanika całkowicie.

Dehydrogenaza NADPH. Aktywność reduktazy tetrazolowej koenzymu II pojawia się w drogach układu limbicznego w 8 dniu życia w ścianie naczyń krwionośnych. Od 17 do 40 dnia życia pozapłodowego dodatni odczyn występuje w oligodendrocytach. Neuroglej szczurów 60-dniowych wykazuje słabszą aktywność tej dehydrogenazy w porównaniu do szczurów 40-dniowych.

Dehydrogenaza NADH. Dodatni odczyn na reduktazę tetrazolową koenzymu I pojawia się dopiero w 17 dniu życia pozapłodowego. Reakcja enzymatyczna jest zlokalizowana w oligodendrocytach i osiąga największe nasilenie w 40 dniu życia pozapłodowego. U zwierząt 60-dniowych nasilenie odczynu w oligodendrogleju słabnie.

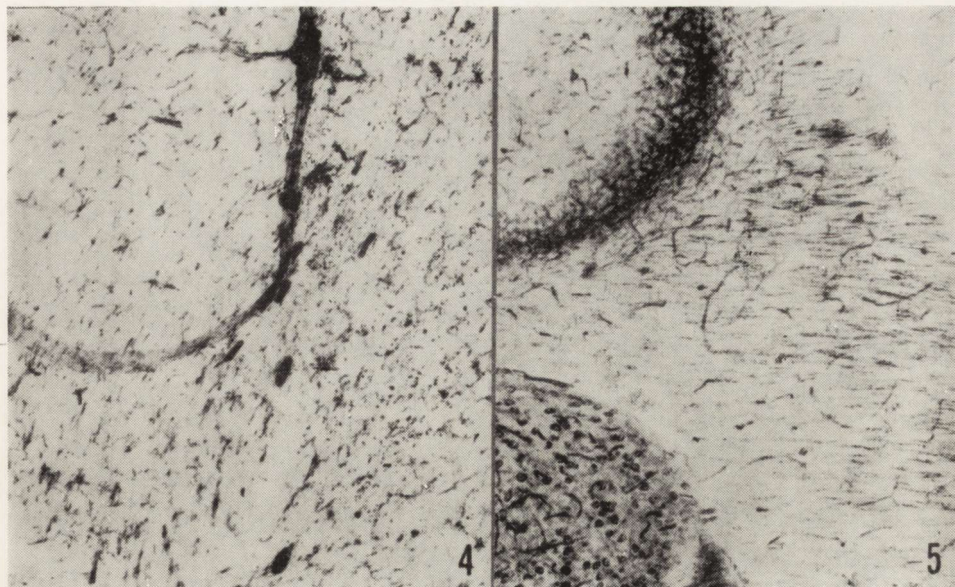
Tiaminowa pyrofosfataza (TPPaza). W grupie szczurów 1- i 3-dniowych aktywność TPPazy obserwuje się w niezróżnicowanych komórkach macierzy, w komórkach wywędrowujących z warstwy rozrodzkiej w kierunku dróg układu limbicznego oraz w ścianach naczyń krwionośnych. Nasilenie odczynu w ścianach naczyń krwionośnych jest intensywniejsze niż w pozostałych elementach strukturalnych.

W 8 dniu życia pozapłodowego największe nasilenie reakcji enzymatycznej występuje w gleju mielinizacyjnym zarówno w strzępku hipokampa jak i w obręczy. Pojedyncze komórki z silną aktywnością TPPazy są jeszcze widoczne w drogach układu limbicznego w 17 dniu życia pozapłodowego. Ponadto widać też wyraźną aktywność TPPazy w dojrzałych oligodendrocytach pomiędzy poszczególnymi włóknami pęczków nerwowych.

W 40 dniu życia osobniczego aktywność TPPazy w drogach układu limbicznego jest zlokalizowana w neurogleju i w ścianach naczyń krwionośnych (ryc. 4).

W 60 dniu życia pozapłodowego narasta reakcja enzymatyczna w naczyniach krwionośnych a słabnie w oligodendrogleju.

Niespecyficzna esteraza (NsE). Po urodzeniu i u zwierząt 3-dniowych aktywność enzymu obserwuje się jedynie w pericytach naczyń krwionośnych. U szczurów 8-dniowych występuje dodatni odczyn w komórkach gleju mielinizacyjnego, który jest słabszy niż w ścianie



Ryc. 4. Aktywność TPP-azy zlokalizowana w neurogleju i w ścianach naczyń krwionośnych. Strzępek hipokampa. Czterdziesty dzień życia pozapłodowego. Pow. 90 \times .

Fig. 4. Activity of TPP-ase localized in neuroglia and in the blood vessel walls. Stria hippocampi. Fortieth day of extrafoetal life. \times 90.

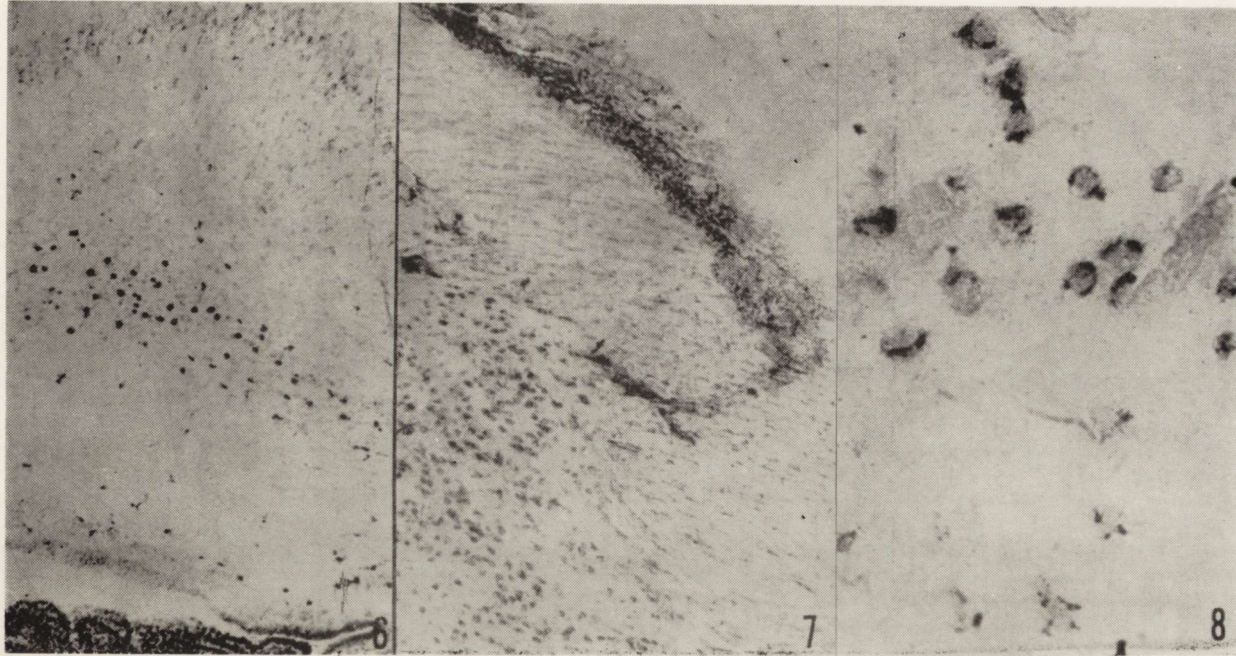
Ryc. 5. Wyraźna aktywność AChE w oligodendrogleju i słaba aktywność we włóknach nerwowych strzępka hipokampa. Czterdziesty dzień życia pozapłodowego. Pow. 90 \times .

Fig. 5. Marked activity of AChE in oligodendroglia and weak enzyme activity in the neuronal processes of stria hippocampi. Fortieth day of extrafoetal life. \times 90.

naczyniowej. Reakcja enzymatyczna u szczurów 17-dniowych ma postać dyfuzyjnego podbarwienia strzępka hipokampa, prążka rdzennego wzgórza oraz obręczy.

W 40 dniu życia pozapłodowego dodatni odczyn obserwuje się w oligodendrogleju strzępka hipokampa, w obręczy i w sklepieniu. W 60 dniu życia narasta stopień aktywności NsE w oligodendrogleju oraz we włóknach dróg układu limbicznego w postaci dyfuzyjnego ich podbarwienia na kolor niebieski.

Acetylocholinesteraza (AChE). Do 17 dnia życia pozapłodowego aktywność AChE występuje tylko w ścianach naczyń krwionośnych. U zwierząt 40-dniowych reakcja enzymatyczna jest widoczna także w oligodendrogleju (ryc. 5). Ponadto w tym okresie udaje się zaobserwować dyfuzyjne zabarwienie wypustek osiowych w strzępku hipokampa i w obręczy (ryc. 5). Dyfuzyjny odczyn w wypustkach osiowych obręczy i strzępka hipokampa zwiększa się znacznie u szczurów



Ryc. 6. Wysoka aktywność FK w komórkach gliozy mielinizacyjnej obręczy. Osmi dzień życia pozapłodowego. Pow. 90 ×.
Fig. 6. High activity of ac. Ph. in the cells of myelination gliosis of cingulum. Eight day of extrafoetal life. × 90.

Ryc. 7. Aktywność FK w oligodendrogleju strzępka hipokampa i w prążku krańcowym. Czterdziesty dzień życia pozapłodowego. Pow. 90 ×.
Fig. 7. Activity of acP. in oligodendroglia of fimbria hipocampi and in the stria terminalis. Fortieth day of extrafoetal life. × 90.

Ryc. 8. Wysoka aktywność ATP-azy w komórkach gliozy mielinizacyjnej obręczy. Ósmi dzień życia pozapłodowego. Pow. 440 ×.

Fig. 8. High activity of ATPase in the cells of myelination gliosis of cingulum. Eight day of extrafoetal life. × 440.

60-dniowych, zmniejsza się natomiast aktywność AChE w oligodendrogleju i w ścianach naczyń krwionośnych.

Butyrylotiocholinesteraza (BuTJ). Od urodzenia do 17 dnia życia pozapłodowego aktywność BuTJ jest ograniczona do ścian naczyń krwionośnych. W grupie szczurów 40- i 60-dniowych w drogach układu limbicznego pojawia się dyfuzyjna aktywność BuTJ w wypustkach osiowych. W grupie zwierząt najstarszych nasilenie odczynu enzymatycznego w ścianach naczyń krwionośnych nieco słabnie w porównaniu z aktywnością BuTJ obserwowaną w 17 dniu życia.

Fosfataza zasadowa (FZ). Aktywność FZ w drogach układu limbicznego występuje w postaci dyfuzyjnej i narasta stopniowo od urodzenia aż do 60 dnia życia. Nasilenie aktywności enzymu u osobników dojrzałych jest jednak umiarkowane. Niekiedy u szczurów 8-dniowych można zaobserwować pojedyncze komórki glejowe, w których natężenie reakcji jest większe.

Fosfataza kwasna (FK). Po urodzeniu widoczna jest silna aktywność FK w komórkach niezróżnicowanej warstwy rozrodczej. Od 3 dnia życia pozapłodowego w obrębie strzępka hipokampa, prążka rdzennego i obręczy pojawiają się komórki o bardzo silnej aktywności FK wywędrowujące z warstwy rozrodczej. Reakcja enzymatyczna w naczyniach krwionośnych jest znacznie słabsza niż w migrujących komórkach glejowych. Natomiast w 8 dniu życia zwraca uwagę bardzo silna aktywność FK w komórkach gleju mielinizacyjnego obręczy (ryc. 6). W 17 dniu życia odczyn na FK występuje w oligodendrocytach dróg układu limbicznego i w ścianach naczyń krwionośnych. W dalszych etapach ontogenezy ma miejsce stopniowy wzrost aktywności FK, osiągając największe nasilenie u szczurów 40-dniowych (ryc. 7). W grupie szczurów 60 dniowych występuje spadek aktywności FK w oligodendrogleju, natomiast w naczyniach krwionośnych aktywność badanego enzymu jest taka sama jak u zwierząt 40-dniowych.

Adenozynotrójfosfataza (ATPaza). U szczurów 1-dniowych aktywność ATPazy jest widoczna w okołokomorowej warstwie rozrodczej i w ścianach naczyń krwionośnych. W 3 i 8 dniu życia pozapłodowego bardzo silną aktywność ATPazy wykazują komórki gleju mielinizacyjnego w istocie białej zakrętu obręczy (ryc. 8) i w strzępku hipokampa. W tym okresie w ścianach naczyń krwionośnych wzrost aktywności ATPazy jest niewielki. W 17 dniu życia pozapłodowego pojawia się odczyn w astrocytach oraz wzrasta aktywność enzymu w ścianach naczyń krwionośnych. U szczurów 40-dniowych uwidacznia się słaba aktywność ATPazy również w oligodendrocytach. W 60 dniu życia nasilenie reakcji na ATPazę nieco słabnie w astrocytach a narasta w oligodendrocytach i w ścianach naczyń krwionośnych.

OMÓWIENIE

Morfologiczne i histoenzymatyczne przemiany towarzyszące mielinizacji dróg układu limbicznego są podobne do przemian występujących w tym procesie w istocie białej innych części mózgu (Wender i wsp., 1971). Mielinizacja dróg układu limbicznego jest poprzedzona okresem migracji nie zróżnicowanych komórek macierzy z przykomorowej warstwy rozrodczej. Podobnie jak w innych częściach mózgu dochodzi potem do tworzenia się skupisk tych komórek w obrębie pęczków włókien układu limbicznego wraz z różnicowaniem morfologicznym od medulloblastów do oligodendroblastów i później oligodendrocytów. Różnicujące się komórki gleju mielinizacyjnego w układzie limbicznym wykazują wysoką aktywność TPPazy, FK, NsE i ATPazy. W dalszych okresach pojawiania się osłonek rdzennych utrzymuje się wysoka aktywność fosfataz i esteraz w oligodendrogleju jak i w astrogleju, osiągając największe nasilenie w drogach układu limbicznego u zwierząt 40-dniowych. Okres najwyższej aktywności enzymatycznej oligodendrogleju występuje równolegle z najintensywniejszym wybarwianiem się mieliny. Po tym okresie nie obserwuje się już wzrostu barwliwości mieliny, natomiast aktywność enzymatyczna w oligodendrogleju nieco słabnie. Spostrzeżenia te wskazują, że mielinizacja układu limbicznego szczura kończy się w 40 dniu życia pozapłodowego.

W porównaniu z innymi strukturami istoty białej mózgu szczura, obserwuje się różnice czasowe w pojawianiu się zarówno gleju mielinizacyjnego jak i włókien zmielinizowanych. Z prac Wendera i Kozika (1968, 1969) przeprowadzonych na szczurach, myszach i królikach wynika, że włókna spoidła wielkiego mózgu oraz włókna drogi piramidowej i prądkowia dojrzewają wcześniej niż włókna dróg układu limbicznego. Występują też różnice czasowe w mielinizacji włókien nerwowych pomiędzy poszczególnymi drogami układu limbicznego. Najwcześniej mielinizują się włókna nerwowe prązka rdzennego wzgórza, prązka krańcowego i strzępka hipokampa, najpóźniej włókna obręczy. Obserwacje te wydają się zgodne ze spostrzeżeniami neurofizjologicznymi (Fangel, Kaada, 1960; Mac Lean, 1958), według których kora obręczy wywiera wpływ na czynności emocjonalne służące raczej zachowaniu socjalnemu i orientacji osobnika w środowisku, niż na czynności wegetatywne służące utrzymaniu jednostki przy życiu.

Na uwagę zasługują też różnice w pojawianiu się aktywności enzymów oksydoredukcyjnych pomiędzy drogami układu limbicznego a innymi strukturami istoty białej mózgu. Wender i wsp. (1971) w badaniach histoenzymatycznych istoty białej mózgu szczura w okresie rozwoju pozapłodowego nie obserwowali aktywności dehydrogenaz w spongioblastach i oligodendroblastach. Aktywność dehydrogenaz była wy-

kazywana przez tych autorów dopiero w dojrzałym oligodendrogleju po 17 dniu życia pozapłodowego. W obrębie dróg układu limbicznego natomiast aktywność dehydrogenazy α -glicero-fosforanowej i mleczanowej występuje w komórkach gleju mielinizacyjnego już od 3 lub 8 dnia życia pozapłodowego. Aktywność pozostałych badanych enzymów oksydoredukcyjnych pojawia się w przebiegu mielinizacji dróg układu limbicznego dopiero w 17 dniu życia pozapłodowego. Zdaniem niektórych autorów (Friede, 1965; Wender i wsp., 1972) aktywność dehydrogenaz jest związana z metabolizmem dojrzałego oligodendrogleju.

WNIOSKI

1. Mielinizacja w obrębie układu limbicznego szczura rozpoczyna się pomiędzy 3 a 8 dniem życia pozapłodowego i kończy się w 40 dniu życia osobniczego.

2. Osłonki mielinowe pojawiają się najwcześniej we włóknach prążka rdzennego wzgórza i w strzępku hipokampa, potem w prążku krańcowym a najpóźniej we włóknach obręczy.

3. Pomędzy 3 a 17 dniem życia pozapłodowego obserwuje się w drogach układu limbicznego wysoką aktywność TPPazy, NsE, FZ, FK i ATPazy.

4. Aktywność dehydrogenaz w drogach układu limbicznego pojawia się od 3 do 17 dnia życia pozapłodowego i wzrasta stopniowo do 40 dnia, a potem nieco spada lub nawet całkowicie zanika.

Ю. Ш ч е х

МИЕЛИНИЗАЦИЯ ЛИМБИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОМ РАЗВИТИИ КРЫСЫ

Исследовался процесс миелинизации путей лимбической системы во время внеутробного развития крысы с целью определения корреляции между появлением миелиновых оболочек и ферментной активности нейроглии.

Исследования были проведены на крысах линии Вистар, которых убивали на 1, 3, 8, 17, 40 и 60 день жизни. На срезах мозга проводили обычное окрашивание и гистохимические реакции для определения степени активности дегидрогеназ, фосфатаз и эстераз.

В результате исследований была обнаружена значительная дифференцировка периода созревания отдельных путей лимбической системы и были выявлены различия в энзиматической активности нейроглии в пучках нервных волокон лимбической системы в разные периоды постэмбрионального периода.

J. Szczech

MYELINATION OF THE LIMBIC SYSTEM IN ONTOGENIC DEVELOPMENT OF RAT

Studies on myelination process of the limbic system pathways were carried out in the course of postfetal development of rat with the aim of establishing

correlation between the appearance of myelin sheaths and enzymatic activity of neuroglia.

The experimental material consisted of Wistar rats which were decapitated in 1, 3, 8, 17, 40 and 60th day of life. Sections of the brain were subjected to histochemical reactions for the evaluation of the degree of dehydrogenases, phosphatases and esterases activity and also stained with routine histological stainings.

As a result of the study distinct differentiation was observed in the period of maturation of various limbic system pathways. Differences were also pointed out in the degree of enzymatic activity in various periods of postembryonal ontogenesis.

PIŚMIENNICTWO

1. Fangel C., Kaada B. R.: Behavior "attention" and fear induced by cortical stimulation in the cat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 1960, 12, 575—538.
2. Florkin M., Stotz E. H.: Enzyme nomenclature. W: *Comprehensive Biochemistry*. Elsevier, Amsterdam, vol. 13, 3rd edit., 1973.
3. Friede R.: Enzyme histochemistry of neuroglia. W: *Biology of neuroglia*. Ed. E. De Robertis. Elsevier, Amsterdam, 1965.
4. Gerebtzoff M.: Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterases. *Acta anat.*, 1953, 19, 336—339.
5. Gomori G.: *Microscopic histochemistry*. Chicago. The University of Chicago Press, 1953.
6. Mac Lean P. D.: The limbic system with respect to self-preservation and the preservation of species. *J. Nerv. ment. Dis.*, 1958, 127, 1—10.
7. Nachlas M., Seligmann A.: The histochemical demonstration of esterases. *J. nat. Cancer Inst.*, 1949, 9, 415—425.
8. Novikoff A., Goldfischer B. S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1961, 47, 802—810.
9. Pearse A. G., Hess R.: Substantivity and other factors responsible for formazan patterns in dehydrogenase histochemistry. *Biochem J.*, 1961, 17, 136—141.
10. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, 27, 13—23.
11. Wender M., Kozik M.: A contribution to the chemoarchitektonics of the basal nuclei and thalamus in developing mouse brain. *Acta anat.*, 1968, 70, 577—591.
12. Wender M., Kozik M.: Histochemistry of enzymes in developing neuroglia. *Folia Morphol.*, 1969, 28, 8—16.
13. Wender M., Kozik M., Mularek O.: Histoenzymology of cerebral white matter in the developing rat brain. *J. Hirnforsch.*, 1971, 3, 223—230.
14. Wender M., Kozik M., Mularek O.: Oxidoreductases in developing neuroglia. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 295—300.
15. Zeman W., Innes R. M.: Limbic system. W: *Craigie's Neuroanatomy of the Rat*. Academic Press, New York and London, 1963.

Adres autora: Samodzielna Pracownia Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów A.M., 60-355 Poznań, ul. Przybyszewskiego 49.

H. HAGER, R. METZ

LICHT- UND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE REGENERATION MARKHALTIGER NERVENFASERN IN AUTOLOGEN UND HOMOLOGEN NERVENTRANSPLANTATEN

Neuropathologisches Institut der Justus Liebig-Universität, Giessen, BRD

Praktische und theoretische Bemühungen um Transplantationen an peripheren Nerven gehen bis in die zweite Hälfte des vorigen Jahrhunderts zurück. Auch die Pathomorphologie der in solchen Transplantaten ablaufenden Prozesse fand frühzeitig Interesse. Von chirurgischer Seite kamen die Dinge in den letzten Jahren durch die Einführung mikrochirurgischer Methoden wieder in Fluss. Es wurde im Verlauf reger Diskussionen von klinischer Seite der Wunsch laut, dass eine weitere Erforschung der Grundlagen erfolge. Doch waren für uns ganz unabhängig von den Kontraversen über bestimmte Transplantationsarten und deren klinischen Prognosen die morphologischen Grundvorgänge der Regeneration peripherer Nerven innerhalb zwischengeschalteter Überbrückungsmedien von grösstem Interesse.

Bei Kaninchen wurden mit mikrochirurgischer Technik 8 autologe und 17 homologe Transplantationen in den Nervus ischiadicus vorgenommen. Ausserdem wurden in 5 Fällen prädegenerierte homologe Nervenstücke interponiert. Die Überlebenszeiten bewegten sich zwischen 3 Wochen und 7 1/2 Monaten. Für die homologen Transplantationen wurden gefriergetrocknete Nervenkonserven ferner für die homologen Transplantationen Interponate benützt, die im Spendertier für Zeiträume von ca. 14 Tagen eine sekundären Degeneration unterworfen worden waren. Die Gewebsuntersuchung erfolgte mit Hilfe des Licht- und des Elektronenmikroskopes.

Wenn auch die sogenannte neuromatöse Neurotisation in unseren autologen Transplantaten recht günstig erschien, so sahen wir auch in den gefriergetrockneten homologen Interponaten fast durchwegs Regeneration und damit auch klinische Restitution. So fand sich an einem

homologen Transplantat nach 9 Wochen ein kollagenfaseriger narbiger Komplex von äusserst unregelmässiger Textur, welcher einer Durchsetzung mit kleinsten Nervenfasern oder Bündeln erkennen lässt, welche im Semidünnschnitt bei höherer lichtmikroskopischer Auflösung noch deutlicher hervortreten (Abb. 1.).

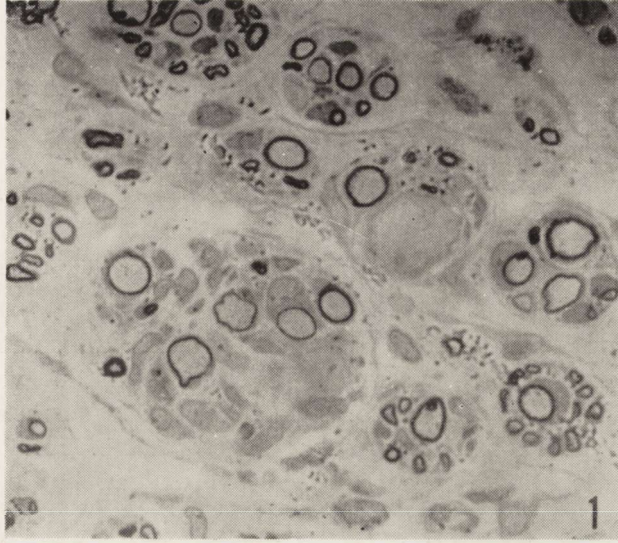


Abb. 1. Homologes Transplantat, Überlebenszeit 4 Wochen. Fasciculäre Gliederung des Regenerates. Es liegen kleine Fascicel vor, welche einige regenerierte Markfasern neben zahlreichen marklosen Fasern enthalten. Die lappenförmigen Fortsätze von Fibrozyten durchziehen das mässig fibrosierte Endoneurium. Semidünnschnitt von eponiegebetteten Material. Paraphenyldiaminfärbung.

Ryc. 1. Przeszczep homologiczny, czas przeżycia 4 tygodnie. Pęczkowe rozczłonkowanie regenerującej tkanki. Widoczne małe pęczki, które zawierają pojedyncze regenerujące włókna rdzenne obok licznych włókien bezdżennych. Płatowate wypustki fibrocytów przeciągają silnie zwłókniałe nerwie. Skrawek półcienki z materiału zatopionego w Eponie. Barwienie parafenyldwuamina.

Elektronenmikroskopisch fanden wir innerhalb der Fascicel von 4 Wochen alten Transplantaten gelegentlich merkwürdige Anordnungen (Abb. 2). So zeigten sich im Cytoplasma einer Schwann'schen Zelle versenkt vier Querschnitte einer myelinisierten Faser, welche alle etwa senkrecht zur Faserachse lagen. Ob es sich dabei lediglich um einen äusserst gewundenen Faserverlauf in einem internodalen Bereich handelt sei dahingestellt. Wie Abbildung 3 zeigt, sind schon in den ersten Wochen Organisation und Fibrosierung des Transplantates weit fortgeschritten; nur zwei Minifascicel enthalten je eine markhaltige und marklose Faser. Die Kollagenfibrillen sind dicht gepackt, sie werden von den Fortsätzen der Fibrozyten septenartig unterteilt. Nach Ablauf mehrere Monate haben sich die Organisationsvorgänge im Trans-

plant konsolidiert. Den perineuralen Anordnungen in homologen Transplantaten haben wir besonderes Interesse geschenkt (Abb. 4). In einem Transplantat nach 4 1/2 Monaten sind Segmente dreier aneinandergrenzender kleiner Fascicel sichtbar, im Endoneurium finden sich reichlich Kollagenfibrillen. Die markhaltigen Fasern sind durchwegs reif, hingegen zeigen die marklosen Elemente sehr kleine Querschnitte. Das Perineurium baut sich aus mehreren Schichten auf, welche spaltförmige Binnenräume einschliessen.

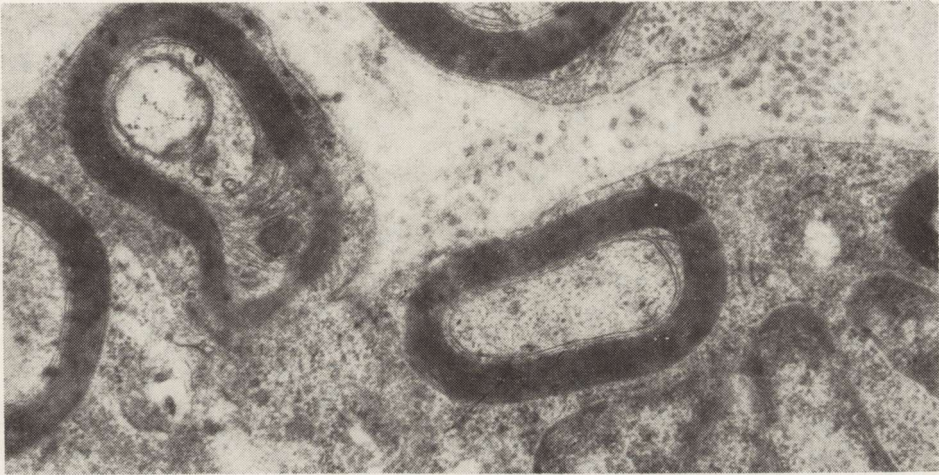


Abb. 2. Homologes Transplantat, Überlebenszeit 4 Wochen. Es finden sich gemeinsam im Cytoplasma einer Schwann'schen Zelle eingebettet vier Querschnitte myelinisierter Fasern von annähernd gleicher Mächtigkeit. $\times 27000$.

Ryc. 2. Przeszczep homologiczny, czas przeżycia 4 tygodnie. W cytoplazmie komórki Schwanna znajdują się 4 przecięte poprzecznie włókna zmielinizowane o zbliżonej średnicy. Pow. 27000 \times .

Die Ergebnisse seien kurz zusammengefasst: zentrale Nekrosen oder Abszedierungen innerhalb des Interponates haben wir bei unseren verschiedenen Transplantatformen in keinem Fall beobachtet. Eine Unhüllung der Transplantate wurde nicht vorgenommen. Es fand auch bei der Mehrzahl unserer Präparate im Rahmen der bindegewebigen Organisation des Transplantates eine gute Revaskularisierung statt. Das Kapillarmuster blieb allerdings irregulär. Celluläre Manifestation von Immunreaktionen fehlten beim homologen Transplantationsmodus weitgehend. Innerhalb von 7 Tagen und länger fanden wir keine ausgeprägten Infiltrationen mit Rundzellen, Plasmazellen und Histozyten.

Sowohl autologe als auch homologe Regeneratstrecken liessen sich kontinuierlich bis in die an das Transplantat anschliessenden distalen

Nervenstrecken verfolgen. Modifikationen der Markscheidenbildung im Transplantat dürften wenige auf eine relative altersbedingte Insuffizienz (Schroeder, 1972) zurückzuführen sein, als vielmehr auf die Auswirkung des bindegewebigen narbenartigen Milieus und auf die unregelmässige Gefässversorgung. Es handelt sich wohl um die Ausbildung von Kümmerformen, wie wir sie auch von anderen in narbigem Milieu



Abb. 3. Homologes Transplantat, Überlebenszeit 4 Wochen. Zwei Minifascicel enthalten je eine einzige myelinisierte Faser und eine marklose Faser, welche von einem mehrschichtigen Perineurium umhüllt sind. Kollagenfibrillen sind im endoneurialen Bereich sichtlich weniger dicht und gleichmässig gepackt als im epineurialen. $\times 5400$.

Ryc. 3. Przeszczep homologiczny, czas przeżycia 4 tygodnie. Każdy z dwóch małych pęczków zawiera pojedyncze włókna zmielinizowane i jedno bezrdzenne, które są otoczone wielowarstwowym nerwiem. Włókna kolagenowe w śródnierwiu są rzadziej i mniej równomiernie ułożone niż w nerwiu. Pow. 5400 \times .

persistierenden Parenchymen kennen. Zerfallsvorgänge an den Eigenstrukturen des Interponates laufen nicht wie schon Bielschowsky und Unger (1917) hervorgehoben haben in Form einer Waller'schen Degeneration ab. Ferner erhielten wir keinen Anhaltspunkt dafür, dass bei autologer Transplantation, Persistenz und virale Reaktionen transplantierter Zellpopulationen eine Rolle spielen. Vielmehr scheint uns der bindegewebige Umbau der Interponate eine wesentliche Voraussetzung für deren Durchwachsung mit regenerierten Nervenfasern zu sein. Wir konnten nicht erkennen, dass präexistente Strukturen wäh-

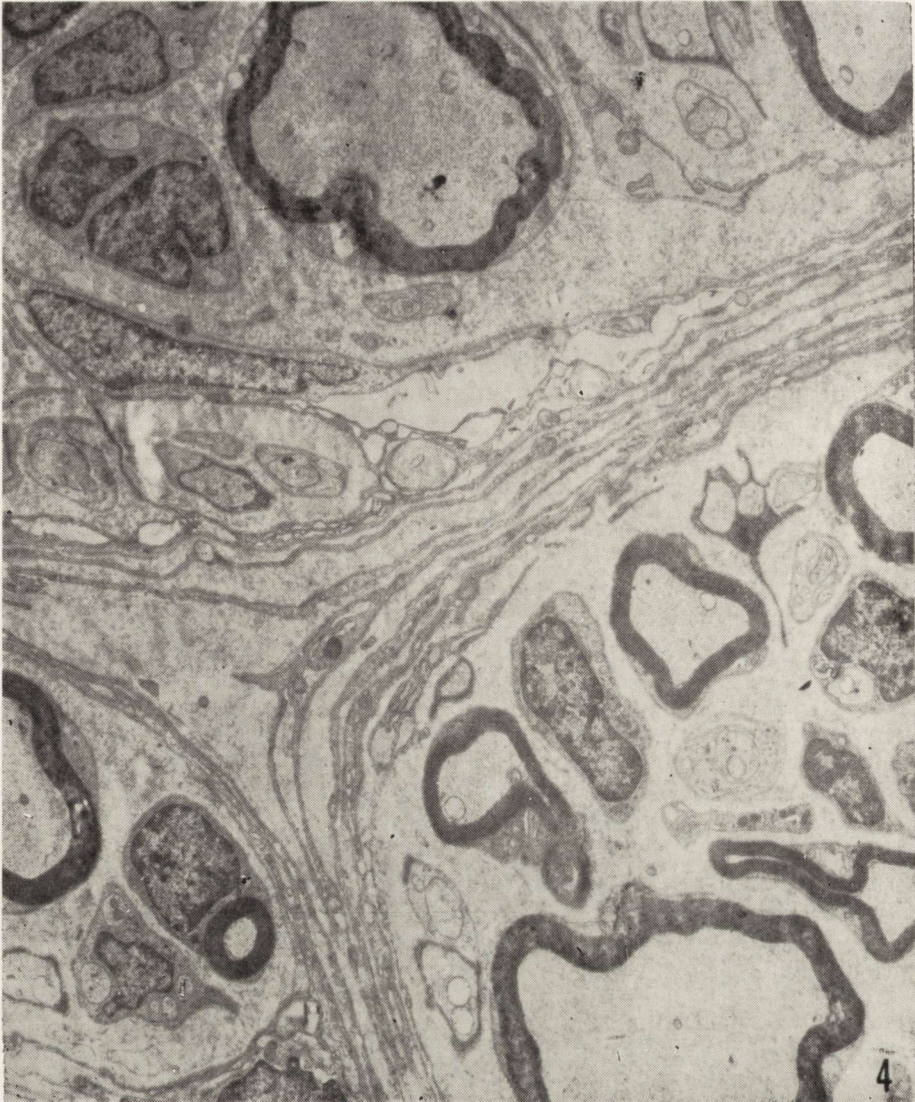


Abb. 4. Homologes Transplantat, Überlebenszeit $4\frac{1}{2}$ Monate. Segmente dreier aneinandergrenzender kleiner Fascicel. Im endoneuralen Raum finden sich reichlich Kollagenfibrillen. Die durchwegs kleinkalibrigen markhaltigen Fasern sind weitgehend ausgereift, die marklosen Fasern sind sehr klein. Das Perineurium baut sich aus mehreren Schichten auf. Zwischen den Lamellen bestehen spaltförmige Binnenräume, welche z.T. auffallend arm an mesenchymalen Produkten sind. $\times 5400$.

Ryc. 4. Przeszczep homologiczny, czas przeżycia $4\frac{1}{2}$ miesiąca. Wycinki trzech graniczących ze sobą małych pęczków. W śródnerwiu znajdują się liczne włókna kolagenowe. Przebiegające włókna rdzenne o małej średnicy wykazują znaczny stopień dojrzałości, włókna bezrdzenne są bardzo małe. Onerwie zbudowane jest z licznych warstw. Pomiędzy lamellami występują szczelinowate przestrzenie wewnętrzne, które są po części wybitnie ubogie w produkty mezenchymalne. Pow. $5400 \times$.

rend irgendeines Prozessesstadiums in den Neurotisationsvorgang leitend oder ordnend eingreifen. Dies gilt auch für die prädegenerierten homologen Transplantate über die einige günstige Berichte vorlagen (Das Guptas, 1967, Cajal, 1928, Sanders, 1954). Die Erwartungen erfüllten sich jedoch nicht. Es zeigte sich innerhalb von 4—6 Wochen eine auffallend starke Fibrosierung des prädegenerierten Interponates, welcher etwa der bei den frischen nicht prädegenerierten Nervenhomotransplantaten entsprach.

Was die perineuralen Hüllen der das Interponat durchziehenden Minifascicel betrifft, so trägt der Zellverband durchgehend Basalmembranen, Desmosomen kommen gelegentlich vor. Anhaltspunkte dafür, dass in diesen Situationen sich Fibrozyten am Aufbau des Perineuriums direkt beteiligen, finden sich nicht.

H. Hager, R. Metz

BADANIA W MIKROSKOPIE OPTYCZNYM I ELEKTRONOWYM
REGENERACJI WŁÓKIEN MIELINOWYCH W PRZESZCZEPACH
NERWOWYCH AUTOLOGICZNYCH I HOMOLOGICZNYCH

Streszczenie

U królików wykonywano przeszczepy autologiczne (8 zwierząt) i homologiczne (17 zwierząt) do nerwu kulszowego posługując się techniką mikrochirurgiczną. Ponadto w 5 przypadkach wszczepiono uprzednio zwyrodniałe, homologiczne wyćinki nerwów. Okres przeżycia wahał się od 3 tygodni do 7 $\frac{1}{2}$ miesiąca. Zarówno w przeszczepach autologicznych jak i homologicznych stwierdzono organizację przeszczepu wychodzącą z otoczenia, unaczynienie, a następnie zwłóknienie. Uprzednio istniejące struktury były ledwie rozpoznawalne. Zmiany w prawidłowym rozwoju osłonek mielinowych, a szczególnie mniejszą grubość osłonek mielinowych w przeszczepie można wiązać głównie z wpływem bliznowacenia otaczającej tkanki. Nierzadko powstawały formy patologiczne. W przeszczepach autologicznych poprzednio istniejące komórki Schwanna nie miały decydującego udziału w procesie uprzątania i regeneracji. We wszystkich typach przeszczepów ilość włókien bezmielinowych w pęczkach włókien była stosunkowo duża w porównaniu do włókien zmielinizowanych. We wszystkich trzech rodzajach przeszczepów tworzenie onerwia było takie samo. Fibrocyty nie tworzyły prawdziwego onerwia. Formy przejściowe w kierunku prawdziwych komórek osłonki ujawniano we wszystkich rodzajach przeszczepów, najczęściej jednak w przeszczepach homologicznych. Po przeszczepieniu zwyrodniałych, homologicznych odcinków nerwów następowała rozległa organizacja ogniska przez włókna kolagenowe. Tworzenie się włókien nerwowych obserwowano pod postacią maleńkich pęczków nerwowych.

Х. Хареф, Р. Метц

ИССЛЕДОВАНИЯ В ОПТИЧЕСКОМ
И ЭЛЕКТРОННОМ МИКРОСКОПЕ РЕГЕНЕРАЦИИ МИЕЛИНОВЫХ ВОЛОКОН
В АУТОЛОГИЧНЫХ И ГОМОЛОГИЧНЫХ ТРАНСПЛАНТАТАХ НЕРВОВ

Резюме

У кроликов выполняли аутологичные (8 животных) и гомологичные (17 животных) пересадки на седалищный нерв, пользуясь микрохирургической техникой. Кроме того, в 5 случаях пересаживали предварительно выродившиеся гомологичные участки нервов. Срок переживания колебался от 3 недель до 7,5 месяцев. Как в аутологичных, так и в гомологичных трансплантатах установлена организация пересаженной ткани, выходящая из окружения, васкуляризация, а затем фиброз. Предварительно имевшиеся структуры были едва различимы. Изменения в нормальном развитии миелиновых оболочек, в частности меньшую толщину последних в трансплантате, можно связывать главным образом с влиянием рубцевания окружающей ткани. Нередко возникали патологические формы. В аутологичных трансплантатах предварительно имевшиеся клетки Шванна не имели решающего участия в процессе убирания и регенерации. Во всех типах трансплантатов количество немиелиновых волокон в пучках было относительно велико по сравнению с миелинизированными волокнами. Во всех трех видах трансплантатов образование периневрия было одинаковым. Фиброциты не образовывали настоящего периневрия. Формы, переходные в направлении настоящих клеток оболочки, обнаружены во всех видах трансплантатов, однако чаще всего в гомологичных пересадках. После пересадки выродившихся гомологичных участков нервов наступала обширная организация очага коллагеновыми волокнами. Образование нервных волокон наблюдали в виде маленьких нервных пучков.

LITERATUR

1. Bielschowsky M., Unger E.: Die Überbrückung grosser Nervenlücken. *J. Psychol. Neurol.*, (Lpz.), 1917, 22, 267—318.
2. Cajal R. Y.: Degeneration and regeneration of the nervous system. Univ. Press, London, 1928, 1, 329—361.
3. Das Gupta T. K.: Mechanism of rejection of peripheral nerve allografts. *Surg. Gynec. Obstet.*, 1967, 125, 1058—1068.
4. Sanders F. K.: Histopathology of nerve grafts. Special Report Series. *Med. Res. Council* Nr 282. Ed.: H. J. Seddan. Her Majesty's Stationery Office, London, 1954, 134—155.
5. Schroeder J. M.: Zur Feinstruktur der Degeneration und Regeneration im peripheren Nerven. *Melsunger Med. Mitt.*, 1972, 46, 37—52.

Adresse der Verfasser: Neuropathologisches Institut der Justus Liebig-Universität, Arndtstrasse 16, 63 Giessen.

DANUTA MAŚLIŃSKA, EKKEHARD THOMAS

A HISTOCHEMICAL STUDY OF MYELIN DEGENERATION IN THE SCIATIC NERVE SEVERED BY COAGULATION

Neurological Institute (Edinger Institute) of the Johann-Wolfgang-Goethe-University and Department of Neuropathology of the Max-Planck-Institute for Brain Research, Frankfurt, BRD

Polish Academy of Science, Medical Research Center, Laboratory of Neuropathology

Changes in myelin during the processes of Wallerian degeneration are due to enzymatic activity (Adams, 1958; Adams, Tuqan, 1961). *In vitro* myelin degeneration can be inhibited by many factors, i.e. low and high temperatures (Nageotte, 1910) or organophosphorus inhibitors of esterase and protease (Wolman, 1968). The present *in vivo* study was performed to see whether the histochemical reactions in a sciatic nerve injured by heat coagulation are different from those caused by transection.

It was assumed that myelin degeneration in a coagulated nerve takes place in another way than usual type of myelin breakdown during secondary degeneration.

Besides, „retrograde reaction” in the motor neurons of the spinal cord was studied; the results are presented elsewhere (Maślińska, Thomas, 1975).

MATERIAL AND METHODS

In immature rats the left sciatic nerve was transected or injured locally above the tibial division by heat coagulation on the 19th day of life. Eight days after operation the rats were decapitated and the site of injury of the sciatic nerve was frozen immediately. Unfixed tissue was cut in a cryostat. Fresh slices were used to investigate the activity of dehydrogenases, whereas for the hydrolases the sections were dried before incubation at room temperature for about 4–15 days.

The dehydrogenases examined as described by Thomas and Pearse (1961) were: succinic dehydrogenase, α -glycerophosphate-menadion-te-

trazolium-reductase, NADH₂-tetrazolium reductase (NAD-diaphorase). Nitro Blue tetrazolium salt was used as electron acceptor; incubation time 30—45 min.

Studied hydrolases were acid phosphatase and acetylcholinesterase (thiocholine method of Koelle et al., modified by Gomori, 1952), incubation time 3—20 hours.

Acid phosphatase activity was examined using following methods: metal salt method of Gomori (1952) and azodye methods (simultaneous coupling) as described by Pearse (1960) with Naphthol AS-TR phosphate and Fast blue B and Naphthol AS-TR phosphate and hexazo-tized pararosaniline; incubation time 45—60 min.

The plasmalogen reaction (after Hayes, according to Pearse 1960) and the OTAN method (Adams, 1959) for myelin lipids were also performed.

RESULTS

Nerve injured by transection

The plasmalogen reaction and OTAN method revealed that myelin structure in the proximal part of the nerve was unchanged 8 days after operation. Near the lesion plasmalogens had disappeared. Disintegration of the myelin sheath was present in the distal part of the nerve undergoing Wallerian degeneration. Activities of the succinic and α -glycerophosphate dehydrogenases were low in the degenerating nerve. NADH₂ tetrazolium reductase was higher near the site of injury than in the rest of the proximal nerve stump.

Strong activity of acid phosphatase was found in the cells of the distal stump, especially near the site of the transection.

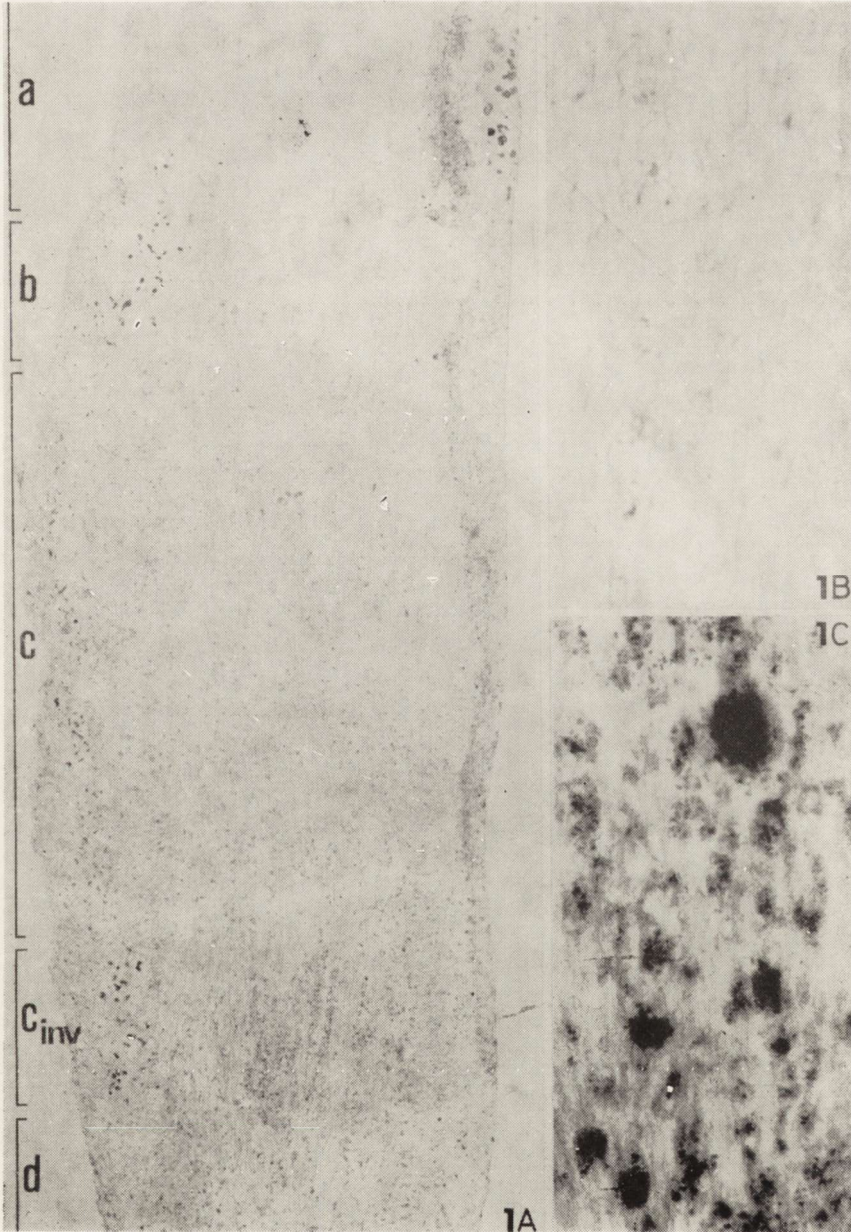
Nerve injured by heat coagulation

The continuity of the nerves injured by heat coagulation was preserved (Figs. 1—3). Five different zones were found in the injured nerve:

Fig. 1. A—C. Ischiadic nerve of a rat, 8 days after coagulation by heat. Letters: see text. Acid phosphatase. A and B: Gomori method. A. Coagulated segment without active macrophages (c). Below (c_{inv}) band of cells exhibiting enzyme activity. There are no active cells originating from the proximal stump (b). \times 40. B. Higher magnification of the coagulated segment (c). \times 300. C. Azodye method. Higher magnification of the zone with numerous macrophages (c_{inv}). \times 300.

Ryc. 1. A—C. Nerw kulszowy 8 dni po koagulacji. Oznaczenia: patrz tekst. Fosfataza kwaśna. A i B: Metoda Gomoriego. A. Koagulowany odcinek nerwu bez aktywnych makrofagów (c). Poniżej pasmo komórek z licznymi aktywnymi komórkami (c_{inv}). Brak aktywnych komórek pochodzących z dosiebnego kikuta (b). Pow. 40 \times . B. Fragment koagulowany (c) Pow. 300 \times . C. Metoda dwuazowa. Warstwa zawierająca liczne makrofagi (c_{inv}). Pow. 300 \times .

(a) the proximal intact nerve, (b) an edematous transition zone, (c) the coagulated segment, (c_{inv} in Fig. 1) a zone of cell invasion within this segment, and (d) the distal part with secondary degeneration. The patterns of enzymatic activities in the proximal (a) and the distal (d) segments equalled the proximal and distal stumps of the transected nerve.



In the "coagulated" part of the nerve the histochemical reactions revealed a different type of myelin degeneration as seen during secondary degeneration. In this segment no cells with discernible acid phosphatase activity could be found by the Gomori-method (Figs. 1 A and B) in spite of the fact that many cells were visible. However, in some

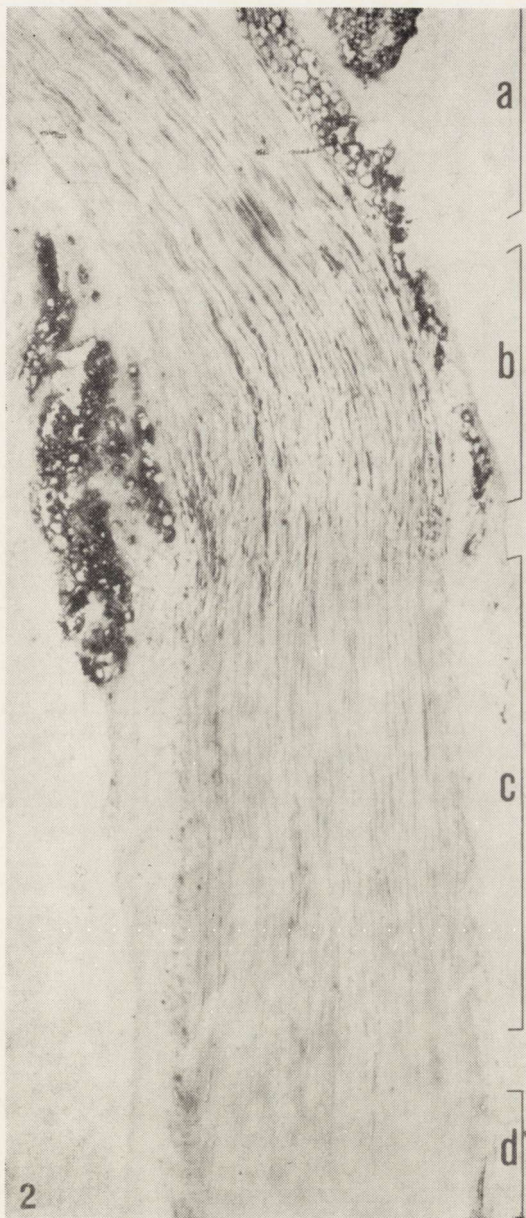


Fig. 2. The same animal as in *Fig. 1.* Acetylcholinesterase. Letters: see text. In the coagulated segment (c) many nerve fibers still preserve enzyme activity. It is lost in the segment with Wallerian degeneration (d). In segment b the distinct staining may be due to an artifact. $\times 40$.

Ryc. 2. To samo zwierzę co na *ryc. 1.* Acetylocholinesteraza. Oznaczenia: patrz tekst. W koagulowanym odcinku nerwu (c) aktywność enzymu w wielu włóknach nerwowych zachowana. Brak aktywności w odcinku nerwu, w którym zachodzi zwyrodnienie Wallera (d). Wyraźne wybarwienie w odcinku b spowodowane artefaktycznie. Pow. $40 \times$.

Schwann cells a low activity of the three dehydrogenases examined could be detected. Activity of acetylcholinesterase was relatively well preserved when one compares it with the enzyme activity in the distal part, where it had disappeared (Fig. 2). In the "coagulated" part of the nerve the reaction for plasmalogens was negative (Fig. 3) and with the OTAN method osmiophilic droplets could not be detected.

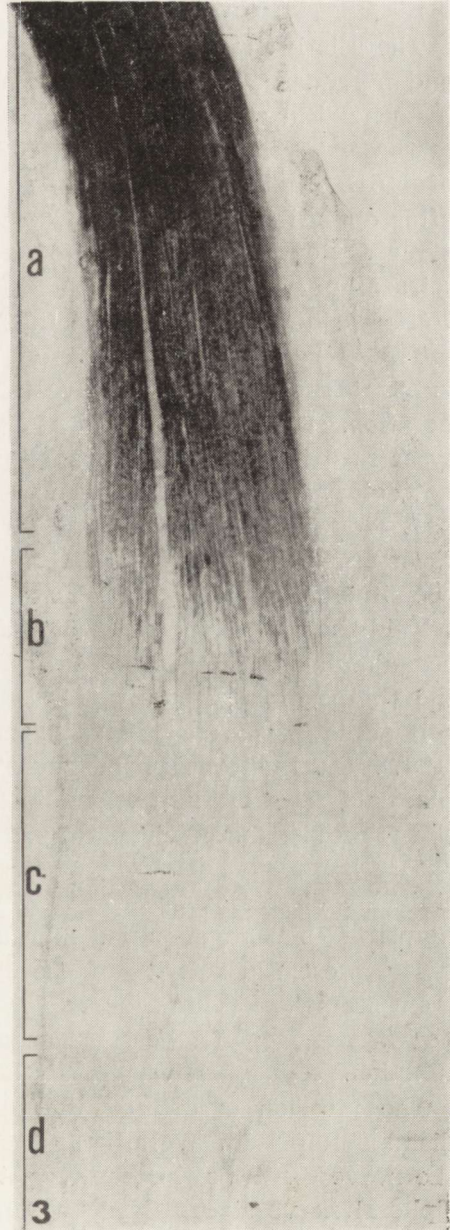


Fig. 3. The same animal as in *Fig. 1.* Plasmalogen reaction. Letters: see text. In the coagulated segment (c) the reaction is negative. In a fascicle with Wallerian degeneration (d) a scarcely positive myelin debris. $\times 40$.

Ryc. 3. To samo zwierzę co na *ryc. 1.* Reakcja plasmalogenowa. Oznaczenia: patrz tekst. Ujemny odczyn w koagulowanym odcinku nerwu (c). Resztki mieliny w pęczkach włókien w trakcie zwyrodnienia Wallera wykazują słabą reakcję dodatnią (d). Pow. 40 \times .

Numerous cells with high acid phosphatase activity were visible in the coagulated part of the nerve, except the distal segment only, forming a broad band (Fig. 1 A and C). This cells band showed also high α -glycerophosphate dehydrogenase and NADH₂ tetrazolium reductase activities.

DISCUSSION

The sciatic nerve of the 6 weeks old rat seems to be well developed and myelinated (Friede, Samorajski, 1968). In our studies most of the histochemical reactions in the nerve injured by transection were similar to those described by Friede (1959) in adult rats. But the high activity of NADH₂ tetrazolium reductase in the proximal stump, eight days after operation, did not coincide with a depletion of the cell body enzyme content as it was found by Friede (1959). An increase of NADH₂ tetrazolium reductase activity in motor neurons of the ipsilateral ventral gray horn was observed (Maślińska, Thomas, 1975).

The process of myelin disintegration which takes place in the "coagulated" segment of the nerve is quite different from secondary degeneration. Here, we did not find cells with high acid phosphatase activity as seen in the macrophages during Wallerian degeneration. We could not detect also osmiophilic droplets which were discovered in the distal part from the coagulated segment. Nevertheless, myelin was changed as emerged from the reaction for plasmalogens, which are the normal constituents of the myelin sheath. These lipids had disappeared completely in the coagulated segment 8 days after coagulation. Two days after coagulation plasmalogens are still visible (Thomas, 1969). It means that the composition of myelin lipids could be changed without enzymatic cell activity. The same was observed in autopsy material by Lindlar (1967). On the other hand eight days after transection remnants of plasmalogens were still visible in the myelin ovoids of the distal stump. Though during secondary degeneration the breakdown of the myelin sheath is already visible by fragmentation and the disappearance of the stainable plasmalogens 2 to 3 days after transection, the complete removal takes a longer period than one week.

The preserved activity of acetylcholinesterase in the coagulated segment seems to be due to a strong resistance of this enzyme to high temperature and cannot be considered as an evidence of unimpaired nerve function.

The invasion of cells exhibiting high enzymatic activities from the distal stump with Wallerian degeneration into the coagulated part of the nerve confirms the known potency for cell proliferation of the peripheral nerve stump (Krücke, 1974). It is astonishing that such a cell

invasion does not take place from the proximal stump which can be assumed to be the "healthy" segment of the damaged nerve. Further confirmation is needed whether such a difference between property of distal and proximal segments exists also in the other stages of this special type of nerve degeneration.

D. Maślińska, E. Thomas

BADANIA HISTOCHEMICZNE ROZPADU MIELINY W KOAGULOWANYM NERWIE KULSZOWYM

Streszczenie

W okresie dojrzewania układu nerwowego u szczura przecinano lub koagulowano nerw kulszowy. Proces rozpadu mieliny w miejscu uszkodzenia nerwu po koagulacji był innego typu niż obserwowany w dystalnej części nerwu (degeneracja Wallera).

Stwierdzono, że w pierwszym tygodniu komórki w koagulowanym fragmencie nerwu nie zawierały fosfatazy kwaśnej. W niektórych komórkach Schwanna występowała słaba aktywność NAD-diaforazy i dehydrogenazy α -glicerofosforanu. Aktywność acetylocholinesterazy była nieznacznie obniżona w porównaniu z aktywnością w prawidłowym włóknie nerwowym. Reakcja na plazmalogeny w mielinie nerwu była negatywna, a w barwieniu metodą OTAN nie obserwowano sudanofilnych produktów rozpadu. Komórki wykazujące wysoką aktywność fosfatazy kwaśnej w obrębie skoagulowanego fragmentu nerwu pochodziły jedynie z kikutu dystalnego.

Д. Маслиньска, Е. Томас

ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПАДА МИЕЛИНА В КОАГУЛИРОВАННОМ СЕДАЛИЩНОМ НЕРВЕ

Резюме

В период созревания нервной системы у крысы перерезали или коагулировали седалищный нерв. Процесс распада миеллина в месте повреждения нерва после коагуляции был иного типа, чем тот, который наблюдали в дистальной части нерва (дегенерация Валлера). Гисто-энзиматические исследования, проведенные в течение первой недели после операции, показали, что клетки в коагулированном фрагменте нерва не содержали кислой фосфатазы. В некоторых клетках Шванна наблюдали слабую активность NAD-диафазы и α -глицерофосфатдегидрогеназы. Активность ацетилхолинэстеразы была незначительно снижена по сравнению с нормальным нервным волокном. Реакция на плазмалогены в миелине была отрицательной, а при окрашивании методом OTAN не наблюдали „neutral fat stage”. Клетки, содержащие высокую активность кислой фосфатазы, перемещались в коагулированный фрагмент нерва только из дистального „обрубка”.

REFERENCES

1. Adams C. W. M.: Histochemical mechanisms of the Marchi reaction for degenerating myelin. *J. Neurochem.*, 1958, 2, 178—186.
2. Adams C. W. M.: A histochemical method for the simultaneous demonstration of normal and degenerating myelin. *J. Pathol. Bact.*, 1959, 77, 648—650.
3. Adams C. W. M., Tuqan N. A.: Histochemistry of myelin. II. Proteins, lipid-protein dissociation and proteinase activity in Wallerian degeneration. *J. Neurochem.*, 1961, 6, 334—341.
4. Friede R. L.: Transport of oxidative enzymes in nerve fibres. A histochemical investigation of the regenerative cycle in neurons. *Exp. Neurology*, 1959, 1, 441—466.
5. Friede R. L., Samorajski T.: Myelin formation in the sciatic nerve of the rat. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 546—570.
6. Gomori G.: *Microscopic Histochemistry, Principles and Practice.* The University of Chicago Press 1952.
7. Krücke W.: Pathologie der peripheren Nerven. In: *Handbuch der Neurochirurgie*, B. VII/3. Peripheres und sympathisches Nervensystem. Eds.: H. Olivecrona, W. Tönnis, W. Krenkel, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1974.
8. Lindlar F.: Zum chemischen Nachweis postmortaler und intravitaler Lipoidveränderungen im Gehirn. *Z. klin. Chem. klin. Biochem.*, 1967, 5, 101—102.
9. Maślińska D., Thomas E.: Enzyme-histochemical studies of "retrograde" reaction in motor neurons of immature rats. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1975, 33, 317—323.
10. Nageotte J.: *Compt. Rend. Acad. Sci.* 1910, 150, 732, acc. to Wolman (1968).
11. Pearse A. G. E.: *Histochemistry theoretical and applied.* J., A. Churchill Ltd., London, 1960.
12. Thomas E.: *Histotopochemie und Histopathochemie des peripheren Nervensystems bei Verletzungen und Tumoren.* G. Fischer. Stuttgart, Jena, 1969.
13. Thomas E., Pearse A. G. E.: The fine localization of dehydrogenases in the nervous system. *Histochemie*, 1961, 2, 266—282.
14. Wolman M.: Diseases of the myelin. In: *Pathology of the nervous system*, Ed.: J. Minckler, Mc Graw — Hill Book Co, New York, 1968, v. 1.

Author's address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur Str., 02—093, Warsaw, Poland.

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

MORFOLOGIA I HISTOCHEMIA USZKODZEŃ GLEJU WYWOŁANYCH CYJANKIEM SODU W HODOWLI TKANKOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski

Zatrucie cyjankiem prowadzi do ciężkich zaburzeń metabolizmu komórki w następstwie blokowania istotnych ogniw wewnątrzkomórkowych przemian tlenowych. Uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego, rozwijające się w doświadczalnym zatruciu cyjankami manifestują się występowaniem ognisk martwicy i demielinizacji (Lumsden, 1950; Levine, 1967, Hirano i wsp., 1967, 1968), którym towarzyszą strukturalne i histochemiczne zmiany neurogleju. Dotychczasowe badania histoenzymatyczne, prowadzone w warunkach *in vivo*, między innymi przez van Hutena i Friede (1963), Ibrahima i wsp. (1963) oraz Wendera i wsp. (1972, 1973) przyniosły niejednorodne, a niekiedy kontrowersyjne spostrzeżenia, uzasadniające odmienną interpretację roli i udziału neurogleju w procesach patologicznych rozwijających się w ośrodkowym układzie nerwowym w następstwie zatrucia cyjankami.

Wydawało się przeto celowe przeprowadzenie serii doświadczeń na tkance glejowej hodowanej *in vitro* oraz przesledzenie w niej zmian strukturalnych i histochemicznych rozwijających się w następstwie jednorazowego krótkotrwałego zatrucia cyjankiem sodu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na hodowli tkankowej mózdków jednodniowych noworodków szczurzych, prowadzonej we flaszkach Carrela w sposób standardowy wg metody opisanej przez Kraśnicką i Mossakowskiego (1965). Wyselekcjonowane hodowle w 7, 14 i 21 dniu przetrzymywania *in vitro* przenoszono do środowiska odżywczego zawierającego cyjanek sodu, w stężeniu końcowym wynoszącym $10^{-3}M$. Dawkę cyjanku wyliczono w oparciu o dane z pracy Ybata i wsp. (1971). Po 1 godzinnym przetrzymywaniu hodowli w medium zawierającym cyjanek, hodowle splukiwano w roztworze wieloelektrolitowym Earla ogrzanym do temp. $37^{\circ}C$ i poddawano bezpośrednio opracowaniu technicz-

nemu, lub przenoszono do standardowego środowiska odżywczego na okres 24 i 72 godzin oraz 7 dni.

Badanie histologiczne obejmowało barwienie błękitem toluidyny oraz impregnację solami srebra wg sposobu Gallyasa hodowli utrwalonych uprzednio w roztworze Carnoya. Reakcję PAS wg Mc Mannusa i PAS-dimedon wg Bulmera (1959) przeprowadzono na hodowlach utrwalonych w płynie Rossmanna. Badanie histoenzymatyczne, wykonane na nie utrwalonych hodowlach obejmowało aktywność dehydrogenazy bursztynianowej (Scarpelli i wsp. 1958), mleczanowej i glukozy-6-fosforanowej (Hess i wsp. 1958), oksydazy cytochromowej (Burstone 1960) oraz fosfatazy kwaśnej wg Gomoriego (Holt i wsp. 1959).

Materiał kontrolny stanowiły hodowle, z tych samych serii co materiał doświadczalny, przetrzymywane w standardowym medium odżywczym i poddawane opracowaniu histologicznemu i histochemicznemu w odpowiednich grupach równocześnie z hodowlami doświadczalnymi.

WYNIKI

Obraz histologiczny

W hodowlach badanych bezpośrednio po zatruciu większość komórek glejowych wykazuje wyraźne osłabienie barwliwości błękitem toluidyny-

Ryc. 1. Obrzmiałe, słabo barwiące się komórki glejowe strefy wzrostu, których cytoplazma zawiera liczne wodniczki. Hodowla 1-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 200 ×.

Fig. 1. Pale, swollen glial cells from the outgrowth zone, containing vacuoles in the cytoplasm; 1-week culture, immediately after cyanide intoxication. Toluidine blue. × 200.

Ryc. 2. Astrocyty ze zwyrodnieniem wodniczkowym cytoplazmy. Hodowla 2-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×.

Fig. 2. Vacuolar degeneration of the astrocytes; 2-week culture, immediately after cyanide intoxication. Toluidine blue. × 400.

Ryc. 3. Komórki glejowe z licznymi wodniczkami w cytoplazmie. Obok dobrze utrzymane komórki. Hodowla 2-tygodniowa po 24 godz od zatrucia cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 200 ×.

Fig. 3. Vacuolar degeneration in some glial cells, the remaining cells with normal morphological picture; 2-week culture, 24 h following cyanide intoxication. Toluidine blue. × 200.

Ryc. 4. „Sygnetowate” komórki glejowe w 3-tygodniowej hodowli w 24 godz. po zatruciu cyjankiem. Błękit toluidyny. Pow. 400 ×.

Fig. 4. „Ring-like” glial cells in 3-week culture, 24 h following cyanide intoxication. Toluidine blue. × 400.

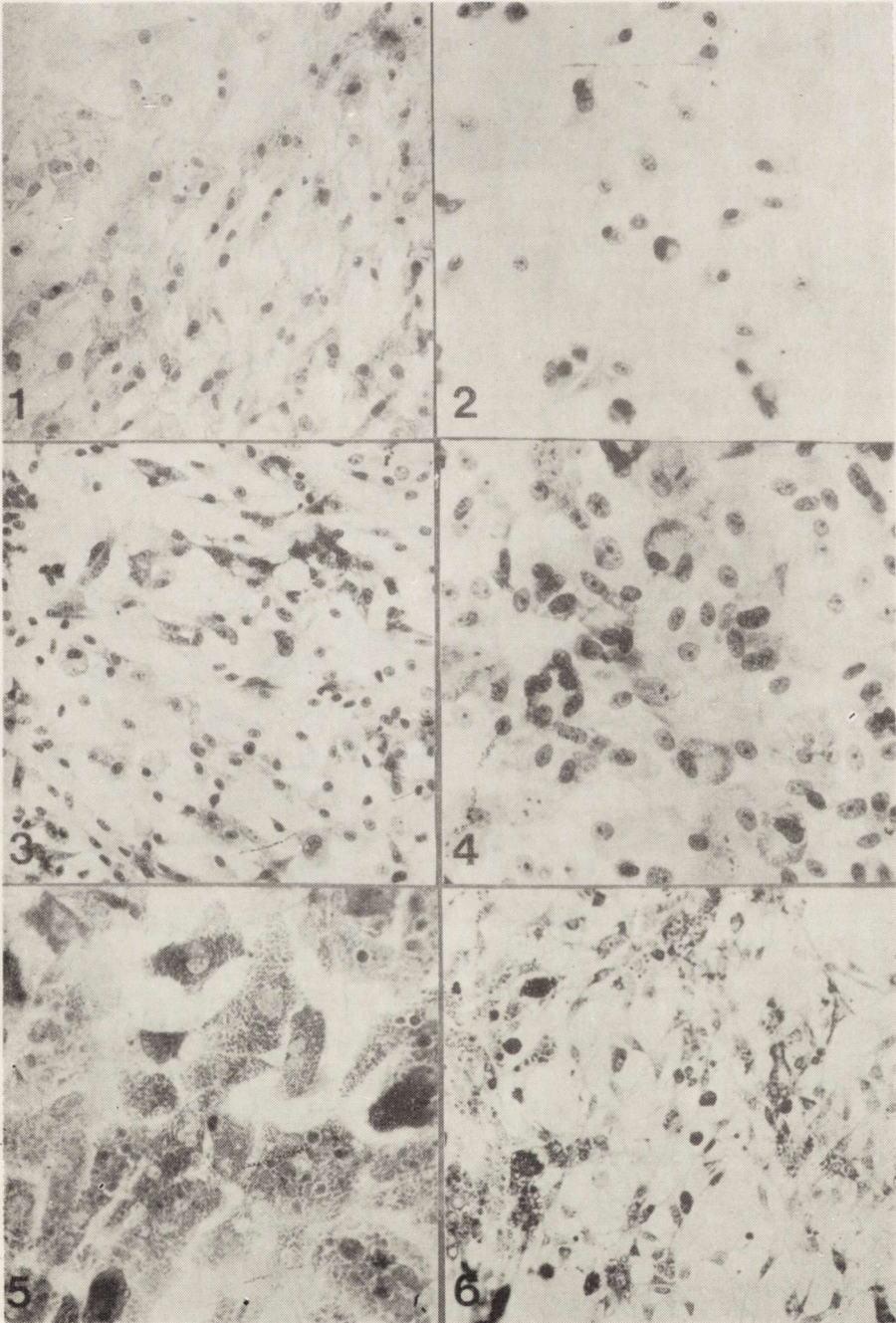
Ryc. 5. Obrzmiałe komórki glejowe z obfitymi PAS-dodatnimi ziarnistościami. Liczne, PAS-dodatnie kuliste twory w cytoplazmie komórek. Hodowla 1-tygodniowa, bezpośrednio po zatruciu cyjankiem. PAS. Pow. 400 ×.

Fig. 5. Swollen astrocytes from 1-week culture immediately after cyanide intoxication, their cytoplasm loaded with PAS-positive granules and globules. PAS. × 400.

Ryc. 6. Kuliste twory PAS-dodatnie w cytoplazmie dobrze utrzymanych astrocytów w hodowli 3-tygodniowej w 3 dni po zatruciu. PAS. Pow. 200 ×.

Fig. 6. PAS-positive globules in morphologically normal astrocytes; 3-week culture, 3 days following intoxication. PAS. × 200.

ny (ryc. 1) i zdolności impregnacyjnych solami srebra. W hodowlach 1- i 2-tygodniowych niemożliwe jest rozróżnienie rodzaju patologicznie zmienionych komórek glejowych, podczas gdy w hodowlach 3-tygodnio-



wych wydaje się, że uszkodzenie w większym stopniu dotyczy oligodendrocytów. Cytoplazma zmienionych komórek glejowych jest obrzmiała i blada. W większości spośród nich ma ona piankowaty wygląd, spowodowany obecnością bardzo licznych, drobnych wodniczek (ryc. 2). Obrysy komórek są zaokrąglone, liczne z nich nie mają wypustek, lub tylko ich krótkie, pogrubiałe fragmenty. Jądra komórkowe są również często obrzmiałe, powiększone i ubogochromatynowe. Już w tym okresie pojawiają się nieliczne komórki „sygnetowate”, charakteryzujące się obwodowym usytuowaniem jądra i zagęszczeniem substancji barwliwej pod błoną komórkową. We wszystkich grupach hodowli zwraca uwagę lepsze utrzymanie komórek eksplantatu. Zjawisko to najwyraźniej występuje w hodowlach 1-tygodniowych, w których prawie cała populacja komórkowa strefy wzrostu jest uszkodzona. W hodowlach starszych bardziej charakterystyczny jest mozaikowy rozkład uszkodzeń.

Hodowle z 24-godzinnym przeżyciem po zatruciu charakteryzuje opisany powyżej wzorec uszkodzeń strukturalnych (ryc. 3). Zmiany wydają się jednakże nieco mniej nasilone. Zwiększa się liczba komórek bezwypustkowych i sygnetowatych (ryc. 4). W hodowlach 2- i 3-tygodniowych zmniejsza się populacja oligodendrocytów. Obecnie są natomiast duże, okrągłe, lub owalne jedno-, rzadziej kilkujądrazyste przerosłe astrocyty. Zwiększa się liczba makrofagów i makrofagopodobnych komórek gwiaździstych.

Ryc. 7. Wysoka aktywność oksydazy cytochromowej w komórkach glejowych w 2-tygodniowej hodowli, bezpośrednio po zatruciu. Pow. 200 ×.

Fig. 7. High cytochrome oxidase activity in glial cells in 2-week culture, immediately after cyanide intoxication. × 200.

Ryc. 8. Prawidłowa aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach glejowych 2-tygodniowej hodowli, bezpośrednio po zatruciu. Pow. 200 ×.

Fig. 8. Normal succinate dehydrogenase activity in glial cells from 2-week culture, immediately after cyanide intoxication. × 200.

Ryc. 9. Wybitnie obniżona aktywność oksydazy cytochromowej w komórkach glejowych w 2-tygodniowej hodowli, po upływie 24 godz. od zatrucia. Pow. 200 ×.

Fig. 9. Pronounced decrease of cytochrome oxidase activity in glial cells from 2-week culture, 24 h following cyanide intoxication. × 200.

Ryc. 10. Wybitne obniżenie aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w populacji komórek glejowych 2-tygodniowej hodowli w 24 godz. po zatruciu. Pow. 100 ×.

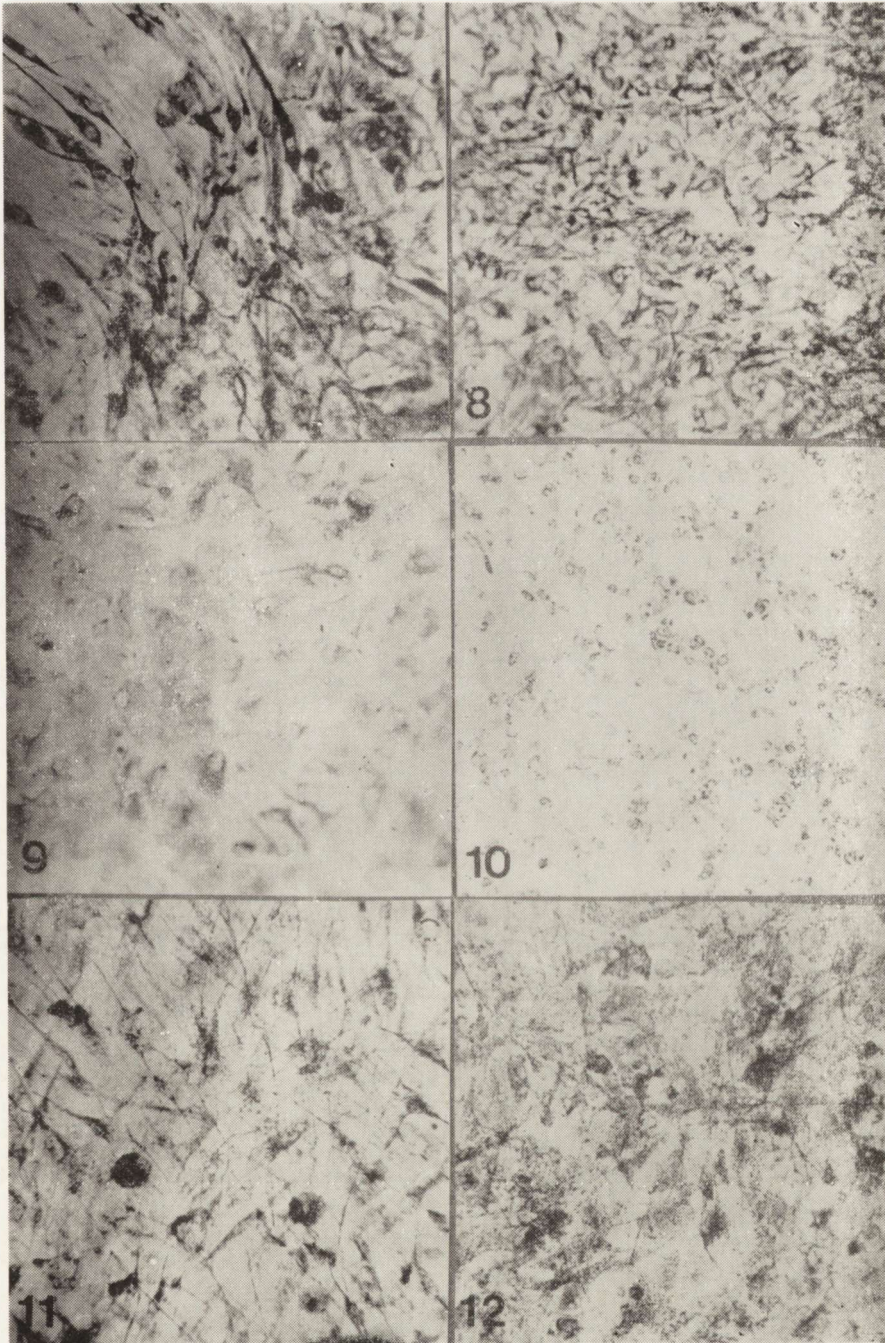
Fig. 10. Remarkable reduction of succinate dehydrogenase activity in glial population from 2-week culture, 24 h following intoxication. × 100.

Ryc. 11. Poprawa aktywności oksydazy cytochromowej w komórkach glejowych w 3-tygodniowej hodowli, w 7 dni po zatruciu. Pow. 200 ×.

Fig. 11. Amelioration of cytochrome oxidase activity in glial cells from 3-week tissue culture, 7 days following cyanide intoxication. × 200.

Ryc. 12. Znaczna poprawa aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach glejowych w 3-tygodniowej hodowli, 7 dni po zatruciu. Pow. 200 ×.

Fig. 12. Remarkable amelioration of succinate dehydrogenase activity in glial cells from 3-week culture, 7 days following cyanide intoxication. × 200.



Po upływie 3 dni od zatrucia we wszystkich grupach hodowli utrzymują się nadal opisane zmiany komórkowe. Obficie występują komórki żerne. Liczba komórek sygnetycznych i bezwypustkowych przerosłych astrocytów jest większa niż w grupach poprzednich. Liczne są jednak również, zwłaszcza w grupie 3-tygodniowej, niezmienione oligo- i astrocyty, obok których obficie występują astrocyty z pojedynczą, pogrubiałą wypustką.

Obraz morfologiczny hodowli z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu zbliżony jest do obrazu hodowli kontrolnych. Wyróżnia się jednak znaczną liczbą komórek żernych i obecnością zwyrodniałych form glejowych. Obok prawidłowych komórek glejowych, typowych dla poszczególnych faz rozwojowych hodowli, występują liczne przerosłe, bez- i wielowypustkowe astrocyty.

Obraz histochemiczny

Zjawiskiem charakterystycznym dla wszystkich hodowli badanych bezpośrednio po zatruciu jest wzrost zawartości ziarnistości PAS-dodatnich w perikariach i wypustkach komórek glejowych. W przeciwieństwie do hodowli kontrolnych, w których występują wyłącznie drobnoziarniste złogi PAS-dodatnie, w komórkach hodowli doświadczalnych obok drobnych ziarnistości, obecne są większe kuliste twory, gromadzące się szczególnie obficie w komórkach bezwypustkowych (ryc. 5). Gromadzenie się ziarnistości PAS-dodatnich w komórkach glejowych z 24-godzinnym przeżyciem po zatruciu nasila się znacznie w grupie 1-tygodniowej, a mniej wydatnie w dwóch pozostałych. Charakterystyczne dla nich jest występowanie gniazd komórek z obfitymi drobnoziarnistymi i kulistymi złoгами PAS-dodatnimi, położonych na tle populacji komórkowej, w której zawartość i charakter ziarnistości PAS-dodatnich nie różni się od kontroli. Szczególnie obfite ziarnistości spostrzega się w drobnych bezwypustkowych komórkach oligodendrocytów. Podobny obraz utrzymuje się w hodowlach z 72-godzinnym przeżyciem po zatruciu, z tym jednak, że w hodowlach 3-tygodniowych liczba komórek z obfitymi ziarnistościami PAS-dodatnimi jest wyraźnie mniejsza (ryc. 6). Po upływie 7 dni tylko w grupie hodowli 1-tygodniowych stwierdza się nadal liczne komórki z obfitymi ziarnistościami. W pozostałych hodowlach ich liczba jest znacznie mniejsza, choć nadal większa niż w odpowiednich kontrolach.

W hodowlach wszystkich grup wieku bezpośrednio po zatruciu i po upływie 24 godzin, nie stwierdza się złogów glikogenu w żadnym typie komórek glejowych, podczas gdy występują one obficie w fibroblastach w grupie z jednodobowym przeżyciem. W hodowlach, które przeżyły 72

godziny i 7 dni po zatruciu pojedyncze przerosłe astrocyty i duże komórki bezwypustkowe zawierają drobnoziarniste złogi glikogenu.

Obraz histoenzymatyczny

We wszystkich grupach hodowli badanych bezpośrednio po zatruciu aktywność trzech dehydrogenaz i oksydazy cytochromowej nie różni się zasadniczo od hodowli kontrolnych (ryc. 7, 8). Cechą wyróżniającą jest jednak odmienność rozkładu końcowego produktu odczynu histoenzymatycznego, wyrażająca się jego nierównomiernym rozmieszczeniem w cytoplazmie komórek zawierających wodniczki oraz zatarcie zróżnicowania śródplazmatycznej lokalizacji produktu między astro- i oligodendrocytami. W hodowlach z 24-godzinnym przeżyciem po zatruciu, niezależnie od ich wieku obserwuje się bardzo niską aktywność wszystkich dehydrogenaz i oksydazy cytochromowej. Wybitny spadek aktywności w porównaniu z grupą poprzednią, obserwuje się zarówno w komórkach uszkodzonych, jak i w tych, które nie wykazują strukturalnych nieprawidłowości. Spadek aktywności dotyczy w największym stopniu dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej (ryc. 9, 10), w znacznie mniejszym dehydrogenazy mleczanowej. Obraz aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glukozy-6-fosforanowej cechuje występowanie rozsianych, pojedynczych komórek, głównie astrocytów z obfitą zawartością złogów produktu końcowego reakcji, na tle ogólnie niskiej aktywności enzymatycznej. Hodowle z 3-dniowym przeżyciem charakteryzuje znaczne zróżnicowanie obrazu aktywności badanych enzymów. Odczyn histochemiczny ujawniający aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej jest nadal słabszy niż w kontroli. Jednakże na tle ogólnie niskiej aktywności, występują stosunkowo liczne komórki, głównie astrocyty z obfitymi złoгами produktu końcowego, wypełniającymi ich perikaria i wypustki. Odczyn ujawniający aktywność dehydrogenazy mleczanowej, a w nieco mniejszym stopniu i glukozy-6-fosforanowej jest znacznie silniejszy niż w grupie poprzedniej. Cechą charakterystyczną jest zróżnicowanie natężenia odczynu od śladowego do wysokiego w licznych komórkach glejowych i bardzo wysokiego w przerosłych astrocytach i komórkach bezwypustkowych. W hodowlach z 7-dniowym przeżyciem nadal utrzymuje się słaby odczyn ujawniający aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej, choć jest ogólnie wyższy niż w grupie poprzedniej (ryc. 11, 12). Zwraca uwagę zróżnicowanie natężenia odczynu między poszczególnymi komórkami glejowymi. Jedyną cechą wyróżniającą hodowle z 7-dniowym przeżyciem od hodowli kontrolnych w obrazie aktywności dehydrogenazy mleczanowej i glukozy-

-6-fosforanowej jest obecność licznych komórek głównie przerosłych astrocytów z histochemicznymi wykładnikami aktywności wyższej niż w normie.

Odczyn wykrywający aktywność nieswoistej fosfatazy kwaśnej w komórkach glejowych bezpośrednio po zatruciu nie różni się od hodowli kontrolnych. Zawartość zlogów produktu końcowego odczynu w poszczególnych komórkach oraz liczba komórek z wysoką aktywnością w hodowlach badanych w okresach późniejszych wzrasta w miarę nasilania się cech zwyrodnieniowych.

OMÓWIENIE

Przedstawione obserwacje wskazują, że krótkotrwałe przetrzymywanie hodowli tkanki glejowej w środowisku zawierającym cyjanek sodu prowadzi do strukturalnego uszkodzenia wszystkich rodzajów komórek glejowych, którego nasilenie wykazuje zależność od wieku hodowli (stopnia jej zróżnicowania), typu komórek a przede wszystkim od czasu przeżycia po zatruciu. Największe nasilenie zmian morfologicznych obserwuje się bezpośrednio po zatruciu i po upływie 24 godzin, choć i w tym czasie są one nierównomierne. W okresie późniejszym pojawiają się odczynowe formy komórkowe. Oligodendrocyty są bardziej uszkodzone niż glej gwiaździsty. Stwierdzone zmiany morfologiczne, wśród których przeważają obrzmienie komórek i ich zwyrodnienie wodniczkowe sugerują zaburzenia w przepuszczalności błon komórkowych, na co między innymi wskazuje obfite gromadzenie się zlogów substancji PAS-dodatnich, które wg Renkawek (1972) stanowi wykładnik przenikania substancji białkowych z medium odżywczego do cytoplazmy komórki. Wydaje się, że zmiany te można wiązać ze stwierdzonym przez Masurowsky'ego i Bunge (1971) oraz Ybatę i wsp. (1971) w zatruciu cyjanekami *in vitro* spadkiem aktywności ATP-az błonowych.

Zmiany powyższe w swoim ogólnym wzorcu przypominają nieprawidłowości stwierdzone w niedotlenieniu (Kraśnicka, Renkawek, 1972) i zatruciu tlenkiem węgla (Hoppe, 1974) tkanki glejowej przetrzymywanej w warunkach hodowli pozaustrojowej. W odróżnieniu od nich zwraca uwagę bardzo skąpe i późne śródkomórkowe gromadzenie się glikogenu. Być może należy to wiązać ze stopniem uszkodzenia komórek. W doświadczalnym niedotlenieniu i zatruciu CO glikogen gromadził się wyłącznie w komórkach nie wykazujących cech morfologicznego uszkodzenia.

Zmianom morfologicznym towarzyszą nieprawidłowości aktywności enzymatycznej badanych dehydrogenaz i oksydazy cytochromowej, stanowiące wykładnik zaburzeń metabolizmu śródkomórkowego. Niepra-

widliwości te wykazują pełną analogię z zaburzeniami stwierdzonymi uprzednio przy zatruciu CO (Hoppe, 1974) i daleko idące podobieństwa do zmian opisywanych przy niedotlenieniu.

Na podkreślenie zasługuje brak upośledzenia aktywności enzymatycznej bezpośrednio po zatruciu, jej późniejszy spadek z następczym powrotem do obrazów prawidłowych, a nawet obecnością odczynowych komórek o aktywności wyższej niż w materiale kontrolnym. Zwraca uwagę również zróżnicowanie nieprawidłowości histoenzymatycznych w zależności od badanych enzymów i nierównomierność nasilenia odczynów histochemicznych w tej samej populacji komórkowej.

Przedstawione obrazy w swoim ogólnym wzorcu zbliżone są do zmian opisanych przez Wendera i wsp. (1973) w materiale *in vivo*. Wydaje się jednakże, że przedstawiona dynamika zmian oraz nierównomierność uszkodzeń w jednolitej populacji komórkowej, z jaką mamy do czynienia w hodowli tkankowej może w pewnej mierze tłumaczyć dyskrepancję obrazów obserwowanych przez Ibrahima i wsp. (1965) z jednej strony, a Wendera i wsp. (1973) z drugiej.

Zestawienie naszych spostrzeżeń z danymi z badań na zwierzęcym materiale doświadczalnym sugeruje, że uszkodzenie neurogleju przez cyjanki może odgrywać istotną rolę patogenetyczną w uszkodzeniach tkankowych ośrodkowego układu nerwowego, a przede wszystkim w rozwoju demielinizacji.

М. Я. Моссаковски

МОРФОЛОГИЯ И ГИСТОХИМИЯ ПОВРЕЖДЕНИЙ НЕВРОГЛИИ, ВЫЗВАННЫХ ЦИАНИДОМ НАТРИЯ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

Резюме

Проведен анализ структурных повреждений и гистохимических аномалий, являющихся результатом действия цианида натрия на невроглию, выращиваемую *in vitro*. Исследования проводили на 7, 14 и 21-дневных органотипичных культурах мозжечка новорожденных крыс, находившихся в течение 1 часа в среде, содержащей 10^{-3} М цианида натрия.

Структурные повреждения как астро-, так и олигодендроцитов зависели от возраста культуры, типа невроглийных клеток, их положения в культуре, а также от времени переживания после отравления. Наиболее существенные изменения имели место в 7-дневных культурах в зоне роста культуры. Олигодендроглия повреждалась сильнее, чем астроциты. Наблюдали набухание цитоплазмы клеток, ее гидропическое вырождение, а также фрагментацию и утрату отростков клеток. В цитоплазме обоих типов клеток невроглии появлялось обильное накопление PAS-положительных субстанций. В гистоэнзиматической картине преобладало снижение активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы, в меньшей степени — глюкозо-6-фосфат- и лактатдегидрогеназы, а также увеличение активности кислой фосфатазы. Наибольшая интенсивность

этих аномалий имела место через 24 часа после отравления. В более поздние сроки картина постепенно нормализовалась, однако, даже по истечении 7 дней активность цитохромоксидазы и сукцинатдегидрогеназы была ниже, чем в контрольном материале. Через 3 и 7 дней после отравления наряду с поврежденными клетками появлялись клетки с гистологическими признаками прогрессирующих изменений.

Результаты исследований указывают на возможность участия повреждений невроглии в формировании тканевых аномалий в центральной нервной системе при остром отравлении цианидом.

M. J. Mossakowski

MORPHOLOGY AND HISTOCHEMISTRY OF GLIA DAMAGE PRODUCED BY SODIUM CYANIDE IN TISSUE CULTURE

Summary

The analysis of structural damages and of histochemical abnormalities resulting from NaCN action on glial tissue cultured *in vitro* was performed. New-born rat cerebellar 7, 14 and 21-days organotopic cultures were incubated for 1 hour in a medium containing 10^{-3} M NaCN.

Structural damages of both astro- and oligodendrocytes depended on the culture age, type of glial cells, their location in the culture and survival time after intoxication. The most advanced changes appeared in 7-days old cultures in the zone of culture growth. Oligodendroglia was damaged more than astrocytes. The swelling of cell cytoplasm, its vacuolar degeneration, as well as the fragmentation and loss of processes were observed. In the cytoplasm of both glial cell types occurred abundant accumulation of PAS-positive substances. In the histoenzymic picture dominated the decrease of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities, to a smaller extent that of glucose-6-phosphate and lactate dehydrogenases, as well as the rise of acid phosphatase activity. The greatest intensification of these abnormalities occurred 24 hours after intoxication. In later periods the picture was gradually normalized, however, even after 7 days the activities of cytochrome oxidase and succinate dehydrogenase were lower than in the control material. On the 3rd and 7th day after intoxication, besides the damaged cells, occurred cells with histological features of progressive changes.

The results of studies point at the possibility of participation of glia damages in the formation of tissue abnormalities in the central nervous system during acute cyanide intoxication.

PIŚMIENNICTWO

1. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking reagent to facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Technology*, 1959, 24, 163—191.
2. Burstone S.: Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new reagents. *J. Histochem. Cytochem.*, 1960, 8, 62—70.
3. Hess R., Scarpelli G. D., Pearse A. G. E.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. Pyridine nucleotide linked dehydrogenase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 753—760.

4. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 200—213.
5. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Remyelination in the central nervous system after cyanide intoxication. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 234—245.
6. Holt S. J.: Factors governing the validity of staining methods for enzymes and their bearing upon Gomori acid phosphatase technique. *Exp. Cell Res.*, 1959, Suppl. 7, 1—28.
7. Hoppe B.: Obraz zmian strukturalnych i histochemicznych gleju hodowanego *in vitro* poddanego działaniu tlenku węgla. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 371—385.
8. Hutten van W., Friede R.: Histochemical studies of experimental demyelination produced with cyanide. *Exp. Neurol.*, 1963, 4, 402—412.
9. Ibrahim M., Philande E., Briscoe B. S. jr., Bayliss O., Adams C.: The relationship between enzyme activity and neuroglia in the prodromal and demyelinating stages of cyanide encephalopathy in the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1963, 26, 479—486.
10. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
11. Kraśnicka Z., Renkawek K.: Wpływ krótkotrwałej anoksji na obraz morfologiczny i histochemiczny tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 507—518.
12. Levine E.: Experimental cyanide encephalopathy. Gradients of susceptibility in the corpus callosum. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 214—222.
13. Lumsden C. E.: Cyanide leucoencephalopathy in rats and observations on the vascular and ferment hypotheses of demyelinating diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1950, 13, 1—15.
14. Masurowsky E. B., Bunge R. P.: Pattern of myelin degeneration following the rapid death of cells in culture of peripheral nervous tissue. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1971, 30, 311—324.
15. Renkawek K.: The histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 307—315.
16. Scarpelli D. G., Hess R., Pearse A. E. G.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1958, 4, 747—752.
17. Ybata Y., Piccoli F., Pappas G. D., Lajtha A.: An electron microscopic and biochemical study on the effect of cyanide and low Na⁺ on rat brain slices. *Brain Research*, 1971, 30, 137—158.
18. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Histoenzymology of experimental cyanide encephalopathy. *Acta histochem.*, 1972, 43, 361—371.
19. Wender M., Kozik M., Wajgt A.: Late changes in the enzymatic activity of the neuroglia as a sequel to acute hydrogen cyanide encephalopathy. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1973, 11, 213—220.

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

ZUZANNA KRAŚNICKA, ALEKSANDER PRZYBYLSKI

POANOKSYJNE ZMIANY POTENCJAŁU SPOCZYNKOWEGO
KOMÓREK NERWOWYCH I OSŁONKOWYCH ZE ZWOJÓW
KRĘGOWYCH HODOWANYCH *IN VITRO*

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr M. J. Mossakowski
Zespół Neurofizjologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik Zespołu: prof. dr W. Karczewski

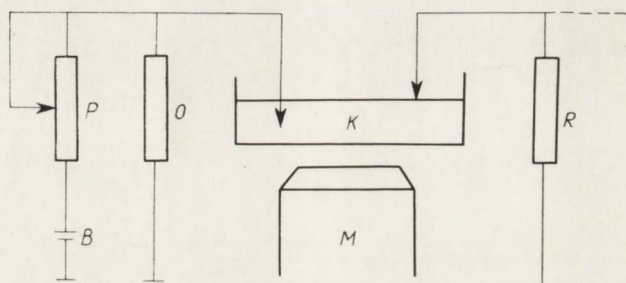
Czynność mózgu jak i poszczególnych neuronów *in situ* jest uwarunkowana międzyneuronalnymi wpływami pobudzającymi oraz wielkością potencjału spoczynkowego pojedynczych neuronów. Wykazano, że w czasie niedotlenienia zmienia się czynność pojedynczych neuronów *in situ* (Creutzfeldt i wsp., 1957; Fernandez-Guardiola i wsp., 1962; Cross, Silver 1963; Przybylski, 1971) i *in vitro* (Giacobini, Przybylski 1971), a także ich potencjał spoczynkowy (Hillman, Hyden 1965).

W celu pominięcia wpływów międzyneuronalnych oraz uniknięcia trudności metodycznych wewnątrzkomórkowej rejestracji oddzielnych neuronów *in situ* zdecydowano przebadac potencjał spoczynkowy komórek nerwowych, przeżywających w hodowli *in vitro*. W pierwszym etapie badań scharakteryzowano wielkość potencjału spoczynkowego komórek zwojów międzykręgowych embrionów kurzych w okresie ich dojrzewania *in vitro*. W drugim etapie prześledzono wpływ niedotlenienia na stan polaryzacji elektrycznej komórek nerwowych.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano na hodowlach zwojów międzykręgowych pobieranych z 9-dniowych zarodków kurzych. Hodowle prowadzono według metody opisanej przez Kraśnicką (1969). Hodowle 2, 3 i 4 tygodniowe przenoszono do zmodyfikowanych flaszek Carrela i przetrzymywano przez okres 30 minut w atmosferze azotu (Kraśnicka i wsp., 1967). Badano potencjał błonowy komórek z hodowli prowadzonych w warunkach standardowych, bezpośrednio po niedotlenieniu i po 24 godzinach od wyjęcia z atmosfery azotu.

Pomiary potencjału wykonywano pod kontrolą wizualną używając odwróconego mikroskopu typu MOD 2 firmy PZO. Potencjał błonowy mierzono za pomocą mikroelektrody szklanej (około $1\ \mu\text{m}$, 4–8 Mohm), wprowadzanej do komórki przy użyciu mikromanipulatora firmy Zeiss (Jena). Mikroelektroda jak i elektroda obojętna były wypełnione 3 M roztworem KCl z agar-agarem i połączone galwanicznie z pochlorowaną elektrodą srebrną. Potencjał badanej komórki wzmacniano przy użyciu wzmacniacza prądu stałego o oporności wejściowej 10^{12} ohma i odczytywano bezpośrednio jego wielkość na zakresie minimalnych wartości napięć na woltomierzu cyfrowym typu V 529 firmy ELPO. Zastosowany w doświadczeniu schemat układu rejestracyjnego pomiaru potencjału błonowego komórki przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Schemat układu pomiaru potencjału błonowego kultury tkankowej (K) w medium inkubacyjnym. M — obiektyw mikroskopu. R — oporność wejścia układu. O — oporność układu kompensacyjnego. P — potencjometr układu kompensacji. B — bateria.

Fig. 1. The schema of the set-up for measurement of the membrane potential of the tissue culture (K) in the incubation medium. M — objective of the microscope. R — input resistance of the amplifier. O — resistance of the compensation set-up. P — potentiometer of the compensation set-up. B — battery.

WYNIKI

W czasie badania potencjału błonowego komórek obserwuje się zmiany morfologiczne wywołane przez nakłucia elektrodą. Zmiany te polegają na obkurczaniu się błony komórkowej i zmniejszaniu powierzchni komórek. Równoległe do tych zmian stwierdzano obniżanie się potencjału błonowego przy kilkakrotnym, a nawet już przy powtórnych nakłuciu błony komórkowej neurocytu.

W trakcie badań zwróciliśmy uwagę na obniżanie się wartości potencjału spoczynkowego komórek zwojowych wraz z przedłużaniem czasu pomiarów. Fakt ten skłonił nas do rejestrowania wyników tylko w ciągu 1 godziny dla pojedynczej hodowli. W obliczeniu średniego potencjału błonowego opieraliśmy się jedynie na pierwszym uzyskanym pomiarze.

Stwierdzono, że potencjał błonowy neuronów zmienia się w zależności od wieku hodowli. Wykazuje on najwyższą wartość w hodowli najstarszej 4-tygodniowej, osiągając dla neurocytów średnią wartość 37,7 mV, a dla amficytów 17,2 mV. Niższa wartość potencjału spoczynkowego charakteryzuje mniej dojrzałe komórki z hodowli 3-tygodniowej: odpowiednio 20,0 mV i 11,3 mV. Najniższą wartość potencjału błonowego wykazują komórki nerwowe i osłonkowe z hodowli 2-tygodniowej: 8,5 mV i 5,2 mV.

Tabela I. Wartość potencjału spoczynkowego (mV) neuronów zwojów międzykręgowych w normie w zależności od wieku oraz odpowiednio po anoksji

Table 1. The value of the resting potential (mV) of the spinal ganglia neurons in normal conditions in regard to the age of culture and respectively, after anoxia

Wiek hodowli (tygodnie) Age of culture (weeks)	Norma Norm		Niedotlenienie Anoxia		Różnica*) Difference*)
	0-60 min	0-15 min	15-60 min	24 godz./hrs	
2	8,5±0,7 (47)**	19,0±0,5 (21)	8,2±0,8 (67)	3,8±0,3 (54)	p ₁ <0,001 p ₂ >0,500 p ₃ >0,001
3	20,0±0,6 (243)	12,4±1,4 (20)	2,9±0,5 (26)	7,6±0,8 (124)	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001
4	37,7±0,6 (159)	29,6±0,7 (18)	24,6±1,2 (15)	8,3±0,9 (66)	p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001

*) Wskaźniki istotności różnicy statystycznej średniej wartości potencjału neuronów, badanych w czasie 0-15 min (p₁), 15-60 min (p₂) i 24 godz. (p₃) po działaniu 30-min anoksji. ± - wartość błędu średniej.

Statistical significance coefficients of the potential mean value of neurons, studied after 0-15 min (p₁), 15-60 min (p₂) and 24 hours (p₃) after anoxia. ± - standard error of the mean.

**) Liczba neuronów
Number of neurons

Zmiany potencjału spoczynkowego w hodowli 2-, 3- i 4-tygodniowych w normie oraz neuronów z hodowli poddanych niedotlenieniu przedstawia tabela 1. Wynika z niej, że niedotlenienie prowadzi do statystycznie znamiennego obniżenia wartości potencjału spoczynkowego we wszystkich badanych grupach. Bezpośrednio po anoksji zmniejsza się wartość potencjału błonowego komórek zwojowych z hodowli 3- i 4-tygodniowych, natomiast w hodowli 2-tygodniowej obserwowano w tym samym czasie wzrost potencjału spoczynkowego. Po upływie 24 godzin stwierdzono wyraźny, statystycznie znamienny spadek potencjału spoczynkowego komórek zwojowych z hodowli 2-tygodniowej.

OMÓWIENIE

Wielkość potencjału spoczynkowego różnego typu komórek tkanki nerwowej wykazuje znaczny rozrzut (Kokina, Żukovskaja, 1968). Wartość potencjału błonowego różni się znacznie nawet w obrębie tej samej grupy komórek pochodzącej z jednej hodowli. Porównując wyniki badań morfologicznych (Kraśnicka, 1969) z właściwościami bioelektrycznymi komórek zwojów międzykręgowych w okresie ich wzrostu w hodowli należy podkreślić ścisłą zależność pomiędzy narastaniem potencjału spoczynkowego a stopniem dojrzałości komórki nerwowej. Neurocyty z hodowli 2-tygodniowej charakteryzujące się największymi zmianami (przemieszczenie jądra na obwód komórki, niedojrzałość substancji Nissla, nagromadzenie glikogenu) wykazują najniższy potencjał błonowy. Neurocyty z hodowli 3- i 4-tygodniowej równoległe z dojrzewaniem i objawami regeneracji (wzrost substancji Nissla, zmniejszenie ilości glikogenu, przemieszczenie jądra do centrum) charakteryzują się wyższą wartością polaryzacji elektrycznej. Wzrastający w miarę rozwoju potencjał spoczynkowy jest skorelowany również ze wzrostem aktywności oksydazy cytochromowej (Śmiałek, Kraśnicka, 1974).

Znalezione przez nas wartości potencjału spoczynkowego neuronów są nieco niższe niż wartości podane przez Hilda i Tasaki (1962), Hilda (1964) oraz Hilda i wsp. (1965). Badania wymienionych autorów dotyczyły jednak komórek Purkinjego i komórek wyściółki, które *in vitro* mogą wykazywać inną wartość potencjału błonowego niż komórki ze zwoju międzykręgowego. Ponadto autorzy ci nie podają obliczeń statystycznych. Porównanie naszych wyników z danymi Craina (1956) wykazuje także różnicę wielkości potencjału spoczynkowego neuronów. Według Craina „badany potencjał spoczynkowy wielu hodowanych komórek nerwowych embrionów kurzych wynosi około 50 mV”. Natomiast wartości potencjału spoczynkowego izolowanych komórek jądra Deitersa (Hillman, Hyden, 1965) są zbliżone do naszych wyników i mieszczą się w tym samym zakresie wartości. Scott i wsp. (1969) uzyskali dla komórek zwojów międzykręgowych wyższe wartości potencjału spoczynkowego (40—55 mV). Należy jednak podkreślić, że wykonywali oni pomiary potencjału błonowego neuronów z hodowli 5-tygodniowej, a jak wykazują wyniki naszych badań, wyższy potencjał spoczynkowy jest charakterystyczny dla starszych hodowli.

Obniżenie potencjału spoczynkowego pod wpływem niedotlenienia jest następstwem zaburzeń w procesach biochemicznych, zapewniających polaryzację elektryczną komórki. Zaburzenia te są zależne od stopnia niedotlenienia i rozwijają się w miarę upływu czasu po anoksji (większe obniżenie potencjału w późniejszym czasie niż bezpośrednio po niedotlenieniu). Należy jednak pamiętać, że równocześnie zachodzą

zmiany w kierunku odnowy polaryzacji błony komórkowej, stąd też obserwowane wyniki są wypadkową dwóch procesów.

Trudno wyjaśnić przejściowy wzrost potencjału spoczynkowego neuronów w hodowli 2-tygodniowej obserwowany w pierwszym okresie po niedotlenieniu. Nasuwa się tu analogia do zmian potencjału błonowego motoneuronów *in situ* w pierwszej fazie zmian rozwijających się po niedotlenieniu (Collewijn, van Harreveld, 1966). Zaobserwowany przez nas efekt zwiększania polaryzacji elektrycznej komórki w hodowli 2-tygodniowej można wyjaśnić przewagą beztlenowej przemiany i zwiększonym stopniem reaktywności.

W omówieniu naszych spostrzeżeń pragniemy zwrócić uwagę na uzyskanie dwóch grup wartości potencjału spoczynkowego odpowiadających dwóm elementom morfologicznym zwoju międzykręgowego. Wyższe wartości potencjału błonowego są typowe dla komórek nerwowych, niższe wartości odpowiadają amficytom. Wzrost potencjału błonowego w komórkach satelitarnych obserwowany w miarę ich wzrostu *in vitro* potwierdza nasze spostrzeżenia morfologiczne dotyczące dojrzewania neuronów w warunkach hodowli pozaustrojowej. Wydaje się, że wzrost potencjału komórek nerwowych jest także wyrazem ich dojrzewania pomimo przebytej reakcji aksonalnej.

W poprzednich badaniach morfologiczno-histochemicznych dotyczących wpływu niedotlenienia na zwoje czuciowe przetrzymywane w warunkach hodowli tkankowej wykazano zmiany zarówno w neuronach jak i w komórkach podporowych (Kraśnicka i wsp., 1971, 1974). Stwierdzono także istotną zależność pomiędzy nasileniem nieprawidłowości a stopniem dojrzałości tkanki nerwowej oraz czasem trwania niedotlenienia (Kraśnicka, 1969; Kraśnicka i wsp., 1971).

Na uwagę zasługuje również fakt, że w kilkunastu neuronach w jednej hodowli (badanej po upływie 2 godzin) obserwowano paradoksalny efekt odwrócenia znaku polaryzacji błony komórkowej z ujemnego na dodatni. Dalsze badania dotyczące tego spostrzeżenia mogłyby się przyczynić do wyjaśnienia nieodwracalnych zmian bioelektrycznych neuronów z hodowli tkankowej.

Obserwowany spadek potencjału spoczynkowego badanych komórek w wyniku działania anoksji jest bezpośrednim skutkiem zaburzenia mechanizmu aktywnego transportu jonowego, znajdującego wyraz w stopniowym obniżaniu się stosunku jonów potasu względem jonów sodu w pojedynczym neuronie *in vitro* (Giacobini, Przybylski, 1972).

Stan polaryzacji elektrycznej błony komórkowej określa czynność impulsową neuronu. Z jednej strony wpływa on na zapoczątkowanie wyładowań iglicowych, z drugiej zaś strony uniemożliwia ich dalszą generację. Loewy i Siekiewitz (1971) wykazali, że zaburzenia mechanizmu

polaryzacji bioelektrycznej neuronu w warunkach niedotlenienia znacznie wyprzedzają zanik czynności impulsowej. Istnienie określonego „zapasu bezpieczeństwa” nawet w przypadku całkowitej anoksji, jak wykazano na neuronach bezkręgowców (Giacobini, 1969), wyjaśnia stosunkowo długotrwałe wyładowania neuronu. W znacznie krótszym czasie ustaje czynność neuronów kręgowców, początkowo odwracalnie a później już nieodwracalnie.

Wysoki stopień organizacji strukturalno-funkcjonalnej mitochondriów decyduje w przypadku niedotlenienia o stosunkowo szybkim wystąpieniu zmian morfologicznych, obserwowanych w mikroskopie elektronowym. Jeśli mitochondria nie są w stanie pokryć własnego zapotrzebowania na ATP i NAD występuje znaczne zaburzenie ich funkcji oraz ulegają zmianie wewnętrzne błony mitochondrialne, na których zlokalizowane są enzymatyczne zespoły oksydacyjnej fosforylacji (Kotovskij, Shimkievitsh, 1971). Właśnie w wyniku wysokiej korelacji sprzężenia strukturalno-funkcjonalnego elementarnych układów transportu elektronów w przegrodach mitochondrialnych poanoksyjne zmiany morfologiczne obserwuje się stosunkowo najwcześniej w mitochondriach (Brierley, 1972; Kraśnicka i wsp., 1974). Jest to zrozumiałe, gdyż sekwencja transportu elektronów w poszczególnych ogniwach łańcucha oddechowego w mitochondriach zależy od przestrzennej orientacji enzymów i koenzymów. Każde uszkodzenie struktury mitochondrialnej bezpośrednio wpływa na wytwarzanie ATP, czynnika aktywnego transportu jonowego decydującego o stanie polaryzacji bioelektrycznej neuronu.

З. Краśницка, А. Пшыбыльски

ПОСЛЕАНОКСИЙНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛА ПОКОЯ НЕРВНЫХ
И ШВАННОВСКИХ КЛЕТОК ИЗ ПОЗВОНОЧНЫХ ГАНГЛИЕВ,
ВЫРАЩИВАЕМЫХ IN VITRO

Резюме

Целью работы было исследование потенциала покоя нервных клеток и амфицитов межпозвоночных ганглиев в условиях нормальной культуры ткани и после 30-минутной аноксии. Измерения мембранного потенциала проводили на 2, 3 и 4-недельных культурах непосредственно после аноксии, а также через 24 часа, пользуясь инвертным микроскопом и микроманипулятором. Использовали стеклянные электроды с 3-M KCl.

Показано увеличение величины потенциала во всех типах клеток с возрастом культуры. После аноксии наблюдается статистически достоверное снижение потенциала покоя. Только нервные клетки в 2-недельной культуре обнаруживают преходящее увеличение потенциала покоя непосредственно после аноксии. Через 24 часа также и в этой группе наступает отчетливое снижение потенциала покоя, статистически достоверное.

Z. Kraśnicka, A. Przybylski

POSTANOXIC CHANGES OF THE RESTING POTENTIAL
OF THE NERVE CELLS AND AMPHICYTES FROM INTERVERTEBRAL
GANGLIA CULTURED IN VITRO

Summary

The aim of the work was to examine the resting potential of the nerve cells and amphicytes from intervertebral ganglia in conditions of normal tissue culture and after 30 minutes of anoxia. The measurements of membrane potential were made on the tissue cultured for 2, 3, 4 weeks, immediately after anoxia and after 24 hours. The assay of the potentials was made under inverted microscope with micromanipulator using 3 M KCl glass microelectrodes.

The increased potential values were demonstrated in all types of cells and depended upon the age of culture. After anoxia there was statistically significant decrease of the value of the resting potential. Only the nerve cells in 2 week culture presented immediately after anoxia the transient enhancement of the resting potential. After 24 hours the decrease of the resting potential became statistically significant also in this group of cultured tissue.

PIŚMIENNICTWO

1. Brierley J. B.: Pathology of cerebral ischemia. W: Cerebral Vascular Diseases. Red. F. H. McDowell, R. W. Brennan. Grune and Stratton, New York, 1972.
2. Collewijn H., van Harreveld A.: Intracellular recording from cat spinal motoneurons during acute asphyxia. *J. Physiol.*, 1966, 185, 1—14.
3. Crain S. M.: Resting and action potentials of cultured chick embryo spinal ganglion cells. *J. Comp. Neurol.*, 1956, 104, 285—326.
4. Creutzfeldt O., Kasamatsu A., Vaz-Ferreira A.: Aktivitätsänderungen einzelner korticaler Neurone im akuten Sauerstoffmangel and ihre Beziehungen zum EEG bei Katzen. *Pflüg. Arch. Physiol.*, 1957, 263, 647—667.
5. Cross B. A., Silver J. A.: Unit activity in the hypothalamus and the sympathetic response to hypoxia and hypercapnia. *Exp. Neurol.*, 1963, 7, 375—393.
6. Fernandez-Guardiola A., Roman E. R., Hartman C. E.: Signos electricos de la anoxia cerebral. *Boll. Inst. Estud. Med. Biol.* 1962, 20, 21—77.
7. Giacobini E.: Chemical studies on individual neurons. W: Neurosciences Research, vol. 2, Red. S. Ehrenpreis, O. Solnitsky. Acad Press, New York, 1969.
8. Giacobini E., Przybylski A.: Studies on hypoxia in isolated neurons II. The effect of hypoxia on the impulse activity and the intracellular K/Na ratio of the slowly adapting stretch receptor neuron (SRN). *Internat. J. Neurosci.*, 1971, 1, 163—169.
9. Giacobini E., Przybylski A.: Transport of Na⁺ and K⁺ in anoxic conditions studied in single neurons. *Ann. Anesth. Franc.*, 1972, Special 2, 21—31.
10. Hild W.: Electrophysiological phenomena observed in single neurons and neuroglial cells in cultures of central nervous tissue. W: Brain Function. Red. M. A. B. Brazier. Univ. California Press, Berkeley, 1964.
11. Hild W., Tasaki I.: Morphological and physiological properties of neurons and glial cells in tissue culture. *J. Neurophysiol.*, 1962, 25, 277—304.

12. Hild W., Takenaka T., Walker F.: Electrophysiological properties of ependymal cells from the mammalian brain in tissue culture. *Exp., Neurol.*, 1965, 11, 493—501.
13. Hillman H., Hyden H.: Membrane potentials in isolated neurons in vitro from Deiter's nucleus of rabbit. *J. Physiol.*, 1965, 177, 398—410.
14. Kokina N. N., Zhukovskaya N. M.: Resting potentials of different cell types in the cultured nervous tissue. *Tsitologia* 1968, 10, 953—963.
15. Kotovskij E. F., Shimkievitsh L. L.: Funktsionalnaya morfologija pri ekstremalnych vozdeistvijach: Problemy kosmitscheskoy biologii. Ed.: V. N. Tschernigovskij. Nauka, Moskva, 1971.
16. Kraśnicka Z., Renkawek K., Liwnicz B.: Obraz morfologiczny tkanki glejowej hodowanej in vitro w zmiennej atmosferze gazowej. *Neuropat. Pol.*, 1967, 5, 115—123.
17. Kraśnicka Z.: Morfologia i histochemia neuronów zwojów międzykręgowych w warunkach hodowli tkankowej i w rozwoju zarodkowym. *Neuropat. Pol.*, 1969, 7, 395—434.
18. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J., Renkawek K.: Morphologie et histochemie de neurones de ganglions spinaux cultives in vitro dans les conditions d'anoxie. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 93—101.
19. Kraśnicka Z., Konovalov H., Gajkowska B.: Wpływ krótkotrwałego niedotlenienia na zwoje czuciowe hodowane in vitro. Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym. *Neuropat. Pol.*, 1974, 11, 399—404.
20. Loewy A. G., Siekevitz P.: *Cell Structure and Function*. Mir, Moskva, 1971.
21. Przybylski A.: Activity pattern of visceral cortex neurons during asphyxia. *Exp. Neurol.*, 1971, 32, 1, 12—21.
22. Scott B. S., Engelbert V. E., Fisher K. C.: Morphological and electrophysiological characteristics of dissociated chick embryonic spinal ganglion cells in culture. *Exp. Neurol.*, 1969, 23, 230—248.
23. Śmiałek M., Kraśnicka Z.: Cytochrome oxidase activity in isolated sensory neurons of spinal root ganglia from chick embryo tissue culture in experimental anoxia. *Proc. VII Internat. Cong. Neuropathol.*, Budapest, September 1—7, 1974. Eds.: S. Környey, S. Tariska, G. Gosztonyi. *Exc. Med.*, Amsterdam, Akademiai Kiado, Budapest, 1975, V. I.

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

DANUTA MARKIEWICZ, JERZY DYMECKI

DYNAMIKA ZMIAN MORFOLOGICZNYCH W MÓZGU MYSZY
Z PADACZKĄ AUDIOGENNĄ PO WYWOŁANYCH
DOŚWIADCZALNIE GROMADNYCH NAPADACH DRGAWKOWYCH

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego w Warszawie
Kierownik Zakładu: doc. dr hab. J. Dymecki

Poprzednie badania mikroskopowe mózgów myszy z padaczką audiogenną, naśladującą pod względem częstotliwości napadów padaczkę przewlekłą (jeden napad dziennie przez 40 dni) wykazały uderzająco skąpe uszkodzenie istoty szarej mózgu (Markiewicz, Ostrowska, 1977), czym różniły się wyraźnie od zmian podrgawkowych stwierdzanych u ludzi (Dąbska, 1968; Scholz, 1951; 1959; Spielmeyer 1925, 1927, 1930) oraz występujących u innych zwierząt po doświadczalnie wywołanych napadach uogólnionych drgawek (Meldrum, Brierly, 1973; Meldrum, Horton, 1973). Odrębności morfologiczne stwierdzone w naszym materiale, poza różnicami gatunkowymi reakcji tkankowych, mogą być również wynikiem zbyt małej częstotliwości napadów. U myszy z padaczką audiogenną wywołanie stanu padaczkowego było niemożliwe z powodu czasowego wygasania reaktywności zwierząt na bodźce dźwiękowe. Podjęto więc próbę określenia uszkadzającego wpływu napadów drgawkowych naśladujących napady gromadne.

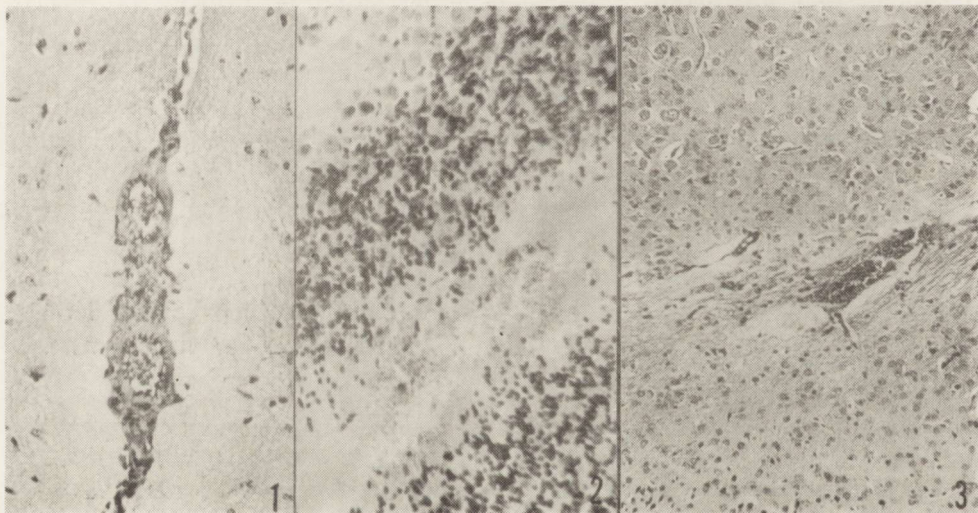
MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 90 myszy obciążonych genetycznie padaczką audiogenną. U 60 myszy przez okres jednego tygodnia wywoływano codziennie dźwiękiem dzwonka elektrycznego 8 do 10 napadów drgawkowych w odstępach od 30 do 40 min. Pozostałe 30 myszy stanowiły materiał kontrolny. Zwierzęta doświadczalne podzielono na 4 grupy w zależności od czasu przeżycia po napadach: grupa I — 9 myszy, które padły w czasie napadów przed zakończeniem doświadczenia; grupa II — 21 myszy, które perfundowano bezpośrednio po ostatnim napadzie; grupa III — 20 myszy, które przeżyły 1 miesiąc po zakończeniu doświadczenia; grupa IV — 10 myszy, które przeżyły 3 miesiące po ostatnim napadzie.

Mózgi myszy I grupy doświadczalnej i grupy kontrolnej (5 myszy) utrwalano przez zanurzenie w 7% formolu. Mózgi myszy pozostałych grup doświadczalnych i kontrolnych utrwalano przez perfuzję i opracowywano metodami histologicznymi w analogiczny sposób jak w poprzedniej pracy (Markiewicz, Ostrowska, 1977).

WYNIKI

Grupa I (myszy, które padły podczas doświadczenia) — w badaniu mikroskopowym stwierdzono rozlany obrzęk mózgu, zwłaszcza istoty białej. Widoczne było poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych, często z obecnością bogatobiałkowego płynu i zgębczeniem tkanki nerwowej w otoczeniu. Ściany naczyń, szczególnie tętnic wykazywały rozluźnienie i zatarcie budowy warstwowej (ryc. 1). W przestrzeni okołonaczyniowej obserwowano również czerwone ciała krwi. Zmiany krwotoczne widoczne były podoponowo, śródkomorowo i śródmiąższowo (ryc. 2). W naczyniach opon i mózgu stwierdzano zastój, a wokół nich rozluźnienie podłoża tkankowego (ryc. 3). W istocie białej obserwowano



Ryc. 1. Grupa I. Naczynia opon o pogrubiałych ścianach i zatartej budowie. W przydanie zagęszczenie elementów histiocytarnych. Krwinkotoki w przestrzeni okołonaczyniowej. Zgębczenie w sąsiedztwie naczyń. HE. Pow. 200 ×.

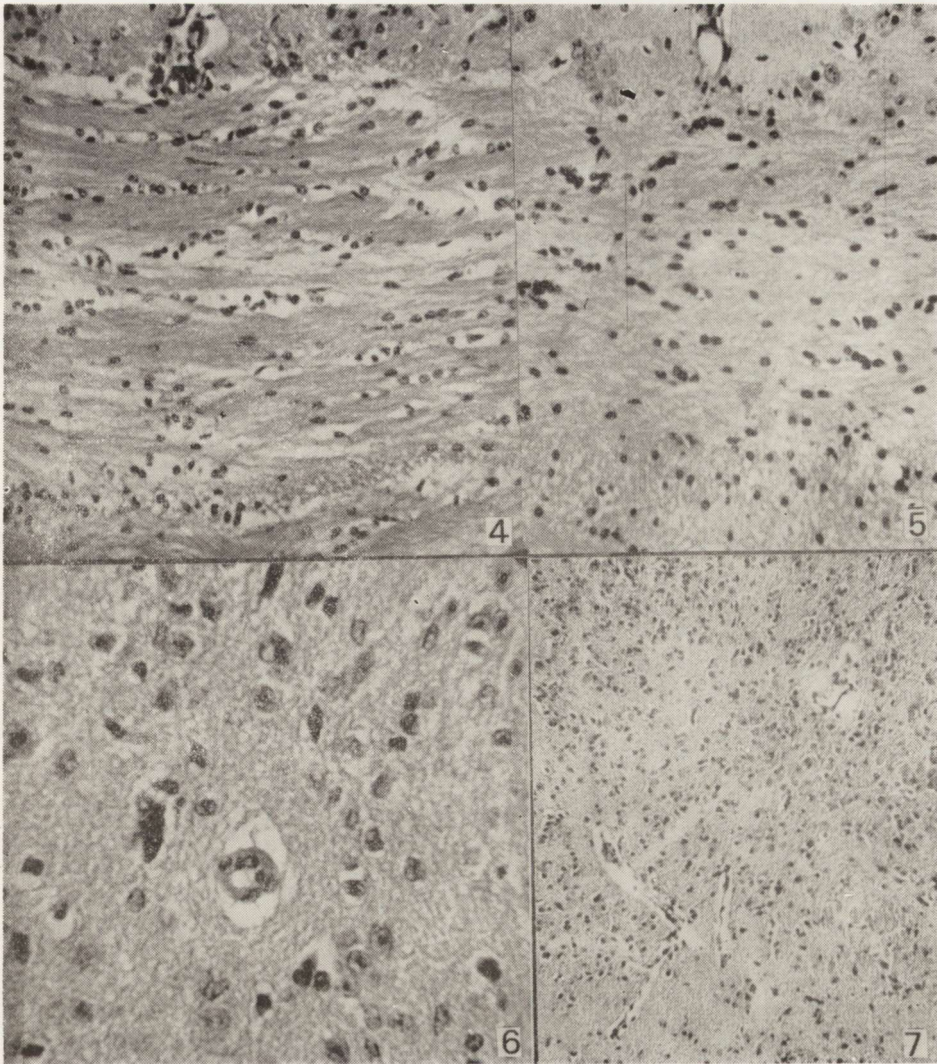
Fig. 1. Group I. Meningeal blood vessels with thickened walls and blurred structure. Accumulation of histiocytic cells in adventitia. Haemorrhages in perivascular space. Spongiosis in vicinity of blood vessels. HE. × 200.

Ryc. 2. Grupa I. Krwotok śródmiąższowy w mózdzku. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 2. Group I. Interstitial haemorrhage in cerebellum. HE. × 200.

Ryc. 3. Grupa I. Wybitny zastój i rozlane zgębczenie istoty białej mózgu. HE. Pow. 100 ×.

Fig. 3. Group I. Prominent stasis and diffuse spongiosis of the cerebral white matter. HE. × 100.



Ryc. 4. Grupa II. Rozluźnienie utkania spoidła wielkiego mózgu. Naczynia opono-pogrubiałych ścianach. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 4. Group II. Losening of tissue of the corpus callosum. Meningeal blood vessels with thickened walls. HE. × 200.

Ryc. 5. Grupa II. Kontrola. Prawidłowe spoidło wielkie. HE. Pow. 200 ×.

Fig. 5. Group II. Control. Normal corpus callosum. HE. × 200.

Ryc. 6. Grupa III. Pogrubiała tętniczka w zwojach podstawy, a wokół niej poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowej. Obrzękły śródbłonek zwęża światło naczynia. HE. Pow. 400 ×.

Fig. 6. Group III. Thickened arteriole in basal ganglia surrounded by dilated perivascular space. Swollen endothelium narrows vascular lumen. HE. × 400.

Ryc. 7. Grupa III. Poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych i rozluźnienie tkanki. HE. Pow. 60 ×.

Fig. 7. Group III. Widening of perivascular space and loosening of tissue. HE. × 60.

rozlane przejaśnienie mieliny z odcinkową demielinizacją. Zmianom tym towarzyszyło pobudzenie jąder astrogliu. Wyraźnych ubytków komórek nerwowych w korze mózgowej i strukturach szarych pnia nie stwierdzono. Występowały natomiast odcinkowe ubytki komórek Purkiniego w mózdzku, przeważnie na dnie rowków, z towarzyszącym pomnożeniem gleju Bergmana.

Grupa II. W mózgach myszy perfundowanych bezpośrednio po ostatnim napadzie, podobnie jak w grupie poprzedniej stwierdzono zmiany obrzękowe, których nasilenie było jednak mniejsze. Wybitne nasilenie obrzęku obserwowano tylko u pojedynczych zwierząt. Przeważnie występowało poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych w istocie białej półkul mózgu, pnia i mózdzku. Niekiedy stwierdzano obecność płynu przesiękowego wokół naczyń, a w otaczającej tkance nerwowej dyskretne rozluźnienie utkania. Ściany naczyń, szczególnie tętnic, wykazywały zatarcie budowy warstwowej. Obserwowano rozluźnienie podłoża tkankowego w spoidle wielkim mózgu, torebce wewnętrznej, zawoju hipokampa, pniu i mózdzku (ryc. 4, 5). W barwieniu na mielinę widoczne było odcinkowe zblednięcie osłonek, a w powiększeniach mikroskopowych stwierdzano rozdęcie i fragmentację aż do całkowitego rozpadu pojedynczych osłonek. Rozlane spłowienie mieliny widoczne było w okolicy przykomorowej.

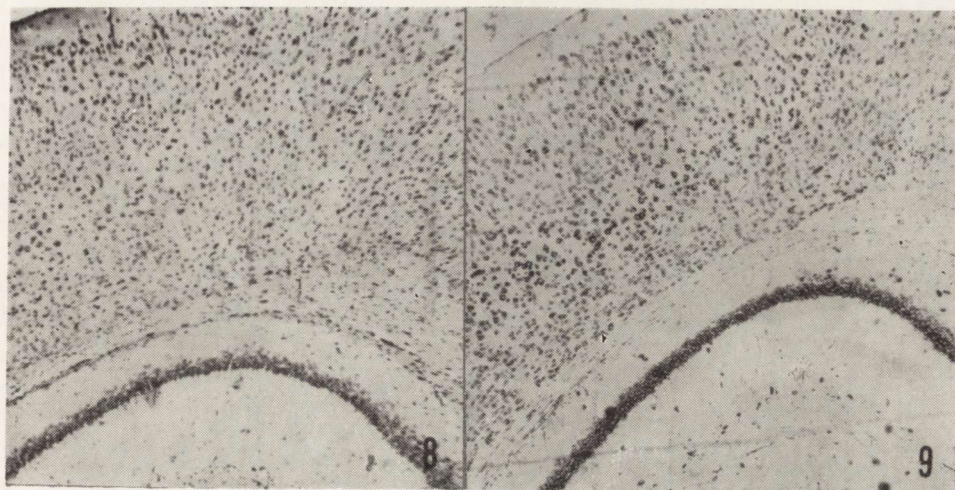
Krwinkotoki obserwowano sporadycznie, najczęściej podoponowo, w szczelinie naczyniówkowej mózgu.

Uszkodzenie neuronów było niewielkie. Rozsiane ubytki występowały w korze nowej mózgu, przeważnie w III i V warstwie. Niekiedy spotykano również odcinkowe ubytki komórek Purkiniego na dnie rowków.

Grupa III i IV. Zmiany neuropatologiczne w mózgach myszy, które przeżyły jeden i 3 miesiące po ostatnim napadzie drgawkowym były podobne. Obserwowano dyskretne rozluźnienie podłoża tkankowego istoty białej półkul mózgu i mózdzku z nasileniem zmian w okolicy komór i w sąsiedztwie naczyń. Towarzyszyło mu rozlane spłowienie mieliny z odcinkową demielinizacją, szczególnie w spoidle wielkim mózgu. Ściany naczyń wykazywały pogrubienie. Często obserwowano duże zwężenie światła naczyń (ryc. 6) oraz poszerzenie przestrzeni okołonaczyniowych (ryc. 7). W sąsiedztwie naczyń występowały niekiedy makrofagi wypełnione ziarnami hemosyderyny. W impregnacji met. Cajala obserwowano wzmożoną gliozę okołonaczyniową. Zagęszczenie i przerost astrocytów obserwowano również w istocie białej zawoju hipokampa oraz w głębokich warstwach kory obręczy.

W mózgach pojedynczych zwierząt grupy III i IV naczyniopochodne uszkodzenie tkanki nerwowej było bardziej nasilone. Rozlane rozluźnie-

nie podłoża tkankowego istoty białej mózgu przybierało niekiedy w okolicy przykomorowej postać martwicy gąbczastej. W barwieniu na mielinę obserwowano rozlane przejaśnienie, a w obszarze przykomorowym i w sąsiedztwie naczyń widoczna była demielinizacja. Zmianom tym towarzyszyło wyraźne przerzedzenie włókien osiowych.



Ryc. 8. Grupa IV. Ubytki komórek piramidowych w korze nowej. HE. Pow. 100 ×.

Fig. 8. Group IV. Loss of pyramidal cells in neocortex. HE. × 100.

Ryc. 9. Grupa IV. Kontrola. Kora nowa. HE. Pow. 100 ×.

Fig. 9. Group IV. Control. Neocortex. HE. × 100.

Uszkodzenie struktur szarych było ograniczone do dyskretnego przerzedzenia neuronów kory mózgu z wyraźną akcentacją zmian w warstwach komórek piramidowych (ryc. 8, 9). Ponadto były widoczne ubytki komórek Purkinjego, zwłaszcza na dnie rowków.

OMÓWIENIE

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań morfologicznych można stwierdzić, że w mózgach myszy z padaczką audiogenną po gromadnych napadach drgawkowych na pierwszy plan wysuwały się zmiany obrzękowe i naczyniopochodne uszkodzenie tkanki nerwowej. Zmiany te miały charakter rozlany i były bardziej nasilone w istocie białej mózgu i mózdzku niż w korze. U myszy, które padły przed zakończeniem doświadczenia i perfundowanych bezpośrednio po ostatnim napadzie widoczne były wczesne zmiany obrzękowe i świeże krwinkotoki, natomiast u zwierząt z dłuższym przeżyciem dominowało naczyniopochodne uszkodzenie tkanki nerwowej ze spłowieniem osłonek mielinowych, przerzedzeniem włókien nerwowych i obecnością makrofaagów z hemosyderyną w przestrzeni okołonaczyniowej. Dyskretne prze-

rzedzenie populacji neuronów obserwowano we wszystkich grupach doświadczalnych, ale było ono zaskakująco skąpe.

Rozważając problem etiopatogenezy zmian neuropatologicznych stwierdzonych w naszym materiale, w pierwszym rzędzie należy wziąć pod uwagę czynnościowe zaburzenia krążenia, występujące podczas napadów uogólnionych drgawek. Z piśmiennictwa wiadomo, że na początku napadu padaczkowego występuje gwałtowny wzrost ciśnienia tętniczego krwi (Kreindler, 1965; Meldrum, Horton, 1973). Równocześnie niemal zwiększa się ciśnienie krwi w żyłach i rozwija się zastój. Podwyższony poziom ciśnienia tętniczego ulega szybko wyrównaniu, natomiast zaburzenia w układzie żylnym utrzymują się znacznie dłużej, nawet po ustąpieniu drgawek (Kreindler, 1965; Niaussant, 1965). Nagły wzrost i duże wahania ciśnienia krwi w tętnicach i żyłach mózgowych podczas napadów uogólnionych drgawek mogą prowadzić do uszkodzenia struktury ściany naczyń i spowodować wzrost jej przepuszczalności nie tylko w stosunku do wody i elektrolitów ale również białek i upostaciowanych elementów krwi. Z morfologicznego punktu widzenia potwierdzają tę możliwość zmiany w mózgach myszy doświadczalnych w postaci krwinkotoków i makrofagów z hemosyderyną w przestrzeni okołonaczyniowej. Były one szczególnie nasilone u myszy, które padły w tonicznej fazie napadów padaczkowych. Prawdopodobnie w tej sytuacji nie był również bez znaczenia podkreślany przez Zimmermana (1938) skurcz mięśni szkieletowych utrudniający odpływ krwi żyłnej z jamy czaszkowej oraz bezdech, które nasilały zastój i pogłębiały niedotlenienie mózgu.

Próba wyjaśnienia patomechanizmu zmian podrgawkowych w oparciu o czynnościowe zaburzenia krążenia nie jest nowa. Spielmeier (1925, 1927, 1930) i jego uczniowie (Dreszer, Scholz, 1939; Scholz, 1951, 1959 i inni) rozwinęli teorię skurczów naczyniowych i wiąźali z nimi niedotlenienie tkanki nerwowej. Van Bogaert i Colle (1955) wyrażają również przekonanie, że naczynioruchowe zaburzenia krążenia krwi odgrywają ważną rolę w rozwoju zmian ponapadowych. Inni badacze przypisują główne znaczenie obrzękowi rozwijającemu się w czasie napadów, ponieważ doprowadza on do ucisku naczyń krwionośnych i powoduje niedokrwienie mózgu (Gastaut i wsp., 1959; de Robertis i wsp., 1969).

Przedstawiona przez nas próba wyjaśnienia zmian podrgawkowych w oparciu o występujące podczas napadów hemodynamiczne zaburzenia krążenia krwi może wydać się zbyt uproszczona i mechaniczna. Jednakże na jej korzyść przemawiają nie tylko wyniki badań morfologicznych, ale również dane uzyskane w innych warunkach doświadczalnych. Häggendal i Johansson (1972a, 1972b) stwierdzili wzmożoną

przepuszczalność ścian naczyń w stosunku do aminokwasów po nagłym podwyższeniu ciśnienia krwi w tętnicach u psów i kotów. Fakt ten był interpretowany jako następstwo zaburzeń czynności bariery krew-mózg z powodu rozluźnienia ścisłych połączeń pomiędzy komórkami śródbłonna.

Bardzo słabo zaznaczone uszkodzenie neuronów zarówno w badaniach naśladujących padaczkę przewlekłą jak i na modelu napadów gromadnych, wydaje się, należy interpretować jako właściwość gatunkową. Przemawiają za tym również wyniki badań nad doświadczalnie wywołaną ischemią i anoksją u szczurów, które wykazywały stosunkowo małą wrażliwość komórek nerwowych na niedotlenienie (Domańska-Janik, 1972; Ibrahim, 1972).

WNIOSKI

1. Zespół zmian morfologicznych w mózgu myszy obciążonych genetycznie padaczką audiogenną po serii napadów gromadnych obejmuje rozlane uszkodzenie układu naczyniowego, obrzęk mózgu i naczyniopochodne uszkodzenie tkanki nerwowej.

2. Charakter i topografia zmian strukturalnych w ośrodkowym układzie nerwowym po napadach gromadnych wykazuje duże podobieństwo do zespołu zmian neuropatologicznych w padaczcze przewlekłej w tym samym modelu doświadczalnym. Różnice dotyczyły wyłącznie nasilenia zmian. Obrzęk i uszkodzenie naczyń było większe u myszy po napadach gromadnych.

3. Różnice w obrazie morfologicznym zmian ponapadowych w mózgu myszy po serii napadów gromadnych w zależności od czasu przeżycia dotyczyły „wieku” zmian i ich nasilenia. Bezpośrednio po napadach miały charakter wczesnego obrzęku i świeżych zmian krwotocznych, a u zwierząt z dłuższym czasem przeżycia obserwowano naczyniopochodne uszkodzenie przede wszystkim istoty białej ze zgębczeniami okołonaczyniowymi i obecnością makroflagów wypełnionych hemosyderyną.

4. Wyraźne zaoszczędzenie neuronów wydaje się związane z właściwą gatunkowi odpornością na uszkadzające działanie czynników anoksyjno-ischemicznych, towarzyszących napadom uogólnionych drgawek.

Д. Маркевич, Е. Дымецки

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В МОЗГЕ МЫШЕЙ С АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИЕЙ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННЫХ СУДОРОЖНЫХ ПРИПАДКОВ

Резюме

Исследовали морфологическую картину мозга 90 мышей с генетически обусловленной аудиогенной эпилепсией. У 60 экспериментальных мышей ежед-

ственно в течение одной недели вызывали электрическим звонком от 8 до 10 генерализованных судорожных припадков. Остальные мыши составляли контрольный материал. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы в зависимости от продолжительности жизни после приступов.

Микроскопическое исследование мозга мышей выявило разлитый отек и повреждение нервной ткани сосудистого происхождения. Наблюдаемые в отдельных экспериментальных группах различия в морфологической картине повреждения мозга мышей относились только к „возрасту” и интенсивности этих изменений.

Очень небольшое повреждение нервных клеток у мышей с аудиогенной эпилепсией является, по-видимому, видовой особенностью животных, вытекающей из метаболических и ангиоархитектонических особенностей мозга. В обсуждении, касающемся этиопатогенеза мозговых изменений вследствие эпилептических припадков, подчеркивается существенное значение гемодинамических нарушений во время генерализованных припадков.

D. Markiewicz, J. Dymecki

DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN OF MICE
WITH AUDIOGENIC EPILEPSY FOLLOWING EXPERIMENTALLY
EVOKED MULTIPLE EPILEPTIC FITS

Summary

Morphological study comprised the brains of 90 mice genetically conditioned with audiogenic epilepsy. In 60 experimental mice 6—8 generalized seizures were evoked daily for one week by the sound of electric bell. Other 30 mice served as control material. Experimental animals were divided in four groups depending on the survival time after the fits.

Microscopic investigation of the experimental material showed diffuse edema and vasogenic damage to nervous tissue. The differences in the damage of the brain in particular groups concerned only the „age” and the intensity of the changes. Exceptionally scarce damage to neurons seems to depend on species property resulting from mice brain metabolic and angioarchitectonic differences.

The authors discuss the etiopathogenesis of cerebral changes caused by epileptic fits and stress the significance of hemodynamic disturbances during generalized epileptic seizures.

PISMIENNICTWO

1. Bogaert van L., Colle G.: Un syndrome cerebelleux progressif à la phase tardive de l'épilepsie essentielle. *Acta Psychiat. Neurol. Scand.*, 1955, 30, 55.
2. Dąbska M.: Zagadnienia zmian podrgawkowych w padaczce. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1963, 2, 276—280.
3. Domańska-Janik K.: Doświadczalne niedotlenienie a niektóre zagadnienia tlenowego metabolizmu glukozy w ośrodkowym układzie nerwowym. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 17—43.
4. Dreszer R., Scholz W.: Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Hirndurchblutungsstörungen beim generalisierten Krampf. *Z. ges. Neurol. Psychiat.*, 1939, 164, 140—161.

5. Gastaut H., Naquet R., Meyer A., Cavanagh J. B., Beck E.: Experimental psychomotor epilepsy in the cat. Electroclinical and anatomopathological correlations. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1959, 18, 270—293.
6. Häggendal E., Johansson B.: Effect of increased intravascular pressure on the blood-brain barrier to protein in dogs. *Acta Neurol. Scand.*, 1972a, 43, 271—275.
7. Häggendal E., Johansson B.: On the pathophysiology of the increased cerebrovascular permeability in acute arterial hypertension in cats. *Acta Neurol. Scand.*, 1972b, 48, 265—270.
8. Ibrahim M. Z. M.: The response of the brain to hypoxia and ischaemia. *J. Neurol. Sci. (Amst.)* 1972, 17, 271—279.
9. Kreindler A.: *Experimental epilepsy*. Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1965, 137.
10. Markiewicz D., Ostrowska D.: Zmiany ponapadowe w mózgu myszy z padaczką audiogenną. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 107—117.
11. Meldrum B. S., Brierly J. B.: Prolonged epileptic seizures in primates. *Arch. Neurol.*, 1973, 28, 10—17.
12. Meldrum B. S., Horton R. W.: Physiology of status epilepticus in primates. *Arch. Neurol.*, 1973, 28, 1—10.
13. Niaussant M. M.: A study of brain circulation during the mouse audiogenic seizure. *Proc. of a Symposium Liblinec Prague*. Ed.: Z. Servit, Excerpta Med. Found, 1965, 331—338.
14. Robertis de E., Alberci M., de Lorez Arnaiz G. R.: Astroglial swelling and phosphohydrolases in cerebral cortex of metrazol convulsant rats. *Brain Res.*, 1969, 12, 461—466.
15. Scholz W.: *Die Krampfschädigungen des Gehirns*. (Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie No 75), Springer, Berlin, 1951, 144.
16. Scholz W.: The contribution of patho-anatomical research to the problem of epilepsy. *Epilepsia*, 1959, 1, 36.
17. Spielmeyer W.: Zur Pathogenese örtlich-elektiver Hirnveränderungen. *Ztschr. Neur. Psychiat.*, 1925, 99, 756.
18. Spielmeyer W.: Die Pathogenese des epileptischen Krampfes. *Z. ges. Neurol. Psychiat.*, 1927, 109, 501—520.
19. Spielmeyer W.: The anatomic substratum of the convulsive state. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)* 1930, 23, 869—875.
20. Zimmerman H. M.: The histopathology of convulsive disorders in children. *J. Pediat.*, 1938, 13, 859—890.

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

MIECZYŚLAW WENDER, ARKADIU PETRESCU, HELENA FILIPEK-WENDER,
JANINA STANISŁAWSKA

CHOLESTERYL ESTERS IN DEMYELINATING LESIONS
IN THE LIGHT OF HISTOCHEMICAL
AND BIOCHEMICAL CORRELATIONS *)

Department of Neurology, Institute of Diseases of the Nervous System
and of Sensory Organs

Department of Biochemistry, Institute of Physiological Sciences Medical Academy,
Poznań, Poland

Institute of Neurology and Psychiatry, Bucharest, Romania

From the histochemical evidence obtained previously (Petrescu 1967, 1969, 1971) in various types of demyelinating lesions it appeared that the main site of chemical degradation of the myelin lipid moiety are the macrophages. These cells were also shown to be capable of accumulation of large amounts of sudanophilic material, which later has been found to consist mainly of sterol esters. Based on cytochemical properties four different types of lipomacrophages accompanying demyelinating lesions have been distinguished.

On the other hand however, a number of biochemical studies, in that respect also our own investigations (Eto, Suzuki, 1972; Wender et al., 1978) have shown that small amounts of cholesteryl esters with a fatty acid spectrum entirely different from that characteristic for the plasma cholesteryl ester (CE) composition may be isolated even from the normal nervous tissue.

Our investigations on the brain CE composition in various experimental diseases such as triethyl tin intoxication (TET), cyanide encephalopathy and experimental allergic encephalomyelitis (EAE) were unable to demonstrate any appreciable correlation between either quantitative or qualitative changes in the CE content in the examined brain and the severity of demyelination, inflammatory or macrophage reaction.

*) The biochemical part of the investigation was supported by NIH PL 480 Research Agreement No 05-027-1.

Thus we hoped that a comparative histochemical and biochemical investigations of demyelinated brain regions (2 cases of MS, 1 case of SSPE) could eventually throw some light on the above mentioned apparent discrepancies.

The content and composition of CE as determined by means of thin-layer chromatography (TLC) in the isolated neutral lipids from the demyelinated brain specimens were chosen to serve as the biochemical exponents and were compared with the results of cytochemical identification of lipomacrophages containing esterified cholesterol.

MATERIAL AND METHODS

The investigated brains were: one case of multiple sclerosis (MS) with a 10 year morbid history, from the Neuropsychiatric Hospital in Brasov (Romania), 1 MS case with a 5 year lasting course and a SSPE (subacute sclerosing panencephalitis) case of 4 year morbid history, both from the Marinescu Hospital in Bucharest (Romania). The specimens subjected to histochemical and biochemical investigations were fixed in formalin.

In the first case, the investigated material consisted of sections from the thoracic and lumbar parts of the spinal cord and of the periventricular region of the brain. In the second case, the cervical spinal cord and the periventricular brain region were examined, while in the case of SSPE the observations concerned the central and peripheral parts of demyelinating foci of the frontal and occipital lobes.

From this material two adjacent sections were taken for parallel histochemical and biochemical investigations. The histochemical examinations were performed in the Institute of Neurology and Psychiatry in Bucharest on frozen sections and on those embedded in gelatine. The sections were stained with Sudan IV for neutral lipids, with Sudan Black for all lipid classes, with the method of Baker for phospholipids, with the method of Spielmeyer and OTAN for phospho- and neutral lipids and with the method of Schultze for free and esterified cholesterol.

The biochemical determinations were performed in the Medical Academy of Poznań (Poland). The CE spectrum of the investigated brain specimens was obtained by isolating the CE from other lipids by means of silicic acid column chromatography followed by separation according to the degree of unsaturation of their fatty acyl residues with the aid of TLC, essentially as described by Tichý (1971). The content of cholesterol in the eluates from individual CE fractions was deter-

mined using the method described by Vahouny et al. (1963). The same method was used for determination of the content of total CE and of free cholesterol in the examined specimens.

RESULTS

Histology and histochemistry

Case No 1. Multiple sclerosis. Multiple demyelinating plaques may be seen in the whole central nervous system (Fig. 1—3). They bear features of old plaques with glial scars. Sparsely may be seen agglomerations of lipomacrophages type III containing coarse grains of esterified cholesterol. (Figs. 4—6). When stained with Sudan IV the plaques exhibit sudanophilic grains and cristae, which when stained with the method of Schultze, were identified as accumulated CE.

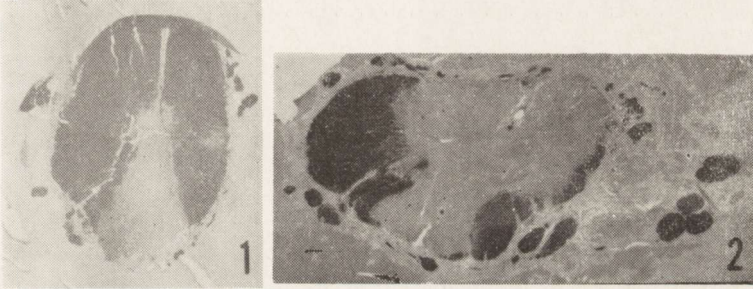


Fig. 1. Dorsal spinal cord. Demyelination in posterior columns. MS case No 1. Baker method.

Ryc. 1. Odcinek piersiowy rdzenia kręgowego. Demielinizacja słupów tylnych. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 1. Metoda Bakera.

Fig. 2. Lumbar spinal cord. Demyelination involving almost the whole cross section of the spinal cord. MS case No 1. Baker method.

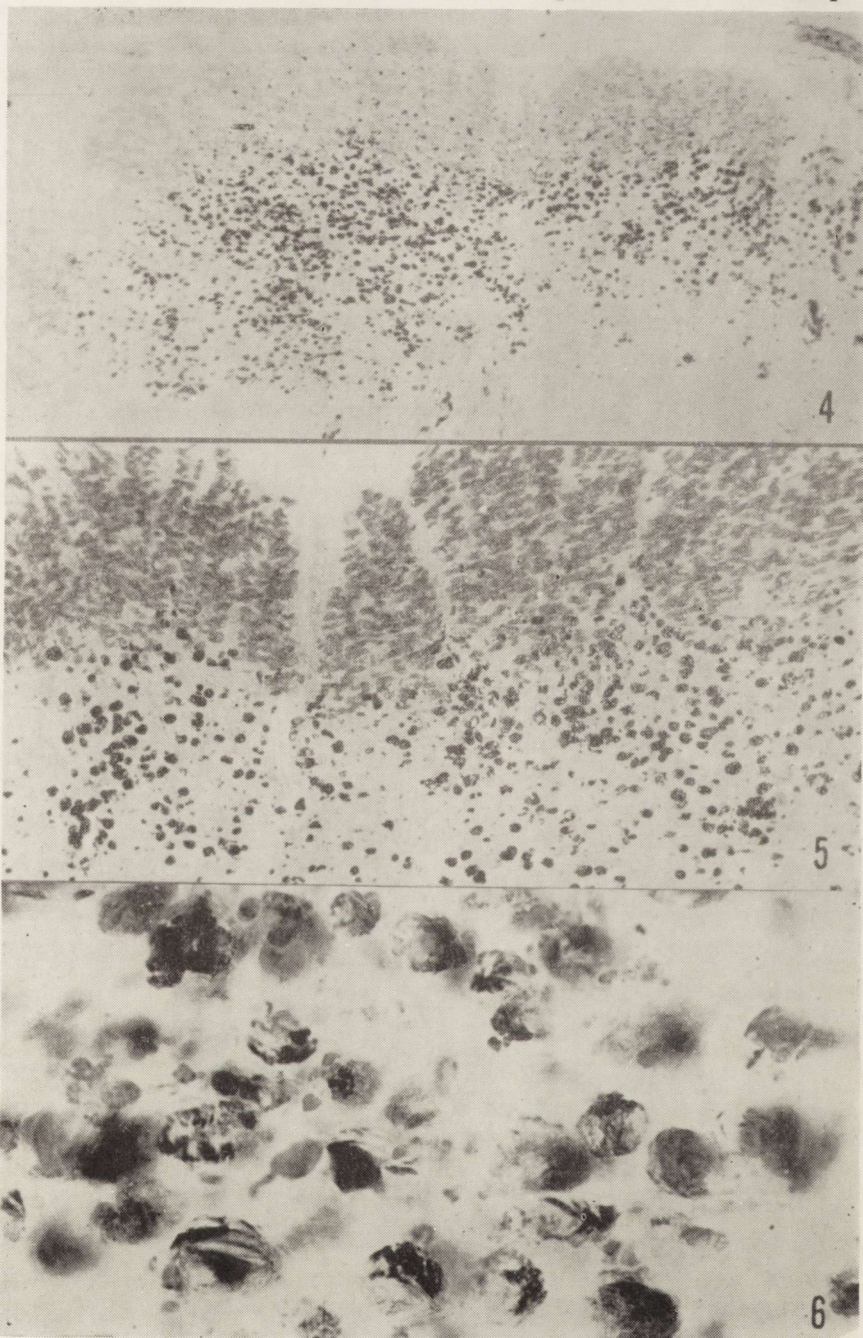
Ryc. 2. Odcinek lędźwiowy rdzenia kręgowego. Demielinizacja obejmuje prawie cały przekrój rdzenia. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 1. Metoda Bakera.



Fig. 3. Periventricular demyelination plaques. MS case No 1. Spielmeier method.

Ryc. 3. Okołołokomorowe plaki demielinizacyjne. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 1. Metoda Spielmeyera.

The demyelination plaques were considerably larger in the lumbar (specimen „b”) than in the dorsal (specimen „a”) fragment of the spinal cord. In the section from the dorsal spinal cord, diffuse lipoma-



crophage infiltrates of type III were revealed in the marginal parts of the plaques, indicating that the demyelinating process in these regions is still active, and more recent than in the other ones.

The specimens derived from the lumbar spinal cord (section „b”) were almost completely free of lipomacrophages, seen only occasionally as small perivascular conglomerates.

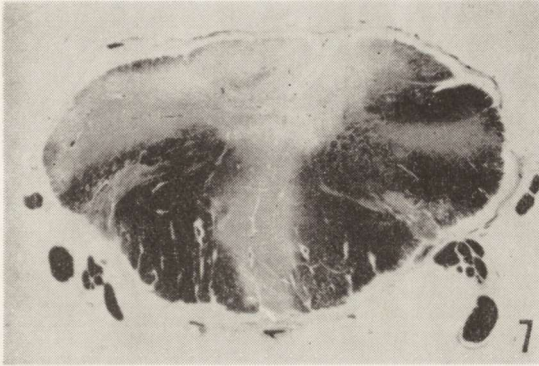


Fig. 7. Demyelination plaque in the cervical spinal cord. MS case No 2. Spielmeier method.

Ryc. 7. Plaka demielinizacyjna w odcinku szyjnym rdzenia kręgowego. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 2. Metoda Spielmeyera.

Case No 2. Multiple sclerosis. The demyelination plaques are of a mixed type, some of them are old plaques lacking sudanophilic grains accounting for CE as well as type I lipomacrophages, other plaques obviate demyelinating processes, active in nature, by demonstrating the presence of numerous granular myelinic and esterocholesterolic (type II) as well as pure esterocholesterolic (type III) lipomacrophages (see Figs. 7—11). In several places of the apparently normal white

Fig. 4. Lumbar spinal cord. Zone of agglomeration of sudanophilic lipomacrophages at the periphery of a demyelination plaque, the central part containing only very few lipomacrophages. At the periphery of the spinal cord a strip of apparently normal white matter. MS case No 1. Sudan Red.

Ryc. 4. Odcinek lędźwiowy rdzenia kręgowego. Nagromadzenie sudanofilnych lipomakroforów na obwodzie plaki demielinizacyjnej. W centralnej części plaki pojedyncze makrofori. Na obwodzie przekroju rdzenia pasmo prawidłowej istoty białej. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 1. Czerwień Sudanu.

Fig. 5. The same aspect as in Fig. 4. but at higher magnification. MS case No 1. OTAN method.

Ryc. 5. Powiększenie pola ujętego na ryc. 4. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 1. Metoda OTAN.

Fig. 6. Sudanophilic lipomacrophages (type III). Distinguishable coarse grains of esterocholesterolic deposits within the macrophages. MS case No 1. Sudan Red.

Ryc. 6. Lipomakrofori sudanofilne (typ III). Wewnątrz makroforów wyraźne, gruboziarniste złoży estrów cholesterolu. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 1. Czerwień Sudanu.

matter in the vicinity of plaques, there may be seen scarcely distributed single lipomacrophages of type I (granular myelinic) and of type II (characteristic for the initial stages of demyelination).



Case No 3. Subacute sclerosing panencephalitis. The histological picture shows a widespread demyelination with distinct signs of brain atrophy. Besides moderate perivascular infiltrates there may be seen also esterocholesterolic lipomacrophages (type III) gathered round some blood vessels (Fig. 12).

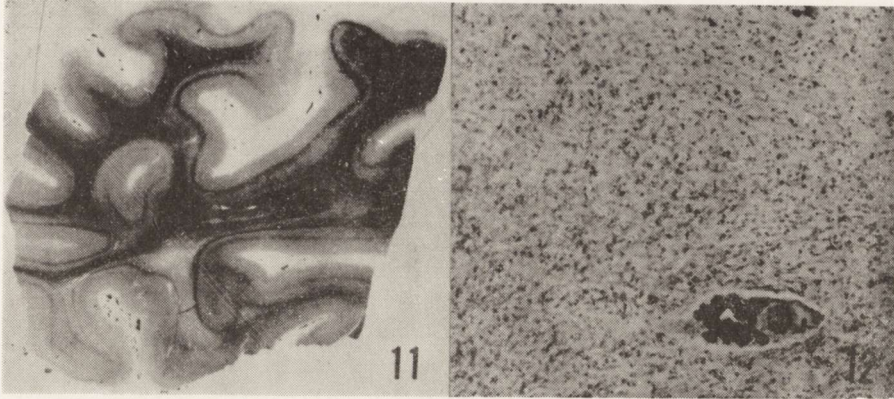


Fig. 11. Macroscopic aspect. Occipital region with a zone of diffuse demyelination. MS case No 2. Spielmeyer method.

Ryc. 11. Wygląd makroskopowy. Okolica potyliczna z pasmem rozlanej demielinizacji. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 2. Metoda OTAN.

Fig. 12. Zone of total demyelination with very few sudanophilic lipomacrophages distributed perivascularly. SSPE. Sudan Red.

Ryc. 12. Pasma całkowitej demielinizacji z nielicznymi lipomakrofagami wokół naczyń. Podostre stwardniające zapalenie mózgu. Czerwień Sudanu.

Biochemistry

Case No 1. Multiple sclerosis. The investigated sections showed the lack of the total cholesterol, while the concentration of estrified cholesterol was significantly increased.

Fig. 8. Spinal cord. Demyelination plaque lacking products of myelin disintegration. At the periphery a zone of apparently normal white matter. MS case No 2. Baker method.

Ryc. 8. Rdzeń kręgowy. Plaka demielinizacyjna bez widocznych produktów rozpadu mieliny. Na obwodzie pasmo prawidłowej istoty białej. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 2. Metoda Bakera.

Fig. 9. The same microscopic field of the same histochemical preparation as in Fig. 8. but studied in the polarized light stream. The birefringent esterocholesterolic lipomacrophages are visible. Myelin fibres are birefringent as well.

Ryc. 9. Obraz mikroskopowy pola ujętego w preparacie histochemicznym na ryc. 8., badanego w świetle spolaryzowanym. Widoczne lipomakrofagi zawierające dwulomne złoże estrów cholesterolu. Włókna mielinowe wykazują również dwulomność.

Fig. 10. Spinal cord. Another microscopic field. Demyelination plaque with agglomeration of lipomacrophages, some of them located perivascularly. MS case No 2. OTAN method.

Ryc. 10. Rdzeń kręgowy. Inne pole mikroskopowe. Plaka demielinizacyjna ze skupieniem lipomakrofagów oraz lipomakrofagi leżące okołonacyniowo. Stwardnienie rozsiane, przyp. Nr 2. Metoda OTAN.

Table 1. Cholesteryl esters in multiple sclerosis (MS) plaques
Tabela 1. Estryl cholesterolu w blaszkach stwardnienia rozsianego

Investigated material Badany materiał	Percentage of individual cholesteryl esters (CE) Odsetkowa zawartość poszczególnych estrów cholesterolu (EC)					Total CE content in g/100 g of tissue dry weight Całkowita zawartość EC w g/100 g su- chej tkanki	Free cholesterol con- tent in g/100 g of tissue dry weight Zawartość wolne- go cholesterolu w g/ /100 suchej tkanki
	Fraction I Fracja I (Δ_0)	Fraction II Fracja II (Δ_1)	Fraction III Fracja III (Δ_2)	Fraction IV Fracja IV (Δ_3+4)	Fraction V Fracja V (Δ_5+6)		
8 Normal cases Norma z 8 przypadków Case No 1. Przypadek 1.	21.5 ± 6.6*)	35.9 ± 8.2	22.0 ± 7.3	14.0 ± 5.5	6.9 ± 7.7	0.05 ± 0.03	8.7 ± 1.7
a) chronic plaque in dorsal spinal cord blaszka przewlekła w od- cinku piersiowym rdze- nia kręgowego	24.1	53.5	11.0	8.2	3.2	0.60	5.4
b) chronic plaque in lum- bar spinal cord blaszka przewlekła w od- cinku lędźwiowym rdze- nia kręgowego	7.6	50.0	12.4	13.9	16.1	0.25	6.9
c) periventricular plaque blaszka okołokomorowa	23.3	45.3	10.9	9.5	11.0	0.31	5.7
Case No 2. Przypadek No 2.							
a) plaques in cervical spi- nal cord blaszki w odcinku szyj- nym rdzenia kręgowego	7.3	75.3	9.2	6.1	2.1	0.85	7.7
b) periventricular plaque blaszka okołokomorowa	3.5	88.4	4.2	2.4	1.5	1.52	4.7

*) Mean ± SD
Średnia ± średnie odchylenie

(Δ_0) — saturated CE
nasycone EC
(Δ_1) — monoenoic CE
jednonienasycone EC
(Δ_2) — dienoic CE
dwukrotnie nienasycone EC

(Δ_3+4) — tri- and tetraenoic CE
trzy- i czterokrotnie nienasycone
EC
(Δ_5+6) — penta- and hexaenoic CE
pięcio- i sześciokrotnie nienasyco-
ne EC

Table 2. Cholesteryl esters in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE)
Tabela 2. Estry cholesterolu w podostrym stwardniającym zapaleniu mózgu

Investigated materia Badany materiał	Percentage of individual cholesteryl esters (CE) Odsetkowa zawartość poszczególnych estrów cholesterolu (EC)					Total CE content in g/100 g of tissue dry weight Całkowita zawartość EC w g/100 g suchej tkanki	Free cholesterol content in g/100 g of tissue dry weight Zawartość wolnego cholesterolu w g/100g suchej tkanki
	Fraction I Frakcja I (Δ_0)	Fraction II Frakcja II (Δ_1)	Fraction III Frakcja III (Δ_2)	Fraction IV Frakcja IV (Δ_3+4)	Fraction V Frakcja V (Δ_5+6)		
8 Normal cases Norma z 8 przypadków	21.5 ± 6.6*	35.9 ± 8.2	22.0 ± 7.3	14.0 ± 5.5	6.9 ± 7.7	0.05 ± 0.03	8.7 ± 1.7
SSPE							
Podostre stwardniające za- palenie mózgu							
a) frontal lobe płat czołowy	6.4	42.4	17.5	23.0	10.7	0.40	3.9
b) occipital lobe periphery of demyelinated area płat potyliczny obrzeże demielinizacji	53.1	13.5	12.3	10.6	10.5	0.74	4.7
c) occipital lobe demyelinated area płat potyliczny pole zdemyelinizowane	59.3	18.3	11.7	4.9	5.4	0.79	5.2

For explanation see Table 1.
Objaśnienia podano w tabeli 1.

The CE spectrum in the lumbar spinal cord, containing mainly old plaques revealed increased proportions of saturated esters, whereas the proportion of monoenoic CE was markedly elevated in all sections of the investigated case.

Case No 2. Multiple sclerosis. Both sections demonstrate considerable changes of the total CE content and their composition. The alterations were particularly prominent in the section from the periventricular demyelination focus. The increase in the concentration of the total esterified cholesterol was accompanied by a considerable decrease of the relative per cent contribution of saturated CE and a very marked elevation of the proportion at which the monoenoic esters were represented in the CE spectrum.

Case No 3. SSPE. The investigated brain sections demonstrated severe loss of the free cholesterol content together with considerable amounts of esterified cholesterol and alterations in the fatty acid composition of CE. The individual fragments demonstrated significant variations of these biochemical exponents. The CE composition of the frontal lobe (section „a”) differed from that of the occipital lobes revealing decreased per cent of saturated esters, while in the occipital lobe this particular fraction was elevated on the expense of monoenoic esters.

A detailed presentation of results may be found in Tables 1 and 2.

DISCUSSION

The correlation of histochemical observations with biochemical data is rendered difficult by the fact, that fragments taken for the two kinds of investigations even though differing only by about 2—3 mm in distance do not warrant their identity, which must be considered only as probable.

The total CE content was distinctly higher in the second MS case, where the demyelinating process demonstrated morphological features of a more recent and widespread event. However the content of free cholesterol did not seem to correlate with the extent of the pathological process.

This finding however, is not surprising since according to our knowledge on the chemical alterations in the myelin fraction in experimental demyelinating processes (cyanide encephalopathy) the free cholesterol of the myelin sheath is, as compared to phospholipids a substantially more stable component of this membrane (Wender et al. 1978).

Comparing the histochemical picture with the CE spectrum it would appear that in the more recent plaques, where a considerable number

of lipomacrophages can be envisaged, the bulk of CE (about 70%) is composed of monoenoic cholesteryl esters (fraction II). This observation, being in agreement with that reported by Wender et al. (1973, 1974), seems to confirm our suggestion that in highly active plaques, the netto effect of formation, hydrolysis and transport of CE is very much in favour of the monoenoic fatty acids, i.e. of oleic and palmitooleic acids.

In old plaques, where the number of lipomacrophages, as well as the concentration of CE is much lower compared to recent demyelination foci, the disproportions in the CE composition are much less pronounced, though still divergent from control brains, i.e. the contribution of monoenoic esters decreases in favour of the saturated and polyunsaturated acids. This might be explained by the interference of the active esterification with hydrolysis and efflux of products. The rate of these processes is likely to depend upon the degree of unsaturation of cholesteryl esters.

M. Wender, A. Petrescu, H. Filipek-Wender, J. Stanisławska

ESTRY CHOLESTEROLU W USZKODZENIACH DEMIELINIZACYJNYCH W ŚWIETLE KORELACJI HISTOCHEMICZNO-BIOCHEMICZNYCH

Streszczenie

Przeprowadzono porównawcze badania histochemiczne i biochemiczne w sąsiadujących częściach 8 skrawków mózgu, wykazujących zmiany demielinizacyjne, a pochodzących z 2 przypadków stwardnienia rozsianego i 1 przypadku podostrego stwardniającego zapalenia mózgu. Wykonano badania histochemiczne i biochemiczne. Obraz estrów cholesterolu w zależności od stopnia nienasyżenia reszt kwasów tłuszczowych określono po rozdziale metodą chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej (Tichy 1971). Oznaczono ogólną zawartość cholesterolu wolnego i zestryfikowanego według Vahouny i wsp. (1963).

Wyniki badań wskazują, że w świeżych ogniskach demielinizacji, w których metodami histochemicznymi stwierdza się dużą ilość lipomakrofagów, a także cholesterolu estryfikowanego, w obrazie tych estrów przeważa (70% całości zestryfikowanego cholesterolu) frakcja II, zawierająca kwasy tłuszczowe jednonienasycone. Zdaje się to wskazywać, że w ogniskach o dużej aktywności procesu patologicznego estryfikacja kwasów tłuszczowych jednonienasyconych: olejowego i palmitoolejowego przeważa nad estryfikacją innymi kwasami tłuszczowymi. W ogniskach starszych, w których maleje liczba makrofagów i ogólna zawartość estrów cholesterolu, zmniejsza się również udział kwasów tłuszczowych jednonienasyconych w składzie estrów cholesterolu na rzecz zwiększenia % estrów nasyconych i zawierających kwasy tłuszczowe wielonienasycone. Należy to tłumaczyć nakładaniem się na aktywny proces estryfikacji kwasów tłuszczowych procesu hydrolizy powstałych estrów jak i odtransportowania powstałych produktów. Ten ostatni proces jest w dużym stopniu zróżnicowany co do szybkości zależnie od stopnia nienasyżenia estrów cholesterolu.

М. Вендер, А. Петреску, Х. Филипек-Вендер, Я. Станиславска

ЭФИРЫ ХОЛЕСТЕРИНА ПРИ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИОННЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ В СВЕТЕ ГИСТО-БИОХИМИЧЕСКИХ КОРРЕЛЯЦИЙ

Резюме

Были проведены сравнительные гистохимические и биохимические исследования в соседствующих друг с другом частях 8 срезов мозга, характеризующихся демиелинизационными изменениями, взятыми от 2 случаев рассеянной склероза и 1 случая субострого оmozололого воспаления мозга. Были применены гистохимические и биохимические исследования. Картину эфиров холестерина, в зависимости от степени ненасыщенности остатков жирных кислот определяли после хроматографического разделения на колонке и тонкослойной хроматографии. Общее содержание свободного и этерифицированного холестерина определяли техникой приведенной Вахоуны и др. (1963).

Результаты исследований показывают, что в свежих очагах демиелинизации, в которых гистохимическими методами обнаруживается большое количество липомакрофагов и этерифицированного холестерина, в картине этих эфиров преобладает (70% общего этерифицированного холестерина) фракция II, содержащая жирные кислоты с одной ненасыщенной связью. По-видимому, это указывает, что в очагах с большой активностью патологического процесса этерификация таких жирных кислот, а именно, олеиновой и нальмитиновой преобладает над этерификацией других жирных кислот. В более старых очагах, в которых число макрофагов, а также общее содержание эфиров холестерина уменьшается; уменьшается также содержание жирных кислот с одной ненасыщенной связью в составе эфиров холестерина в пользу увеличения процента насыщенных эфиров и содержащих жирные кислоты с несколькими ненасыщенными связями. Это следует объяснять наложением процесса гидролиза, образующихся эфиров на активный процесс этерификации жирных кислот и удаления образованных продуктов. Последний процесс в большой степени дифференцирован относительно скорости в зависимости от степени ненасыщенности эфиров холестерина.

REFERENCES

1. Eto Y., Suzuki K.: Cholesterol esters in developing rat brain: Concentration and fatty acid composition. *J. Neurochem.* 1972, 19, 109—115.
2. Petrescu A.: Les étapes du processus de demyelination. *Rev. Neurol.*, 1967, 117, 415—416.
3. Petrescu A.: Histochemistry of lipids in multiple sclerosis, *Wien. Z. Nervenheilk.*, 1969, Suppl. II, 38—52.
4. Petrescu A.: Contribution to the histochemistry of lipids in demyelination (synthetic data). In: J. Gruner (Ed.) *Proc. VI th Int. Cong. Neuropathol.*, 1971, Masson, Paris, 439—440.
5. Tichý J.: Cholesterol esters in foetal brains. *Neurobiology* 1971, 1, 162—170.
6. Vahouny G., Borja C., Weersing S.: Radioactive and analytical determination of free and esterified cholesterol following micro-thin-layer silicic acid chromatography. *Analyt. Biochem.*, 1963. 6. 555—559.

7. Wender M., Filipek-Wender H., Stanisławska B.: Cholesteryl esters in apparently normal white matter in multiple sclerosis. *Europ., Neurol.*, 1973, 10, 340—348.
8. Wender M., Filipek-Wender H., Stanisławska J.: Cholesteryl esters of the brain in demyelinating diseases. *Clin. Chim. Acta*, 1974, 54, 269—275.
9. Wender M., Stanisławska J., Filipek-Wender H.: Cholesteryl esters in cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16,

Author's address: Department of Neurology, Medical Academy, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań, Poland.

HANNA JĘDRZEJOWSKA

RODZAJE DEMIELINIZACJI
WYSTĘPUJĄCE W NERWACH OBWODOWYCH
W POLINEUROPATIACH

Klinika Neurologiczna AM w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. Irena Hausmanowa-Petrusewicz

Demielinizacja, oznaczająca rozpad mieliny z zaoszczędzeniem aksonu, jest zmianą bardzo często widywaną w nerwach obwodowych. Demielinizacja może obejmować pojedyncze międzywęźle lub jego część, bądź też dotyczyć wielu odcinków włókna nerwowego. Jej segmentarny charakter znalazł odbicie w używanej nazwie: odcinkowa demielinizacja. Zdemielinizowany odcinek zostaje następnie zremielinizowany i jeśli demielinizacja obejmowała część międzywęźla, powstaje nowe, krótkie międzywęźle tzw. wtrącone („intercalated internode” — Lubińska, 1958).

W nerwach pobranych od zdrowych osobników odsetek włókien ze zmianami typu demielinizacji i remielinizacji nie przekracza kilku procent (Ochoa, Mair, 1969; Dyck i wsp., 1973b; Drac, 1975), przy czym spotyka się zarówno włókna z pojedynczymi jak i licznymi zmienionymi odcinkami. W większości polineuropatii odsetek włókien ze zmianami typu odcinkowej demielinizacji i remielinizacji znacznie wzrasta. Do niedawna panował powszechnie przyjęty pogląd, że odcinkowa demielinizacja powstaje w wyniku uszkodzenia komórki Schwanna. Znalazło to wyraz w używaniu określenia: pierwotna demielinizacja. Dyck i wsp. (1971) i Thomas (1971) wysunęli przypuszczenie, że w większości procesów chorobowych rozpad mieliny nie jest spowodowany uszkodzeniem komórki Schwanna, a zmianami w aksonie i powstałą demielinizację nazwali wtórną. Wprawdzie już wcześniej podnoszono możliwość takiego mechanizmu demielinizacji (Collins i wsp., 1964), jednakże dopiero po pracach Dycka i Thomasa problem ten stał się przedmiotem szerokiej dyskusji. Przyjęcie tego poglądu wiąże się z rady-

*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego Nr 09.4.1.4.

kalną zmianą dotychczasowych pojęć dotyczących istoty procesu chorobowego w wielu neuropatiach.

Celem niniejszej pracy jest przedstawienie w oparciu o własny materiał obecnych poglądów na temat demielinizacji w nerwach obwodowych w przebiegu różnych polineuropatii.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły wycinki nerwów obwodowych pobrane od chorych z różnymi postaciami polineuropatii, hospitalizowanych w Klinice Neurologicznej AM w Warszawie w latach 1968—1974.

Na ogólną liczbę 85 opracowanych wycinków nerwowych, w 75 (pochodzących od 73 chorych) stwierdzono zmiany typu odcinkowej demielinizacji i remielinizacji, przy czym w większości przypadków odcinkowej demielinizacji towarzyszyły zmiany typu zwyrodnienia aksonalnego. Na 75 nerwów składały się 73 wycinki pobrane na drodze biopsji (w 71 przypadkach nerw łydkowy, w 2 przypadkach — gałązka skórna nerwu promieniowego) i 2 nerwy (łydkowy i łokciowy) pobrane w czasie autopsji.

Rozpoznanie ustalono w oparciu o całokształt przeprowadzonych badań klinicznych i laboratoryjnych, a klasyfikację przypadków należących do grupy genetycznie uwarunkowanych polineuropatii przeprowadzono zgodnie z kryteriami podanymi przez Dycka i Lamberta (1968). Jediną różnicę stanowiło połączenie postaci neuronalnej i rdzeniowej choroby Charcot-Marie-Tooth w jedną grupę nazwaną postacią nieprzerostową. Materiał oraz częstość występowania zmian aksonalnych przedstawiono w tabeli 1.

Wycinki nerwowe badano przy pomocy różnych metod histologicznych podanych uprzednio (Jędrzejowska i wsp., 1972) i przy użyciu mikroskopu elektronowego. Ze względu na to, że dla oceny zmian we włóknach nerwowych wartość posiadają jedynie badania włókien izolowanych i badanie mikroskopowo-elektronowe, tylko te metody zostaną omówione.

Metoda przygotowania włókien izolowanych w pierwszym okresie badań polegała na utrwaleniu wycinka nerwu w 1% roztworze czterotlenku osmu, a następnie przeprowadzeniu przez wzrastające stężenia gliceryny (Jędrzejowska i wsp., 1972). W ostatnich latach wprowadzono utrwalanie w 3% roztworze aldehydu glutarowego, w którym pobrany wycinek umieszczano na 10—15 minut. Po wypłukaniu w buforze kaskodylowym wycinek wkładano do 1% czterotlenku osmu na około 3 godziny. Następnie, po wypłukaniu w wodzie bieżącej i destylowanej przeprowadzano go przez roztwory gliceryny o wzrastającym stężeniu

Tabela 1. Polineuropatie ze zmianami typu odcinkowej demielinizacji i remielinizacji

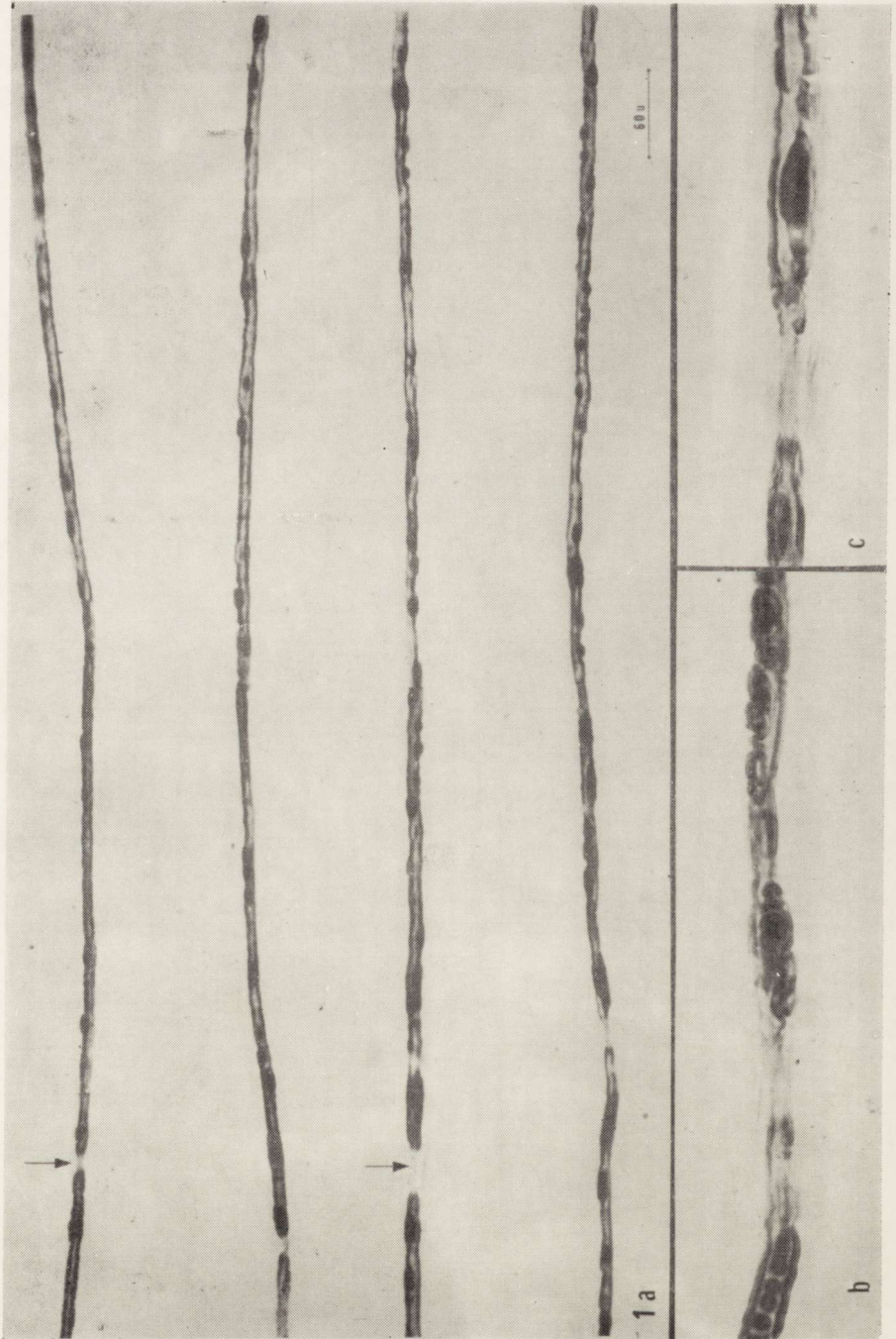
Table 1. Polyneuropathies with segmental de- and remyelination

Rozpoznanie kliniczne Clinical diagnosis	Liczba nerwów Number of nerves	Liczba przypadków Number of cases	Występowanie zwyrodnienia aksonalnego Occurrence of axonal degeneration
Postać nieprzerostowa choroby Charcot-Marie-Tooth Non-hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease	18	18	18
Postać przerostowa choroby Charcot-Marie-Tooth Hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease	19	19	2
Neuropatia przerostowa Dejerine-Sottas*) Hypertrophic neuropathy Dejerine-Sottas	7	7	1
Neuropatia w paraproteinemii Polyneuropathy in paraproteinemia	1	1	1
Neuropatia w przebiegu ostrej, przerywanej porfirii**) Neuropathy in the course of acute, intermittent porphyria	2	1	2
Rodzinna neuropatia czuciowa***) Hereditary sensory neuropathy	1	1	1
Polyganglioradzieuloneuritis Guillain-Barre	8	7	5
Neuropatie o nieustalonej etiologii Neuropathy of unknown origin			
o ostrym przebiegu of acute course	8	8	6
o przewlekłym przebiegu of chronic course	11	11	10
Razem Total	75	73	46

*) Jednym z nerwów był nerw promieniowy
One of the nerves is radial

**) Przypadek autopsyjny
Autopsy case

***) Przypadek Kliniki Neurologicznej Centrum Szkolenia Podyplomowego WAM w Warszawie
Case from Neurological Dept. Military Medical School, Warsaw



(od 5% do 40% roztworu), pozostawiając wycinek w każdym z nich przez 90 minut. Pojedyncze włókna izolowano za pomocą cienkich igiełek lub pincet pod lupą binokularową.

Materiał do badań mikroskopowo-elektronowych utrwalano w aldehydzie glutarowym (początkowo używano 5—6% roztworu; w ostatnich latach stężenie roztworu obniżono do 3%) następnie w 1% roztworze czterotlenku osmu i zatapiano w eponie (dokładny opis metody podano w pracy Jędrzejowskiej i wsp. (1975). Cienkie skrawki dobarwiano 5% roztworem octanu uranylu i 0,25% roztworem cytrynianu ołowiu. Oglądano w mikroskopie elektronowym JEM 7 i JEM 100 B*).

Większość przypadków opracowano przy użyciu obu metod tj. metody izolacji włókien i badania mikroskopowo-elektronowego. Nieliczne przypadki oceniano tylko na podstawie jednej metody.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Demielinizacja w przebiegu zwyrodnienia aksonalnego (tzw. wtórna demielinizacja)

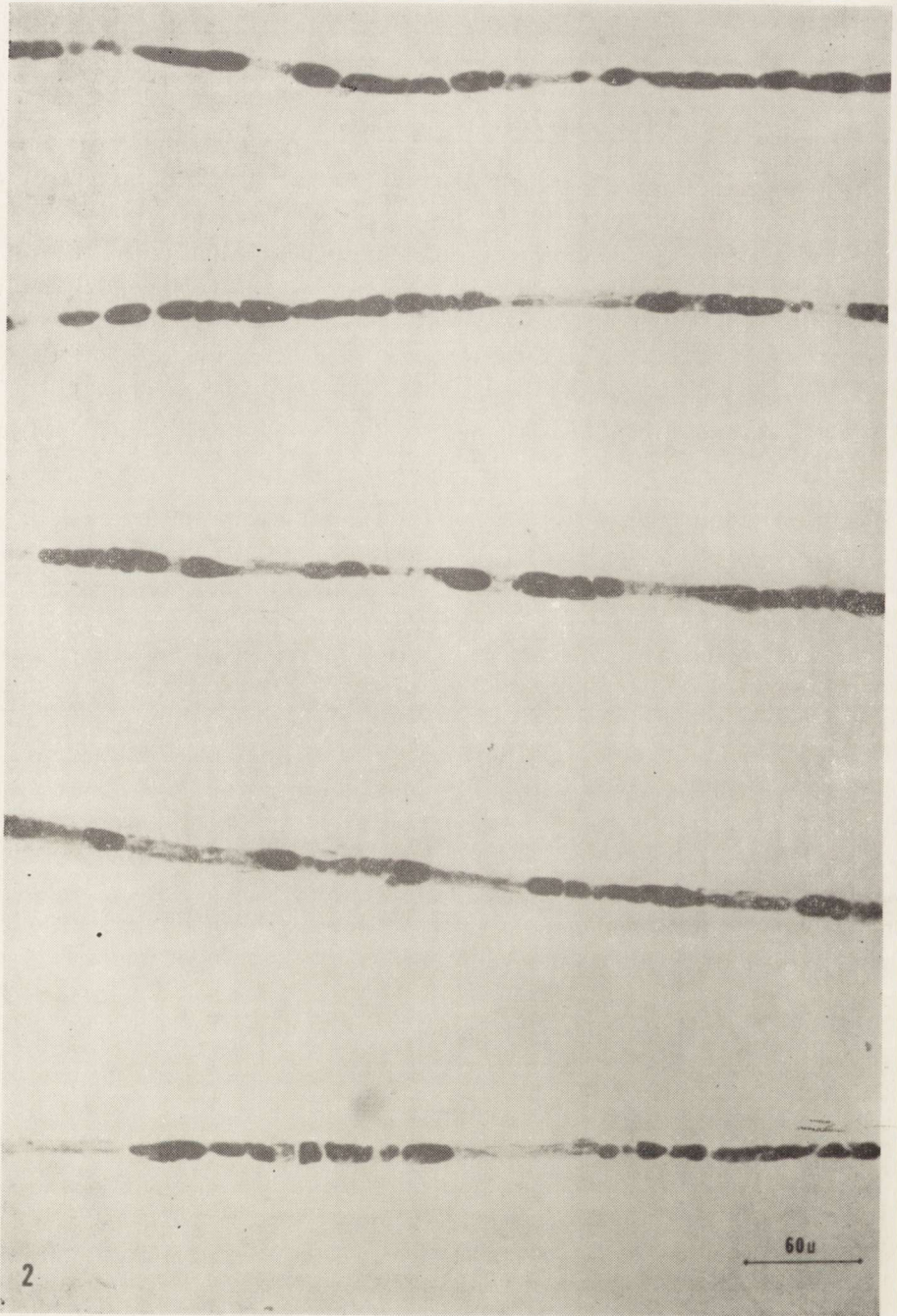
W bardzo wielu polineuropatiach stwierdza się obecność włókien ze zmianami typu zwyrodnienia aksonalnego, prowadzącego poprzez obrazy podobne do obserwowanych w zwyrodnieniu Wallera, do rozpadu włókna. Podobieństwo to odnosi się jedynie do zmian widocznych w mikroskopie świetlnym. W obrazie mikroskopowo-elektronowym istnieją wyraźne różnice pomiędzy zmianami występującymi w zwyrodnieniu Wallera a zwyrodnieniem aksonalnym stwierdzanym w polineuropatiach, jak również obserwuje się różnice pomiędzy poszczególnymi polineuropatiami w zależności od etiopatogenezy.

W badaniu histologicznym wczesny okres zwyrodnienia aksonalnego wyraża się poszerzeniem przewężeń Ranviera oraz nieregularnością mieliny (ryc. 1). Następne stadium procesu chorobowego charakteryzuje stopniowy rozpad włókna, nie do odróżnienia od fragmentacji występującej w zwyrodnieniu Wallera (ryc. 2).

*) Badania w mikroskopie elektronowym JEM 100 B prowadzono w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego w Warszawie

Ryc. 1. a. Kolejne odcinki włókna czesanego nerwu łydkowego w przypadku ostrej polineuropatii o niejasnej etiologii. Rozszerzenie przewężeń Ranviera (strzałki) oraz nieregularność mieliny; b. i c. Większe powiększenie okolic okołoprzewęzeniowych tego samego włókna. Pow. 400 X.

Fig. 1. a. Consecutive lengths of teased fibre from sural nerve of patient with acute polyneuropathy of unknown origin. Widening of nodes of Ranvier (arrows) and irregularity of myelin; b. and c. Higher magnification of paranodal regions of the same teased fibre. X 400.



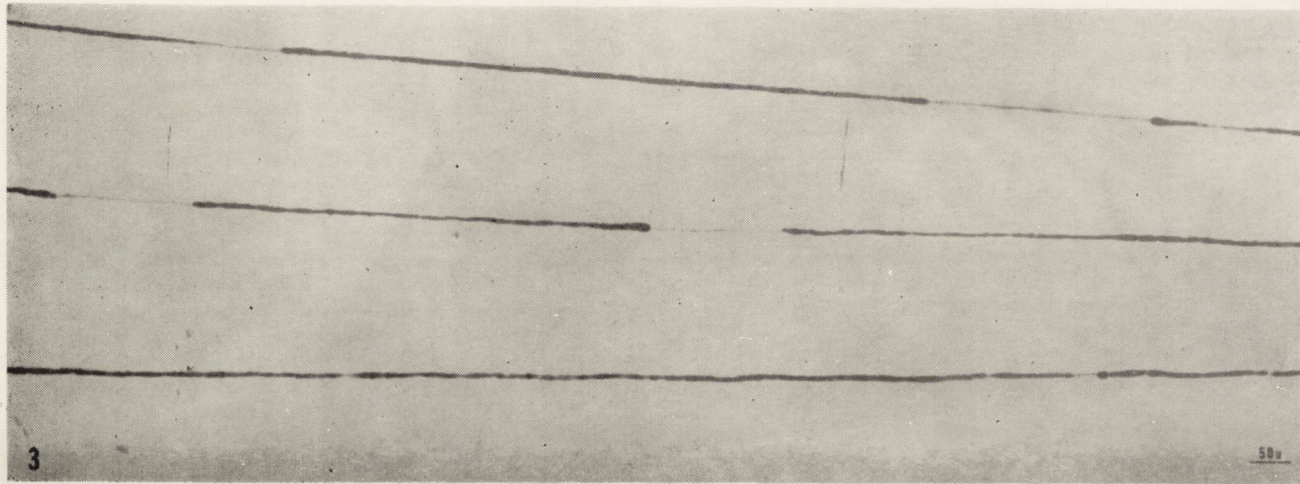
W niektórych przypadkach ostro przebiegających polineuropatii takich jak guzkowe zapalenie tętnic (obserwacje własne), zatrucie hydrazidem kwasu izonikotynowego (Schlaepfer, Hager, 1964; Ochoa, 1970), arsenem (Ohta, 1970) winkrystyną (Bradley i wsp., 1970), trój-orto-krezylo-fosforanem (Cavanagh, 1964; Bischoff, 1967; Prineas, 1969) i niekiedy w porfirii (Cavanagh, Mellick, 1965; Cavanagh, Ridley, 1967; Sweeney i wsp., 1970) zwyrodnienie aksonalne typu Wallera dotyczy wielu włókien i stanowi jedyną nieprawidłowość we włóknach nerwowych. Jednakże znacznie częściej, praktycznie w większości przypadków polineuropatii, obok tak zmienionych włókien widoczne są włókna z licznymi zdemielinizowanymi i/lub remielinizującymi odcinkami (ryc. 3). We włóknach tych mielina zachowanych międzywęzli często wykazuje wybitną nieregularność (ryc. 4), a w zdemielinizowanych aksonach badanie mikroskopowo-elektronowe ujawnia niekiedy wyraźne nieprawidłowości, szczególnie w przypadkach przebiegających podostro. U chorych, u których proces chorobowy przebiega przewlekłe, zmiany w zdemielinizowanych aksonach należą do rzadkości (ryc. 5).

Do polineuropatii charakteryzujących się częstym występowaniem włókien ze zwyrodnieniem aksonalnym i rzadkim występowaniem włókien zdemielinizowanych, należą w naszym materiale przypadek porfirii (podobnie jak w materiale Thomasa, 1971) i większość przypadków polineuropatii o nieustalonej etiologii i ostrym przebiegu. W tej grupie chorób w piśmiennictwie najwięcej danych dotyczy mocznicy (Dyck i wsp., 1971; Thomas i wsp., 1971) oraz doświadczalnego zatrucia akrylamina (Hopkins, 1970). Właśnie na podstawie badań w mocznicy Dyck i wsp. (1971) wysunęli przypuszczenie o wtórnym pochodzeniu demielinizacji w tej chorobie. Na poparcie tej hipotezy przytaczają oni następujące argumenty: występowanie demielinizacji tylko w niektórych włóknach, obecność licznych zmienionych odcinków w obrębie jednego włókna, występowanie zmian ultrastrukturalnych w zdemielinizowanych aksonach oraz wyższy odsetek zmienionych włókien w odsiebny odcinku nerwu aniżeli w ksobnym.

Przeprowadzone przez Dycka i wsp. badanie stosunku obszaru powierzchni przekroju poprzecznego aksonu do grubości mieliny wykazało zmniejszenie powierzchni aksonów. Według Dycka i wsp. w przebiegu mocznicy pierwotne zmiany dotyczą aksonu i wyrażają się na-

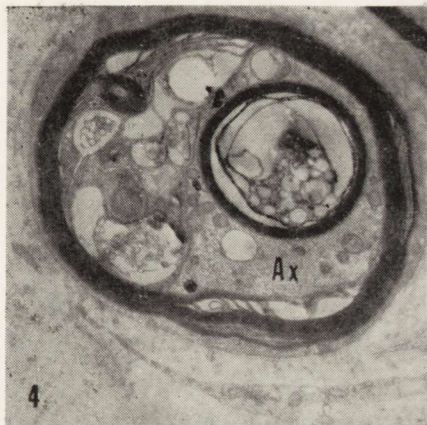
Ryc. 2. Kolejne odcinki włókna czesanego w tym samym przypadku co na ryc. 1. Rozpad włókna na owoidy. Obraz podobny do zmian w przebiegu zwyrodnienia Wallera.

Fig. 2. Consecutive lengths of teased fibre in the same case as in Fig. 1. Fragmentation of fibre into ovoids. Changes similar to those observed in Wallerian degeneration.

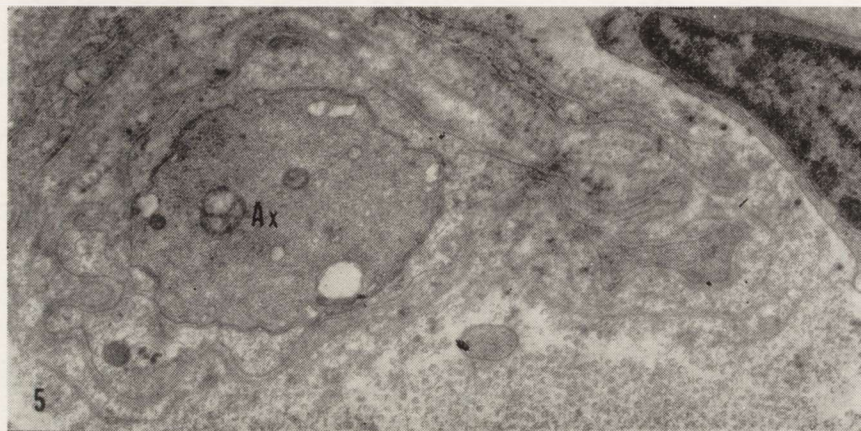


Ryc. 3. Kolejne odcinki czesanego włókna nerwu łydkowego w przypadku nieprzerostowej postaci Charcot-Marie-Tooth. Liczne odcinki zdmielinizowane i remielinizujące.

Fig. 3. Consecutive lengths of teased fibre from sural nerve in a case of non-hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease. Multiple regions of segmental demyelination and remyelination.



Ryc. 4. Nerw łydkowy w przypadku nieprzerostowej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth. Obraz mikroskopowo-elektronowy poprzecznego przekroju włókna wykazującego nieregularność mieliny. Akson (Ax) bez wyraźnych zmian. Pow. 8200 \times .
 Fig. 4. Sural nerve in a case of non-hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease. Electron micrograph of transverse section of fibre with irregularity of myelin. Axon (Ax) is well preserved. \times 8200.



Ryc. 5. Nerw łydkowy w przypadku nieprzerostowej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth. Zdemyelinizowany akson (Ax); wydaje się, że zawiera on nadmierną ilość włókienek (ocena trudna ze względu na lekko skośny przekrój). Pow. 14350 \times .
 Fig. 5. Sural nerve of a patient with non-hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease. Demyelinated axon (Ax) seems to contain an increased number of filaments (evaluation difficult due to slightly oblique section). \times 14.350.

gromadzeniem organelli i postępującym zanikiem (kurczeniem się) aksonu, co powoduje nieregularny przebieg mieliny a następnie jej rozpad. Zdemielinizowany odcinek może zostać zremielinizowany, jednakże w miarę trwania procesu chorobowego dochodzi do zaawansowanych zmian w aksonie i rozpadu włókna, podobnie jak w zwyrodnieniu Wallera.

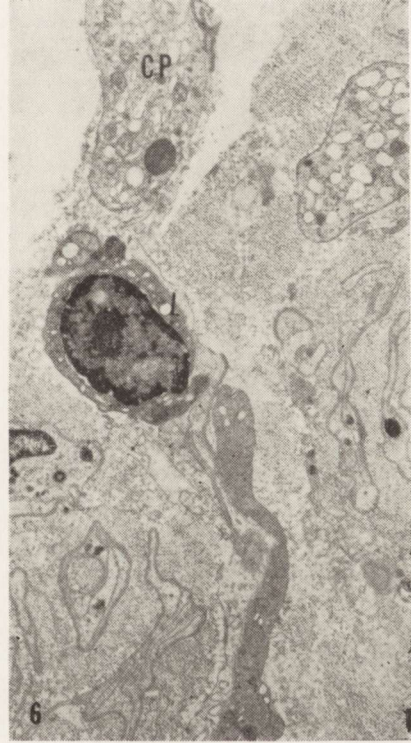
W polineuropatiach przebiegających przewlekłe, reprezentowanych w naszym materiale przez przypadki nieprzerostowej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth, polineuropatie o nie ustalonej etiologii oraz po jednym przypadku rodzinnej neuropatii czuciowej i polineuropatii w dysproteinemii, w powstawaniu demielinizacji, zdaniem Dycka i wsp. (1973a) przede wszystkim odgrywa rolę stopniowo postępujący zanik aksonu. Sekwencja zmian podobna jest do opisanej powyżej, jedynie proces chorobowy ma znacznie wolniejszy przebieg, co tłumaczy zdaniem autorów częstsze niż w grupie poprzedniej występowanie włókien zdemielinizowanych i rzadsze — włókien ze zwyrodnieniem aksonalnym typu Wallera. Modelem dla opracowania tego typu zmian stała się dla Dycka i wsp. (1973a) choroba Friedreicha.

Przyjmując hipotezę o wtórnym pochodzeniu demielinizacji należy się liczyć z możliwością, że polineuropatie, w których współlistnieje wyraźne zwyrodnienie aksonalne z odcinkową demielinizacją są pochodzenia pierwotnie aksonalnego (Dyck i wsp., 1973a). Poza polineuropatiami omawianymi powyżej należy tu przede wszystkim polineuropatia cukrzycowa, ołowicza i błonicza, w których, zgodnie z dotychczas przyjętym poglądem, demielinizacja miała mieć charakter pierwotny (Webster i wsp., 1961; Cavanagh, Jacob, 1964; Webster 1964; Thomas, Lascelles, 1965; 1966; Lampert, Schochet, 1968; Chopra i wsp., 1969; Allt, Cavanagh, 1969; Schlaepfer 1969 i in.).

Pierwotna demielinizacja

Do procesów chorobowych, w których występuje pierwotne uszkodzenie mieliny, należy demielinizacja powstała przy udziale komórek krwiopochodnych (ryc. 6). Najczęstszym przedstawicielem tej grupy chorób, a jedynym w naszym materiale, jest *polyganglioradiculoneuritis* Guillain-Barré, schorzenie zaliczane do grupy chorób autoimmunologicznych typu nadwrażliwości komórkowej. Pierwsze zmiany histologiczne pojawiają się przed wystąpieniem objawów klinicznych, toteż znane są jedynie z badań nad doświadczalnym alergicznym zapaleniem wielonerwowym, uważanym za model zespołu Guillain-Barré. Polegają one na przedostawaniu się poza naczynia limfocytów, ich transformacji i tworzeniu przez nie nacieków okołonaczyniowych (Aström i wsp., 1968).

Następnym etapem zmian jest wnikanie do komórek Schwanna dużych, jednojądrzastych komórek, w których obecności rozpoczyna się rozpad mieliny w postaci rozpadu pęcherzykowego lub wskutek rozszczepiania się warstw mieliny (Raine i wsp., 1969; Ballin, Thomas 1969; Wiśniewski i wsp., 1969; Prineas 1971, 1973; Wiśniewski i wsp., 1974). Obrazem, na który najczęściej natrafia się w przypadkach zespołu Guillain-Barré, jest obecność makrofagów zawierających resztki rozpadłej mieliny wewnątrz komórki Schwanna oraz występowanie włókien zdemielinizowanych i remielinizujących.

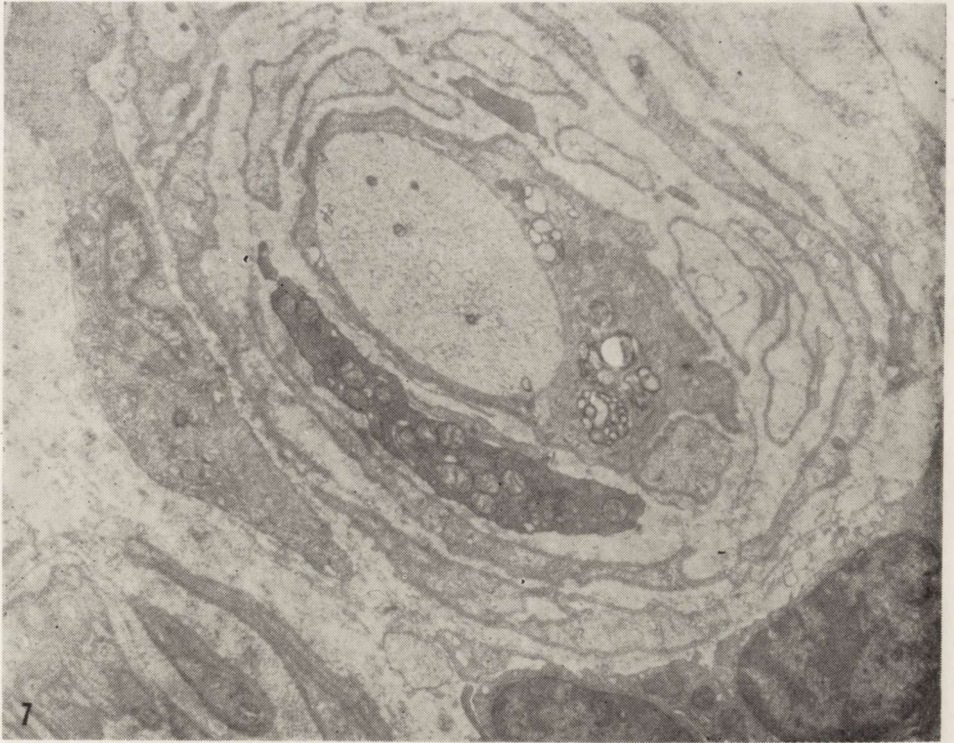


Ryc. 6. Nerw łydkowy w przypadku zespołu Guillain-Barré. W endoneuralnym kolagenie widoczny limfocyt (L) oraz wypustki, prawdopodobnie fibroblastów (CP). Pow. 5100 \times .

Fig. 6. Sural nerve of a patient with Guillain-Barré syndrome. Lymphocyte (L) and cell processes, probably of fibroblasts (CP) are placed within endoneurial collagen. \times 5100.

Zarówno odsetek zdemielinizowanych włókien jak i obszar zmian w obrębie jednego włókna bywają bardzo różne w poszczególnych przypadkach. Zdemielinizowane aksony nie wykazują wyraźnych zmian z wyjątkiem zmniejszenia ich średnicy (Raine i wsp., 1969). Uważa się, że podobny mechanizm demielinizacji występuje w poszczepiennym zapaleniu nerwów.

Powszechnie jest przyjęty pogląd, że pierwotna demielinizacja może być także wyrazem wrodzonego zaburzenia metabolicznego komórki Schwanna. Do tej grupy zalicza się leukodystrofię metachromatyczną, leukodystrofię Krabbego i neuropatie przerostowe.

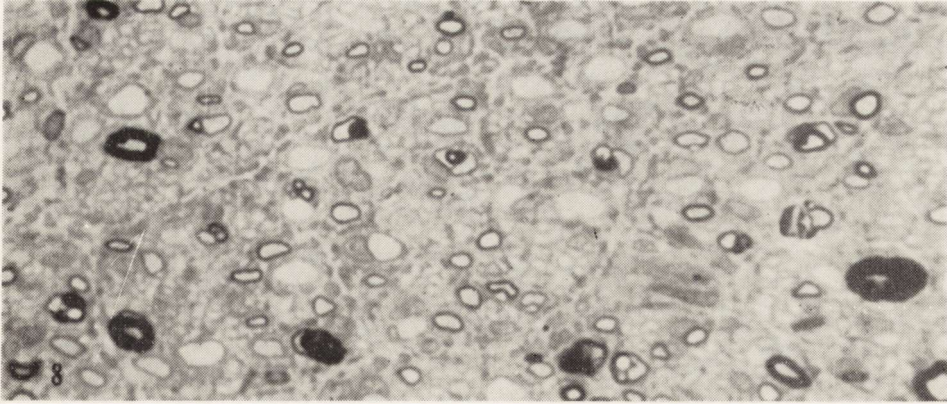


Ryc. 7. Nerw łydkowy w przypadku nawrotowego zespołu Guillain-Barré. W komórce Schwanna otaczającej zdemyelinizowany akson widoczny makrofag zawierający resztki mieliny. Wokół komórki koncentrycznie ułożone warstwy kolagenu i wypustek komórek Schwanna („onion-bulb”). Pow. 6600 \times .

Fig. 7. Sural nerve from a case with recurrent form of Guillain-Barré syndrome. Within the Schwann cell demyelinated axon and macrophage containing remnants of myelin. Around the Schwann cell there are concentrically arranged Schwann cell processes with intervening layers of collagen (onion-bulb). \times 6600.

Leukodystrofie nie są przedmiotem niniejszego opracowania, natomiast neuropatie przerostowe, stanowiące pokaźny odsetek naszego materiału, wymagają krótkiego omówienia (dokładny opis zmian w neuropatiach przerostowych znajduje się w pracy Jędrzejowskiej i wsp., 1975).

W neuropatiach przerostowych, reprezentowanych w naszym materiale przez przerostową postać choroby Charcot-Marie-Tooth i neuropatię Dejerine'a-Sottasa, a w piśmiennictwie ponadto przez chorobę Refsuma, odcinkowa demielinizacja i remielinizacja są widoczne w bardzo licznych włóknach, dotyczą długich obszarów na ich przebiegu oraz występują we wszystkich okresach procesu chorobowego (ryc. 8 i 9). W wyniku powtarzającej się naprzemiennie demielinizacji i remielinizacji dochodzi do powstania koncentrycznie zbudowanych struk-



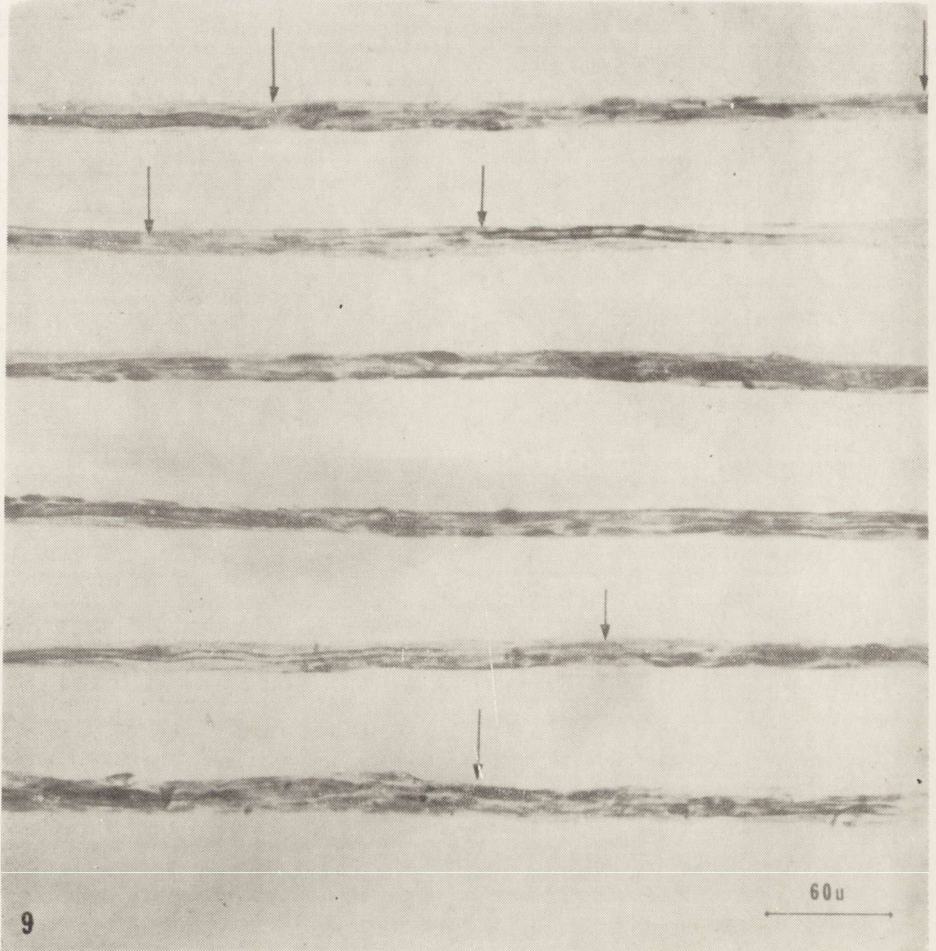
Ryc. 8. Bardzo liczne zdemielinizowane i remielinizujące włókna w nerwie łydkowym we wczesnym okresie neuropatii przerostowej typu Charcot-Marie-Tooth. Gruby skrawek eponowy barwiony według metody Pala-Kultschicky'ego. Pow. 900 \times .

Fig. 8. Numerous demyelinated and remyelinated fibres in sural nerve from a patient in early period of hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease. Thick epon section stained according to Pal-Kultschicky method. \times 900.

tur zwanych „onion-bulb” (ryc. 10). Aksony zazwyczaj nie wykazują wyraźnych zmian, jednakże niekiedy, szczególnie w zaawansowanym okresie choroby, można w nich napotkać pewne nieprawidłowości (ryc. 10).

Wysunięty przez Dycka (1966) i Wellera (1967) pogląd, że proces chorobowy jest wynikiem genetycznie uwarunkowanego zaburzenia metabolicznego komórki Schwanna, został w następnych latach powszechnie zaakceptowany. Jednakże stanowisko to zostało poddane w wątpliwość przez Dycka i wsp. w 1974 r., którzy uważają, że w neuropatii przerostowej przekazywanej dominująco (tj. przerostowej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth) istnieją dane świadczące o pierwotnym uszkodzeniu aksonów. Dyck i wsp. (1974) stwierdzili większe nasilenie zmian demielinizacyjnych w odcinkach odsiebnych nerwu aniżeli w odcinkach ksobnych oraz zmniejszenie powierzchni aksonów i sądzą, że przyczyną rozległej demielinizacji jest bardzo powoli postępujący zanik aksonów. Czy pogląd ten jest słuszny i czy dotyczy wszystkich postaci neuropatii przerostowych powinny wykazać badania następnych lat. Faktem jest, że w przerostowych neuropatiach dochodzi do wybitnego ubytku liczby włókien mielinowych, jednakże nie wiadomo jaki jest mechanizm tego zjawiska. Włókna ulegające rozpadowi są widywane nader rzadko, jak również z reguły nie stwierdza się pasm Bün-gera, których obecność świadczy o zniszczeniu włókien. Bardzo powolne kurczenie się aksonu prowadzące do jego zniknięcia mogłoby tłumaczyć

ubytek włókien rozpadających się, jednakże, pozostaje nierozstrzygnięte zagadnienie, który element włókna nerwowego (akson czy mielina) są w tym procesie chorobowym pierwotnie uszkodzone.



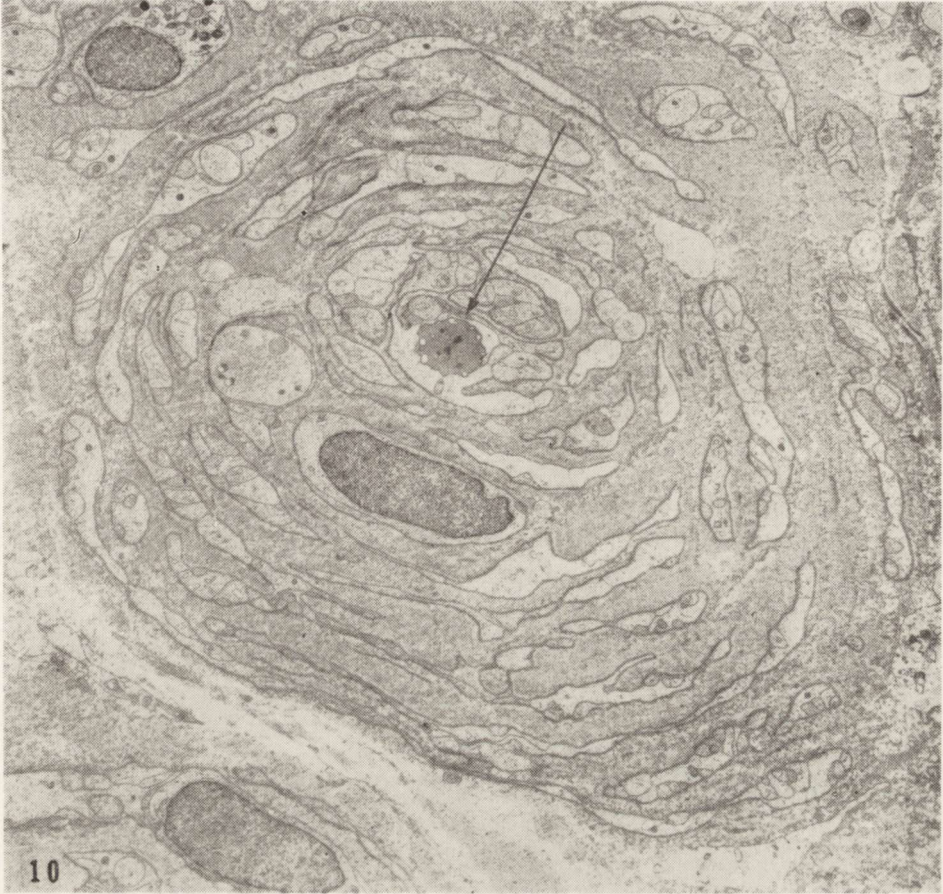
Ryc. 9. Kolejne odcinki cienkiego włókna czesanego z nerwu łydkowego w zaawansowanym przypadku przerostowej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth. Widoczne liczne zdemielinizowane odcinki (strzałki).

Fig. 9. Consecutive lengths of thin teased fibre from sural nerve in a case of hypertrophic form of Charcot-Marie-Tooth disease. Numerous regions of demyelination (arrows).

PODSUMOWANIE

Polineuropatie podzielić można na 3 grupy w zależności od typu zmian we włóknach nerwowych: 1) ze zmianami aksonalnymi typu Wallera, 2) z odcinkową demielinizacją i remielinizacją oraz 3) ze zmianami zarówno aksonalnymi jak i demielinizacyjnymi.

W pierwszej grupie pierwotność uszkodzenia aksonu (czy ciała komórki) nie budzi wątpliwości, natomiast w obu pozostałych grupach nie rozstrzygnięto miejsca pierwotnego uszkodzenia we włóknie ner-



Ryc. 10. Nerw łydkowy w przypadku zaawansowanej neuropatii przerostowej Dejerine'a i Sottasa. Wewnątrz dużego „onion-bulb” zdemielinizowany akson o wyraźnie zagęszczonej strukturze (strzałka). Pow. 2500 X.

Fig. 10. Sural nerve in an advanced case of hypertrophic neuropathy Dejerine-Sottas. Inside of a large onion-bulb demyelinated axon with markedly dense structure (arrow). X 2500.

wowym. Uważa się, że pierwotne uszkodzenie mieliny występuje w *polyganglioradiculoneuritis* Guillain-Barré i innych neuropatiach powstających w drodze mechanizmu immunologicznego oraz w niektórych polineuropatiach w przebiegu chorób ośrodkowego układu nerwowego. W stosunku do wszystkich pozostałych neuropatii należących do 2 i 3 grupy podnosi się możliwość występowania demielinizacji wtórnie do zmian w aksonie. Hipoteza ta znajduje uzasadnienie w bliskim związku

czynnościowym pomiędzy aksonem i komórką Schwanna; poparta jest także szeregiem obserwacji. Przy stosowaniu dotychczasowych metod badań jest ona jednakże nie do udowodnienia, a wszystkie z przytaczanych na jej korzyść argumentów mogą znaleźć inne tłumaczenie. W pierwszym rzędzie dyskusyjny charakter ma obecność zmian w zdmielinizowanych aksonach. Jak wykazują nasze obserwacje przypadków trzeciej grupy o powolnym przebiegu choroby (np. nieprzerostowej postaci choroby Charcot-Marie-Tooth) oraz neuropatii przerostowych, występowanie zmian w zdmielinizowanych aksonach należy do rzadkości, a zanik aksonu nie może być traktowany jako wykładnik pierwotności uszkodzenia, ponieważ może się on pojawiać wtórnie do demielinizacji, jak wykazano w alergicznym, doświadczalnym zapaleniu wielonerwowym. Szczegółowa dyskusja nad innymi argumentami przemawiającymi za wtórną demielinizacją przekracza niniejsze opracowanie. Wspomnę jedynie, że biorąc chociażby pod uwagę dane dotyczące embriogenezy oraz różnic anatomicznych w poszczególnych odcinkach obwodowego układu nerwowego, występowanie zmian demielinizacyjnych tylko w niektórych włóknach, jak również większe ich nasilenie w części odsiebnej nerwu aniżeli ksobnej, może być tłumaczone innymi przyczynami aniżeli pierwotne uszkodzenie aksonu. Wydaje się więc, że brak jest jeszcze dostatecznych podstaw aby dla wszystkich polineuropatii, z wyjątkiem zespołu Guillain-Barré, przyjąć mechanizm wtórnej demielinizacji. Wydaje się, że wtórna demielinizacja występuje we względnie ostro przebiegających polineuropatiach trzeciej grupy, w której zdmielinizowane aksony z reguły wykazują wyraźne zmiany, natomiast budzi wątpliwość taki mechanizm demielinizacji w neuropatiach przerostowych.

Bardzo serdecznie dziękuję doc. dr hab. R. Aleksandrowiczowi za pobieranie biopsji nerwowych oraz mgr Z. Glince i mgr W. Wach za pomoc w przygotowaniu materiału.

X. Енджеёвска

ВИДЫ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ, ВЫСТУПАЮЩИЕ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВАХ ПРИ ПОЛИНЕВРОПАТИЯХ

Резюме

В работе приводятся мовременные взгляды на вопрос демиелинизации в периферических нервах при различных полиневропатиях. Собственный материал составляют 75 нервов, полученных от 73 больных. Абсолютное большинство материала составляли нервы икроножной мышцы, взятые путем биопсии, а оценка материала проводилась главным образом на основе исследований расчесанных волокон и электронно-микроскопических исследований. Первостепенным вопросом, рассматриваемым в работе, является демиелинизация, возникающая, согласно современным взглядам, вторично относительно изме-

нений в аксоне. Основываясь на рекомендуемых критериях можно предполагать её наличие в абсолютном большинстве полиневропатий, в которых имеется одновременно аксональная дегенерация типа Валлеровского с сегментной демиелинизацией. Для доказательства этой гипотезы недостаточно использование лишь принятых до сих пор методов.

На примере случаев синдрома Гюллен-Барре обсуждается первичная демиелинизация и характер демиелинизации при гипертрофических ревропатиях.

H. Jędrzejowska

THE TYPES OF DEMYELINATION OF PERIPHERAL NERVES
IN POLYNEUROPATHIES

Summary

Author discusses present opinions on the demyelination of peripheral nerves in different types of polyneuropathies. Investigated material consists of 75 nerves taken from 73 patients. It was mostly a sural nerve taken at biopsy. Estimation of changes was based on the teased fibres and electron microscope studies. The first problem discussed is a demyelination, considered at present to be secondary to the axonal changes. According to postulated criteria it could be suspected that such demyelination should appear in majority of polyneuropathies, i.e. in almost all cases in which Wallerian axonal degeneration takes place together with segmental demyelination. It seems that such hypothesis though very probable, cannot be proved with presently used methods.

The type of primary demyelination exemplified by the cases of Guillain-Barre syndrome and the character of hypertrophic neuropathies is being discussed.

PISMIENNICTWO

1. Allt G., Cavanagh J. B.: Ultrastructural changes in the region of the node of Ranvier in the rat caused by diphtheria toxin. *Brain* 1969, 92, 459—468.
2. Aström K. E., de F. Webster H., Arnason B. G.: The initial lesion in experimental allergic neuritis. *J. Exp. Med.*, 1968, 128, 469—496.
3. Ballin R. H. M., Thomas P. K.: Electron microscope observations of demyelination and remyelination in experimental allergic neuritis. *J. neurol. Sci.*, 1969, 8, 1—18.
4. Bischoff A.: The ultrastructure of tri-ortho-cresyl phosphate poisoning. *Acta neuropath. (Berl.)* 1967, 9, 158—174.
5. Bradley W. G., Lassman L. P., Pearse G. W., Walton J. N.: The neuromyopathy of vincristine in man. *J. neurol. Sci.*, 1970, 10, 107—131.
6. Cavanagh J. B.: Peripheral nerve changes in ortho-cresyl phosphate poisoning in the cat. *J. Path. Bact.*, 1964, 87, 365—383.
7. Cavanagh J. B., Jacobs J.: Some quantitative aspects of diphtheric neuropathy. *Br. J. Exp. Path.*, 1964, 45, 309—322.
8. Cavanagh J. B., Mellick R. S.: On the nature of peripheral nerve lesions associated with acute intermittent porphyria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1965, 28, 320—327.
9. Cavanagh J. B., Ridley A. R.: The nature of neuropathy complicating acute intermittent porphyria. *Lancet* 1967, 2, 7524, 1023—1031.

10. Chopra J. S., Hurwitz L. J., Montgomery D. A. D.: The pathogenesis of sural nerve changes in diabetes mellitus. *Brain* 1969, 92, 391—418.
11. Collins G. H., de F. Webster H., Victor M.: The ultrastructure of myelin and axonal alteration in sciatic nerves of thiamine deficient and chronically starved rats. *Acta neuropath. (Berl.)* 1964, 3, 511—521.
12. Drac H.: Maszynopis pracy doktorskiej.
13. Dyc. P. J.: Histologic measurements and fine structure of biopsied sural nerve: normal and in peroneal muscular atrophy, hypertrophic neuropathy and congenital sensory neuropathy. *Mayo Clin. Proc.*, 1966, 41, 742—774.
14. Dyck P. J., Johnson W. J., Lambert E. H., O'Brien P. C.: Segmental demyelination secondary to axonal degeneration in uremic neuropathy. *Mayo Clin. Proc.*, 1971, 46, 400—431.
15. Dyck P. J., Lais A. C.: Evidence for segmental demyelination secondary to axonal degeneration in Friedreich's ataxia. W: *Clinical Studies in Myology, Cz. II International Congress Series No 295. Excerpta Medica, Amsterdam, 1973a*, 253—263.
16. Dyck P. J., Lais A. C., Offord K. P.: The nature of myelinated nerve fiber degeneration in dominantly inherited hypertrophic neuropathy. *Mayo Clin. Proc.*, 1974, 49, 34—39.
17. Dyc. P. J., Lambert E. H.: Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1968, 18, 603—618 i 619—625.
18. Dyck P. J., Shultz P. W., Lais A. C.: Mensuration and histologic typing of teased myelinated fibers of healthy sural nerve of man. W: *Clinical Studies in Myology, Cz. II International Congress Series No 295, Excerpta Medica, Amsterdam, 1973b*.
19. Hopkins A.: The effect of acrylamide on peripheral nervous system of the baboon. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1970, 33, 805—816.
20. Jędrzejowska H., Drac H., Sawicka E.: Mechanizm powstawania zmian typu „onion-bulb” w neuropatiach przerostowych Charcot-Marie-Tooth i Dejerine-Sottas. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 93—106.
21. Jędrzejowska H., Sawicka E., Drac H., Glinka Z.: Metody badania histologicznego nerwów obwodowych. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 87—98.
22. Lampert P. W., Schochet S. S.: Demyelination and remyelination in lead neuropathy. *J. Neuropat. Exp. Neurol.*, 1968, 27, 527—545.
23. Lubińska L.: „Intercalated” internodes in nerve fibres. *Nature* 1958, 181, 957—958.
24. Ochoa J.: Isoniazid neuropathy in man: quantitative electron microscope study. *Brain* 1970, 93, 831—850.
25. Ochoa J., Mair W. G. P.: The normal sural nerve in man. *Acta neuropath. (Berl.)* 1969, 13, 197—216.
26. Ohta M.: Ultrastructure of sural nerve in a case of arsenical neuropathy. *Acta neuropath. (Berl.)* 1970, 16, 233—245.
27. Prineas J.: The pathogenesis of dying back polyneuropathies. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1969, 28, 571—597.
28. Prineas J.: Demyelination and remyelination in recurrent idiopathic polyneuropathy. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 18, 34—57.
29. Prineas J. W.: Demyelination in the Guillain-Barré syndrome: an electron microscope study. W: *Clinical Study in Myology. Cz. II International Congress Series No 295. Excerpta Medica, Amsterdam 1973*, 264—268.

30. Raine C. S., Wiśniewski H., Prineas J.: An ultrastructural study of experimental demyelination and remyelination. II chronic experimental allergic encephalomyelitis in the peripheral nervous system. *Lab. Invest.*, 1969, 21, 316—327.
31. Schlaepfer W. W.: Experimental lead neuropathy. A disease of the supporting cells in the peripheral nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1969, 28, 401—413.
32. Schlaepfer W. W., Hager H.: Ultrastructural studies of INH-induced neuropathy in rats. *Am. J. Path.*, 1964, 45, 209—219, 423—430.
33. Sweeney V. P., Pathak M. A., Asbury A. K.: Acute intermittent porphyria. *Brain* 1970, 93, 369—380.
34. Thomas P. K.: The morfological basis for alterations in nerve conduction in peripheral neuropathy. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1971, 64, 295—298.
35. Thomas P. K., Hollinrake K., Lascelles R. G.: The polyneuropathy of chronic renal failure. *Brain* 1971, 94, 761—780.
36. Thomas P. K., Lascelles R. G.: Schwann-cell abnormalities in diabetic neuropathy. *Lancet* 1965, 1, 7400, 1355—1357.
37. Thomas P. K., Lancelles R. G.: The pathology of diabetic neuropathy. *Quart. J. Med.*, 1966, 35, 489—509.
38. Webster H. de F.: Some ultrastructural features of segmental demyelination and myelin regeneration in peripheral nerve. Mechanism of neural regeneration. Elsevier, Amsterdam 1964, 151—172.
39. Webster H. de F., Spiro D., Waksman B., Adams R. D.: Phase and electron microscopic studies of experimental demyelination. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1961, 20, 5—13.
40. Weller R. O.: An electron microscopic study of hypertropic neuropathy of Dejerine and Sottas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1967, 30, 111—125.
41. Wiśniewski H. M., Brostoff S. W., Carter H., Eylar E. H.: Recurrent experimental allergic polyganglioradiculoneuritis. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1974, 30, 347—358.
42. Wiśniewski H. M., Terry R. D., Whitaker J. N. i in.: Landry-Guillain-Barré syndrome. A primary demyelinating disease. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1969, 21, 269—276.

Adres autorki: Klinika Neurologiczna Akademii Medycznej, ul. Oczki 6, 02-005 Warszawa.

M. ALEXIANU, M. MACOVEI-PATRICHI, A. PETROVICI

ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS IN THE MUSCLE IN DIABETIC AMYOTROPHY

The Institute of Neurology and Psychiatry, Neurological Clinic
of the „G. Marinescu” Hospital, „Cantacuzino” Institute, Bucharest, Romania

Diabetic amyotrophy as described by Garland and Taverner in 1953 is a matter of controversy, some authors holding it to be a metabolic myopathy (Garland, 1955; Cimpeanu et al., 1971; Malene, Stroia, 1974), while others regard it as a manifestation of diabetic neuropathy (Gregsens, 1969; Tomonaga et al., 1973).

Present paper was designed to the study of the ultrastructural aspects of muscle biopsies from 4 diabetics with various degree of amyotrophy and clinical evidence of neuropathy with variable intensity. We considered to be of interest whether the primary ultrastructural alterations caused by diabetes could be differentiated from the alterations secondary to the diabetic neuropathy.

MATERIAL AND METHOD

The study included 4 patients: 3 men and 1 woman, who had been suffering from diabetes for 6 months to 25 years. Patients' age ranged between 25 and 65 years.

All patients were treated with insulin however, a satisfactory equilibration of the diabetes was difficult to obtain. The common clinical features in these cases, irrespective of the disease duration were following: paraesthesia of varied intensity up to piercing pains in legs, especially at night and motor impairment in lower extremities, predominant in the area of the external popliteal sciatic nerve with gait disturbances.

One patient, aged 60, with a 5-years history of diabetes, presented trophic disturbances: perforating ulcer of the right foot in the mediotarsal region. In none of the cases evidence of objective sensitivity disorders was found.

The patients exhibited bilateral distal amyotrophy of the lower extremities, with absence of the Achilles tendon and patellar reflexes. The EMG tracings recorded from the muscles of the legs revealed partial denervation and diminished nervous conduction and excitability.



Fig. 1. Glycogen accumulation in the area of ultrastructural disorganization in the centre of the fibre. $\times 21,000$.

Ryc. 1. Skupienie glikogenu w centralnej części włókna w polu o zatartej budowie. Pow. $21,000 \times$.



Fig. 2. Myofibrillary lesions and disappearance of some Z bands. $\times 21,000$.
Ryc. 2. Uszkodzenie włókienek mięśniowych i zniknięcie niektórych pasm Z.
Pow. 21.000 \times .

Fragments were collected from the calf muscles. For optic microscopy study the tissue was fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin, van Gieson and PAS method. For electronmicroscopy the specimens were processed according to the usual technique: fixation in a 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer, for 2 hours at 4°C, postfixation in 1% OsO₄ solution in 0.15 M phosphate buffer for 1 hour at 4°C, dehydration, embedding in Epon or Vestopal. The ultrathin sections were examined in a Hitachi HU 11 electron microscope after staining with uranium acetate and lead citrate.

RESULTS

Structural alterations (the samples examined by Dr. Fl. Nereantiu) of the denervation type were marked in one case, moderate in two cases and absent in one case.

Electron microscopy revealed similar alterations in all cases, the lesions being more severe in the case with marked structural changes of the denervation type and with trophic clinical disturbances. An increase in the amount of glycogen with focal accumulations in some areas was observed in all the cases (Fig. 1). The subsarcolemmic or central accumulations were detected both in zones with a relatively well maintained ultrastructure and in those with marked disorganization. Deformity, decolouring or disappearance of the Z bands was very frequent in all cases (Fig. 2).

In the sarcomeres in which the Z bands were absent, disappearance and disorganization of the myofibrils was noted. In the case with marked structural denervation lesions extensive areas of both central (Fig. 3) and subsarcolemmic (Fig. 4) disorganization were found. In addition, severe necrotic lesions, prevalently situated in the subsarcolemma, were also observed in this case (Fig. 5).

In all the cases the number and appearance of mitochondria were normal. The tubules of the sarcoplasmic reticulum were very frequently dilated especially in the zones of ultrastructural disorganization,

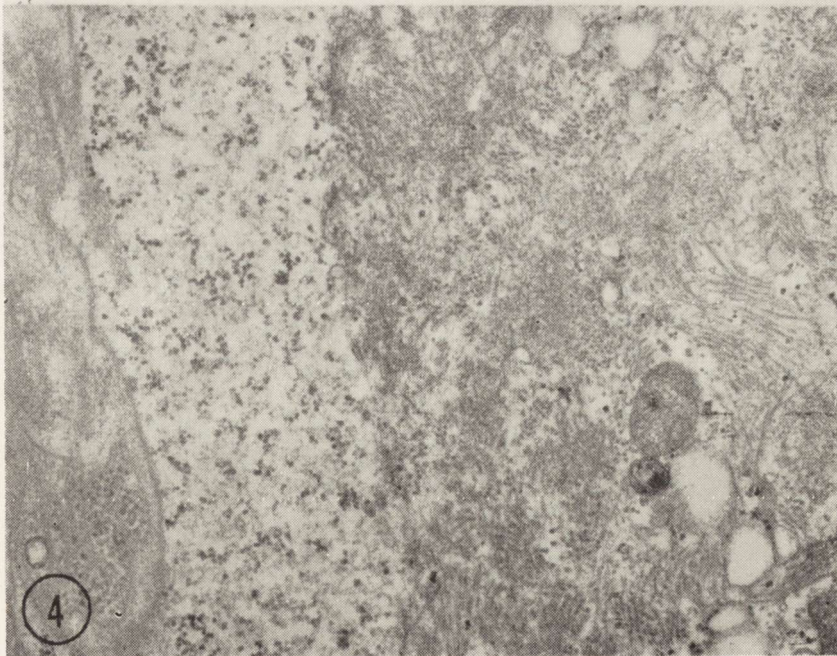
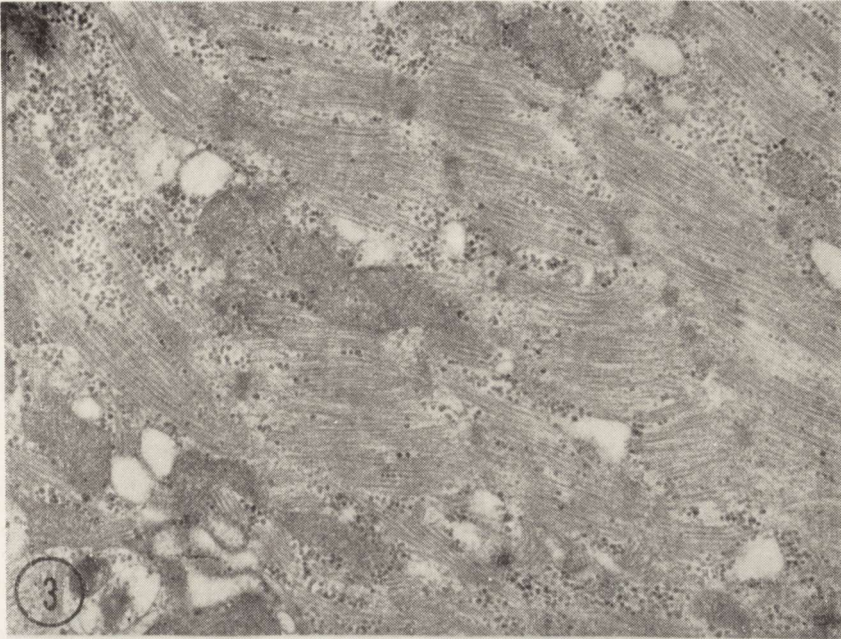
Fig. 3. Severe ultrastructural disorganization in the centre of the muscle fibre, absence of Z bands, marked dilatation of the sarcoplasmic reticulum elements and deposition of glycogen granules. $\times 23,500$.

Ryc. 3. Poważne zaburzenia ultrastruktury w centrum włókna mięśniowego. Brak pasm Z, zaznaczone poszerzenie elementów siatki sarkoplazmatycznej i odkładanie się ziaren glikogenu. Pow. 23.500 \times .

Fig. 4. Area of ultrastructural disorganization in the vicinity of the sarcolemma. Myofilaments oriented in all the spatial planes. $\times 23,500$.

Ryc. 4. Pole o zatartej budowie w pobliżu sarkolemmy. Włókienka mięśniowe ułożone we wszystkich płaszczyznach. Pow. 23.000 \times .

so that it was very difficult to determine which of the sarcoplasmic reticular elements were more affected (the longitudinal tubules or the components of the T system). In the zones with preserved ultrastruc-



ture the dilated sarcotubules were present especially in the vicinity of the Z bands. Somewhat larger but rare fat droplets were detected under the sarcolemma. In a single case a thickening of the capillary basement membrane was encountered.

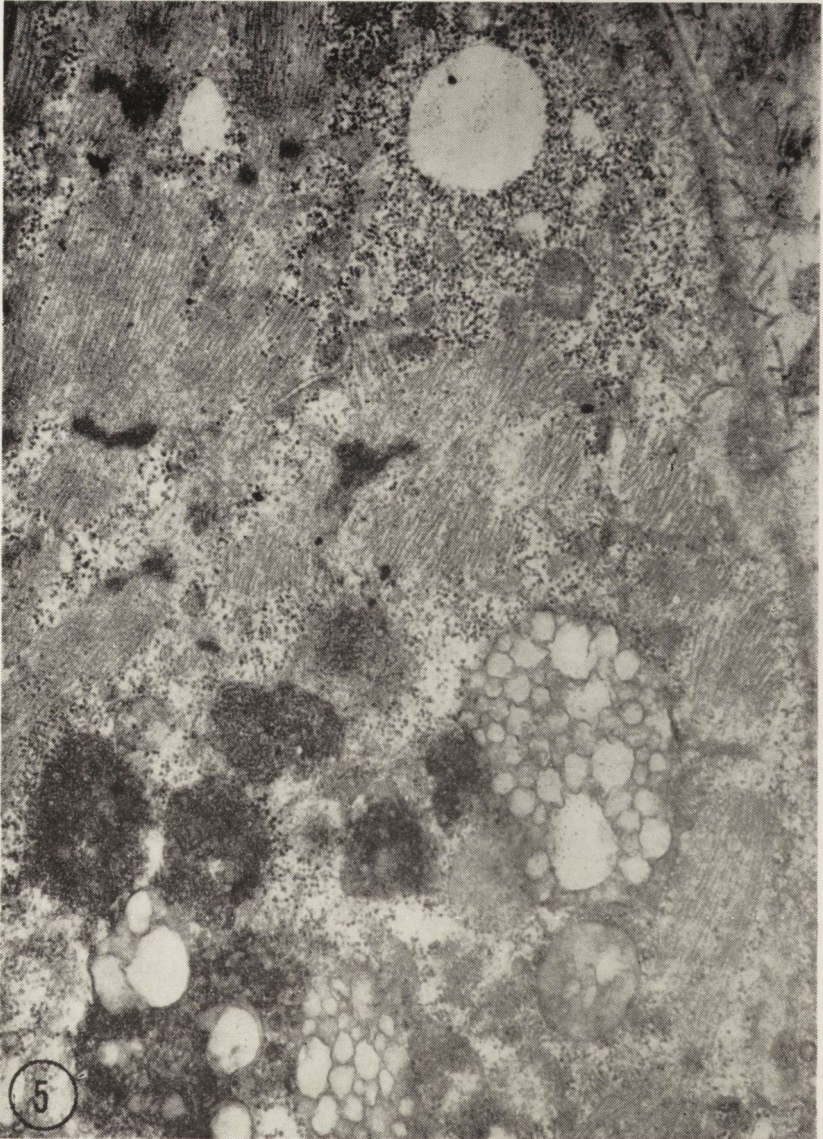


Fig. 5. Severe necrotic lesions in a muscle fibre in the vicinity of the sarcolemma. Alteration of the remaining Z bands, glycogen depositions. $\times 21,000$.

Ryc. 5. Ogniska martwicy we włóknie mięśniowym w pobliżu sarkolemmy. Zmiany w zachowanych pasmach Z, odkładanie glikogenu. Pow. 21.000 \times .

DISCUSSION

The notion of diabetic amyotrophy was already known towards the end of the 19th century, as mentioned by Moureau et al., (1966). Diabetic neuropathy, the amyotrophic form, was described as a separate entity by Garland and Taverner (1953) and by Azerad et al. (1961). Bischoff (1965) considers it to be a „diabetic neuromyopathy” and Gregerson (1969) the mere manifestation of a diabetic neuropathy. Bischoff insisted that the duration of diabetes mellitus should last at least eight years for the development of amyotrophy. However, our cases do not appear to confirm this statement, as in one of our patients neuromuscular affection appeared after five years and in another six months after the diabetes was diagnosed. The diabetes certainly existed prior to the diagnosis but not for very long. Garland and Taverner (1953) postulated the myelopathic origin of diabetic amyotrophy, based upon the clinical features of the disease. In 1960 Garland reconsidered however this hypothesis and tried to explain diabetic amyotrophy as a motor neuropathy or as a primary myopathy depending upon the initial attack of the noxious agent.

The pathogenesis of diabetic amyotrophy caused much controversy since it is very difficult to determine whether the process is myogenic or neurogenic and to what extent diabetic arteriopathy (Fagerberg, 1959; Bauker, Chester, 1973), potassium metabolism disturbances (Azerad et al., 1961) or pyruvic acid utilization disturbances (Thompson et al., 1960), etc. interferes. Muscle biopsy samples examined in the optic microscope gave also variable results: sometimes denervation lesions can be seen, in other instances unspecific alterations (unequal diameter of the muscle fibers, nuclear hyperplasia and hyperchromasia, or fatty degeneration). In neither of the 4 cases investigated did the muscle biopsy consistently show the same picture: the characteristic denervation lesions were absent in one case (known duration of diabetes: 6 months), moderate in 2 cases (duration 10 and 25 years) and severe in the patient with trophic disturbances (duration 5 years).

The few investigations carried out in the electronmicroscope also furnished contradictory data. Hamilton et al. (1968) laid stress on the myofibrillary degeneration aspects, mitochondrial alterations and thickening of the capillary basement membrane. Tomonaga et al. (1973) described two types of lesions: some due to the metabolic disturbances brought about by diabetes (the accumulation of glycogen granules and mitochondria and thickening of the capillary basement membrane) and alteration of the Z bands which may probably be ascribed to the denervation phenomena even in patients in whom a neuropathy could not be diagnosed clinically. In the presented cases which all demonstra-

te clinical phenomena of neuropathy, alteration of the Z bands was to be expected and represented the most frequently encountered lesion, the ultrastructural disorganization probably being attributable to it.

We consider that the severe necrotic lesions observed in the patient with perforating ulcer of the foot express the same trophic disturbances secondary to denervation, since similar lesions may also appear in non-diabetics. The lesions of dysmetabolic origin were less conspicuous in our cases, regardless the duration of the disease. The only finding was a global diffuse increase in the amount of glycogen, deposited in some places in foci, some of which were very marked. It is known that under various conditions the muscle responds by an increase of its glycogen content and we believe that in our cases the large amount of accumulated glycogen cannot be otherwise accounted for.

Myofibrillary degeneration was only encountered in connection with lesions of the Z bands, the mitochondria were normal in all cases and capillary basement membranes observed were normal in 3 of the 4 cases. Also absent in our samples were the ischemic muscular lesions described in the experimental works of Valdivia et al. (1960) and Stenger et al. (1962), ischemia being considered by Bauker et al. (1973) as standing at the origin of diabetic amyotrophy. Cimpeanu et al. (1971) emphasize the importance of malnutrition in diabetics and the association of protein metabolism disturbances in the onset of ultrastructural alterations occurring in diabetic amyotrophy. Our results do not support this opinion.

The subject is of sufficient interest to warrant further investigations on amyotrophy in diabetics in whom no clinical or paraclinical evidence of denervation phenomena can be found.

The observed lesions appear to be due especially to diabetic neuropathy, the large glycogen deposits alone being of direct metabolic origin.

M. Alexianu, M. Macovei-Patrichi, A. Petrovici

ULTRASTRUKTURALNE ZMIANY W MIĘŚNIACH W AMIOTROFII CUKRZYCOWEJ

Streszczenie

Przedmiotem opracowania są badania ultrastruktury mięśni pobranych od 4 pacjentów chorych na cukrzycę, z różnym stopniem amiotrofii oraz klinicznie stwierdzoną neuropatią. Zmiany strukturalne typu denerwacji były wyraźne w jednym przypadku, umiarkowane w dwóch, a w jednym ich nie stwierdzono.

Badania mikroskopowo-elektronowe wykazały ogniskowe zagęszczenia zwiększonej ilości glikogenu, zniekształcenie lub zanikanie pasm Z, a w pierwszym z od-

sanych przypadków dodatkowo pola dezorganizacji sarkomerów i martwicę. Wydaje się, że opisane zmiany są bezpośrednim wynikiem zaburzeń metabolicznych, a wtórnie mogą być następstwem neuropatii cukrzycowej.

М. Алексиану, М. Маковой-Патричи, Ал. Петровичи

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МЫШЦАХ
ПРИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ АМИОТРОФИИ

Резюме

Предметом рассмотрения являются исследования ультраструктуры мышц, взятых от 4 пациентов, больных диабетом с разной степенью амиотрофии, а также клинически установленной невропатией. Структурные изменения типа денервации были четкими в одном случае, умеренными в двух, а в одном случае их не обнаружили.

Электронно-микроскопическое исследование показало увеличение количества гликогена в локальных сгущениях, исчезновение или искажение Z-пластинок, а в первом случае, кроме того, поля дезорганизации саркомеров и омертвление. Представляется, что описанные изменения непосредственно вытекают из нарушений метаболизма, а вторично являются следствием диабетической невропатии.

REFERENCES

1. Azerad E., Boudin G., Pepin B., Lubetsky J.: Sur une forme particulière amyotrophique de neuropathie diabétique. *Presse Médicale*, 1961, 69, 1419—1422.
2. Bauker B. Q., Chester S. C.: Infarction of thigh muscle in the diabetic patient. *Neurology*, 1973, 23, 667—677.
3. Bischoff A.: Die diabetische Neuropathie. *Praxis*, 1965, 54, 723—729.
4. Cîmpeanu L., Cîmpeanu S., Ionescu M. D.: Ultrastructural alterations of the striated muscle cells in diabetes mellitus. *Acta diabet. lat.*, 1971, 8, 680—710.
5. Fagerberg S. E.: Diabetic neuropathy. A clinical and histological study on the significance of vascular affections. *Acta med. scand. (suppl.)*, 1959, 345.
6. Garland H.: Diabetic amyotrophy. *Brit. med. J.*, 1955, 1, 1287—1290.
7. Garland H.: Neurological complications of diabetes mellitus: clinical aspects. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1960, 53, 137—145.
8. Garland H., Taverner D.: Diabetic myelopathy. *Brit. med. J.*, 1953, 1, 1405.
9. Gregersen G.: Diabetic amyotrophy—well defined syndrome? *Acta med. scand.*, 1969, 185, 303—310.
10. Hamilton Jr. C. R., Dobson H. L., Marshall J.: Diabetic amyotrophy: clinical and electromicroscopic studies in 6 patients. *Amer. J. med. Sci.*, 1968, 256, 81—90.
11. Malene G. L., Stroia L.: Considerations on subclinical amyotrophy. *Rev. Roum. Neurol. Psychiat.*, 1974, 11, 181—185.
12. Moureau P., Serratrice G., Tatossian A.: Les manifestations nerveuses des diabétiques. LXIV-e Session-Grenoble, 12—17 Sept. 1966, 31—42.
13. Stenger R. J., Spiro D., Scully R. E., Shannon J. M.: Ultrastructural and physiologic alterations in ischaemic skeletal muscle. *Amer. J. Path.*, 1962, 40, 1—20.

14. Thompson B., Butterfield W. J. H., Kelsey Fr. Y. J.: Pyruvate metabolism in diabetic neuropathy. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1960, 53, 143—145.
15. Tomonaga M., Tanabe H., Nozawa T., Ogata Y.: Electron microscopic study in the muscle changes in diabetic amyotrophy. *Acta neuropath.*, 1973, 24, 331—339.
16. Vaidivia E. M., Watson M., Das C. M.: Histologic alterations in muscle of guinea pigs during chronic hypoxia. *Arch. Path.*, 1960, 69, 199—206.

Address of dr med. M. Alexianu: Institute of Neurology and Psychiatry, Sos. Berceni 10/12, 75622 Bucharest, Romania.

JOACHIM LEHMANN

ZUR KLINIK UND PATHOLOGIE
DER MYATROPHISCHEN LATERALSKLEROSE

Abteilung für Neuropathologie des Pathologischen Institutes
der Karl-Marx-Universität
Leiter: Prof. Dr sc. med. A. Arendt

Umfangreiche klinische und morphologische Untersuchungen vermochten bisher nicht, die Frage nach Ätiologie und Pathogenese der häufigsten Systematrophie, der myatrophischen Lateralsklerose (MLS), zu beantworten.

Die zahlreichen diskutierten ätiologischen Faktoren haben uns veranlasst, die im Verlaufe von 18 Jahren am Hirnforschungsinstitut und am Pathologischen Institut der Karl-Marx-Universität untersuchten Fälle von MLS zusammenzustellen.

Es handelte sich um 75 Fälle der sporadischen Form. In diesem Material haben wir einen Ausgleich des Geschlechtsverhältnisses durch eine Zunahme weiblicher Patienten in den letzten Jahren feststellen können. Das Verhältnis betrug $M : W = 1,1 : 1$.

Während in den Jahren 1954—1963 noch ein Verhältnis von 1,7:1 vorlag, betrug es in der zweiten Hälfte unseres Beobachtungszeitraumes (1964—1972) 1:1,3. Das durchschnittliche Manifestationsalter lag für beide Geschlechter bei 54,3 Jahren, die durchschnittliche Krankheitsdauer bei 33,2 Monaten. Der Morbiditätsgipfel fand sich zwischen 50 und 65 Jahren (ca. 64% der Fälle). Geschlechtsspezifische Unterschiede in Manifestationsalter und durchschnittlicher Krankheitsdauer waren gering.

In der Vergangenheit fehlte es nicht an Einteilungsversuchen der MLS. Die meisten Autoren bevorzugten eine Unterteilung nach der Initialsymptomatik bzw. dem klinischen Verlauf (Colmant, 1958; Erbslöh u. Mitarb., 1968). Als eine motorische Systematrophie, die beide Glieder der Neuronenkette einbezieht, vereinigt die MLS Symptome der chronischen progressiven spinalen Muskelatrophie, der chronischen progressiven Bulbärparalyse und der spastischen Spinalparalyse. Eine scharfe

Abgrenzung ist weder klinisch noch pathologisch-anatomisch immer möglich. Jede Einteilung muss die fließenden Grenzen in Rechnung stellen. Uns erschien die von Nishigaki (1970) interpretierte Einteilung der französischen Schule (Bonduelle, 1965) sehr zweckmässig, da sie sowohl klinischen als auch pathologisch-anatomischen Aspekten gerecht wird.

Wir unterschieden: 1. Die gewöhnliche Form, bei der die Pyramidenbahndegeneration im Vordergrund steht; 2. Die bulbäre Form mit bevorzugtem Befall der motorischen Hirnnervenkerne und 3. Die pseudo-polyneuritische Form mit vorwiegendem Ausfall motorischer Vorderhornzellen.

Wir erhielten eine Verteilung wie sie Tabelle 1 zeigt. Einen besonders schnellen Verlauf der pseudo-polyneuritischen Form konnten wir — ähnlich anderen Autoren (Friedmann, Freedman, 1950) — nicht bestätigen.

Tabelle 1. Verteilung der MLS-Fälle unter Verwendung der Gruppeneinteilung nach Nishigaki (1970)

Tabela 1. Rozdział przypadków SLA przy zastosowaniu podziału grupowego wg Nishigaki (1970)

		Gewöhnliche Form Postać klasyczna	Bulbäre Form Postać opuszkowa	Pseudopolyneuritische Form Postać pseudowielonerwowa
Häufigkeit (Zahl) Częstość (Liczba)		36	22	17
Geschlecht Płeć	M	20	10	9
	W	16	12	8
Alter bei Krankheitsbeginn (in Jh)	max	72	66	67
	min	20	27	37
Początek choroby (wiek)	durchschnittl. średnio	54.4	53.5	55.6
Krankheitsdauer (in Monaten)	max	180	60	120
	min	3-	12	4
Czas trwania choroby (miesiące)	durchschnittl. średnio	33.1	30.6	36.2

Die Aufteilung unserer Fälle nach der Initialsymptomatik zeigt Tabelle 2. Die Unterschiede in den Literaturangaben zur Verteilung der Verlaufstypen sind Ausdruck der schweren Abgrenzbarkeit. Alle bisherigen Untersuchungen zur Pathogenese der MLS vermochten noch nicht zu klären, von welcher Stelle der Neuronenkette der Prozess seinen Ausgang nimmt. Obwohl es keine strenge Systemelektivität für die motorische Rinde zu geben scheint (Colmant, 1958), ist ein Teil

der Autoren der Meinung, die Krankheit beginne in jedem Falle mit einer Degeneration der motorischen Ganglienzellen in der Hirnrinde (Nishigaki, 1970). In letzter Zeit wurden Untersuchungen mitgeteilt, die an die Möglichkeit eines Immunmechanismus in der Pathogenese der MLS denken lassen (Nemo u. Mitarb., 1974). Im Serum von MLS-Patienten konnte ein komplementabhängiger Faktor nachgewiesen werden, der in kultiviertem Hirngewebe zur Demyelination führt. Untersuchungen der Nieren von MLS-Patienten liessen eine Immunkomplexkrankheit vermuten. Eine zelluläre Immunität in der Pathogenese der MLS wurde nach Lymphozytentransformationstests von anderen Autoren in Frage gestellt (Nemo u. Mitarb., 1974). Interessant sind in diesem Zusammenhang Beschreibungen gemeinsamen Vorkommens von Rheumatoid-Arthritis und MLS sowie die Interpretation der MLS als Manifestationsform einer generalisierten Bindegewebserkrankung (Ghatk u. Mitarb., 1972).

Tabelle 2. Häufigkeit und Krankheitsdauer bei Einteilung nach den Initialsymptomen (63 Fälle)

Tabela 2. Częstość i czas trwania choroby w zależności od rodzaju pierwszych objawów klinicznych (63 przyp.)

Lokalisation der Initialsymptome	Anzahl	%	Durchschnittl. Krankheitsdauer (Monate)
Lokalizacja pierwszych objawów	Liczba		Przeciętny czas choroby (mies.)
Bulbär	15	23,8	36,4
Opuszkowa			
Obere Extremitäten	15	23,8	31,8
Kończyny górne			
Untere Extremitäten.	25	39,7	34,3
Kończyny dolne			
Gemischt	8	12,7	29,9
Mieszana			

Obwohl sich bei der MLS in der Hirnrinde, sowie auch in den motorischen Kerngebieten und im Rückenmark immer wieder Systemüberschreitungen finden, gilt die Krankheit allgemein als typisches Beispiel einer topistischen Erkrankung (Colmant, 1958). Bei der hereditären Form der MLS besteht die Möglichkeit des gemeinsamen Auftretens mit anderen Lokalisationstypen heredodegenerativer Systemerkrankungen, mit der Pickschen Atrophie, der Demenz oder einem Parkinson-Syndrom (Minauf, Jellinger, 1969). Besonders häufig findet sich ein Komplex von MLS, Parkinson-Syndrom und Demenz auf der Marianeninsel Guam (Hirano u. Mitarb., 1973). In unseren Fällen bestanden keine Kombinationen mit anderen Systemerkrankungen.

Im Mittelpunkt der Diskussion um die Ätiologie der MLS steht die Frage nach dem Anteil endogener und exogener Faktoren. Es erscheint nach wie vor fraglich, ob man die MLS auf eine „einzige und einheitliche

che Ursache" zurückführen kann (Colmant, 1958). Die Einteilung in sporadische bzw. klassische, in dominant-erbliche und endemisch-familiäre Formen (Erbslöh u. Mitarb., 1968) räumt die Möglichkeit der Polyätiologie ein. Für die letzteren Formen müssen in erster Linie genetische Kausalfaktoren verantwortlich gemacht werden. Trotzdem konnte z.B. für die endemische Form ein exogenes Moment nicht völlig ausgeschlossen werden (Kurland, 1966).

Da die sporadische die weitaus häufigste Form der MLS darstellt, wurde immer wieder intensiv nach exogenen Faktoren gesucht, die als Ursachen bzw. auslösende oder krankheitsfördernde Momente in Frage kommen könnten.

Ein entscheidender Einfluss war jedoch in keinem Falle zu beweisen. Manche Autoren verwenden für Fälle von MLS, die im Gefolge bestimmter äusserer Einflüsse auftreten, den Begriff der „exogenen“ oder „Pseudo-“ Form der MLS, die sie als Phänokopie der eigentlichen endogenen Systematrophie verstehen (Colmant, 1958).

Die bisher herausgestellten äusseren Faktoren lassen sich im wesentlichen in vier Gruppen einteilen: 1. Infektionen, 2. Intoxikationen, 3. Stoffwechselstörungen und 4. Traumen. Die entzündliche Genese in Form einer Virusinfektion hat bis heute nichts an Aktualität verloren. Sowohl bei sporadischen als auch bei familiären Fällen immer wieder einmal nachgewiesene eosinophile Einschlüsse in motorischen Vorderhornzellen und Ganglienzellen motorischer Hirnnervenkerne liessen daran denken (Lit. bei Hirano, 1973). Diskutiert werden vor allem eine Slow-Virus-Infektion (Brody u. Mitarb., 1965) und ein Zusammenhang mit der Poliomyelitis (Bodechtel, 1948; Konovalov, 1954; Colmant, 1958). Nur bei einer Sicherung der zeitlichen Zusammenhänge sei die poliomyelitische Genese möglich (Colmant, 1958). In unserem Material sind eosinophile Einschlüsse der Ganglienzellen nicht gefunden worden.

Von Zil'ber und Mitarbeitern (1963) durchgeführte Inokulationsversuche mit Rückenmarkshomogenisaten von MLS-Patienten an Affen schienen die infektiöse Natur der MLS zu bestätigen. Die Aussagekraft dieser Versuche wurde von anderen Autoren bezweifelt (Kurland, 1966). Bis heute fehlen überzeugende Experimente zur Übertragung der MLS.

MLS-Fälle nach Intoxikationen, insbesondere nach Mangan-, Quecksilber- und anderen Schwermetallvergiftungen resultieren am ehesten aus einem zufälligen Zusammentreffen. Eindeutige toxikologische Beweise für einen direkten Zusammenhang fehlen (Currier, Haerer, 1968).

Unter den Stoffwechselstörungen, die mit einer MLS im Zusammenhang stehen könnten, finden sich Aminosäure- sowie Kohlenhydrat- und Fettstoffwechselstörungen. Häufig wurden MLS-Fälle nach Man-

gelkrankheiten beschrieben, z.B. nach Magenteilresektionen (Lit. bei Erbslöh u. Mitarb, 1968). Unter unseren Patienten fanden sich ebenfalls drei mit einem Zustand nach Magenteilresektion. Bei sieben weiteren liessen sich Ulcera oder Ulcusnarben in Magen oder Duodenum nachweisen (Tabelle 3). Eine Häufung von Karzinomträgern unter den MLS-Patienten (Erbslöh u. Mitarb., 1968) kann aus unserem Material nicht bestätigt werden.

Tabelle 3. Häufigste Zweiterkrankungen bei 75 Fällen myatrophischer Lateralsklerose
Tabela 3. Najczęstsze choroby towarzyszące w 75 przypadkach stwierdzenia zanikowego bocznego

Zweiterkrankung Choroba towarzysząca	Zahl Liczba
Gastritis chronica	3
Billroth II	3
Cirrhosis hepatis	3
Nephrolithiasis	4
Diabetes mellitus	4
Pyelonephritis chronica	7
Ulcus et cicatrix (ventriculum, duodenum)	7
Endocarditis recurrens et peracta	8
Struma colloidalis	13
Cholelithiasis	14
Morbus hypertonicus	15
Emphysema pulmonum chronica	36

Zusammenhänge zwischen diabetischer Stoffwechsellage und der MLS wurden mehrfach erwogen (Erbslöh u. Mitarb., 1968; Quick, Greer, 1967). Erbslöh und Mitarbeiter (1968) fanden in 16% ihrer Fälle eine pathologische Glukosetoleranz und in 3,6% einen Diabetes mellitus. Unter unseren Patienten fanden sich 5,3% mit einem Diabetes mellitus. Der Prozentsatz pathologischer Glukosetoleranzen in der Durchschnittsbevölkerung muss mit 3 bis 3,5% veranschlagt werden (Schliack, 1974).

Das schwierige Problem eines Traumas als auslösender Faktor der MLS wurde in der Literatur eingehend diskutiert (Lit. bei Colmant, 1958). Weder periphere Verletzungen noch adäquate Traumen am Rückenmark sollen als ursächliche, auslösende oder krankheitsfördernde Faktoren eine Bedeutung haben (Colmant, 1958). In unserem Material fand sich einmal ein adäquates Trauma der Wirbelsäule (Sturz aus 2 m Höhe auf das Gesäss) mit anschliessendem Beginn der Initialsymptomatik. Einmal traten die Initialsymptome unmittelbar nach einem peripheren Trauma auf. In sechs weiteren Fällen (3 Schädeltraumen, 3 periphere Traumen) war eine Latenzzeit zwischen sechs und 41 Jahren verstrichen, ehe die ersten Symptome der MLS festzustellen waren. Somit lässt sich auch

aus unserem Material in keinem Falle eine traumatische Entstehung der MLS behaupten.

Mit dieser Auswertung einer Reihe von MLS-Fällen sollten die Problematik ihrer Einteilung und die Schwierigkeiten bei der Suche nach kausalen Faktoren aufgezeigt werden. Wir sind überzeugt, dass weitere sorgfältige katamnestiche Erhebungen im Zusammenhang mit eingehenden morphologischen Untersuchungen zur Aufklärung der Ätiopathogenese der MLS beitragen können.

J. Lehmann

O KLINICE I PATOLOGII STWARDNIENIA ZANIKOWEGO BOCZNEGO

Streszczenie

Przeprowadzono ocenę 75 przypadków stwardnienia zanikowego bocznego zgromadzonych w ciągu 18 lat. Przy wyrównanym stosunku pacjentów obojga płci przeciętny wiek w chwili wystąpienia objawów wynosił 54,3 lata, a przeciętny okres trwania choroby — 33,2 miesiąca. Przypadki kwalifikowano z jednej strony na podstawie zwykłych objawów opuszkowych i pseudo-wielonerwowych, a z drugiej strony na podstawie objawów początkowych.

Przypadki o potwierdzonych sekcyjnie chorobach dodatkowych i ze szczególnymi osobliwościami anamnestycznymi porównano z czynnikami przyczynowymi omawianymi w piśmiennictwie.

И. Леман

O КЛИНИКЕ И ПАТОЛОГИИ БОКОВОГО АМИОТРОФИЧЕСКОГО СКЛЕРОЗА

Резюме

Проведена оценка 75 случаев бокового амиотрофического склероза, собранных в течение 18 лет. При выровненном отношении пациентов обоого пола средний возраст в момент появления симптомов был 54,3 года, а средний период продолжительности болезни — 33,2 месяца. Случаи квалифицировали с одной стороны на основании обычных бульбарных и псевдополинервных симптомов, а с другой стороны — на основании начальных симптомов.

Случаи с подтвержденными секцией дополнительными болезнями и с детальными анамнестическими особенностями сравнивали с причинными факторами, обсуждаемыми в литературе.

LITERATUR

1. Bodechtel, G.: Die nuclearen Atrophien — ein postpoliomyelitisches Krankheitsbild?. Dtsch. Z. Nervenheilk., 1948, 158, 439—448.
2. Bonduelle M.: La sclérose latérale amyotrophique. Rev. prat., 1965, 15, 3911—3924.
3. Brody J. A., Hadlow W. J., Hotchin J., Johnson R. T., Koprowski H., Kurland L. T.: Soviet search for viruses that cause chronic neurologic diseases in the U.S.S.R. Science, 1965, 147, 1114—1116.

4. Colmant H. J.: Die amyotrophische Lateralsklerose. In: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Eds. Henke, Lubarsch, Rösle. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1958, Bd. 13/2/B, 2624—2692.
5. Currier R. D., Haerer A. F.: Amyotrophic lateral sclerosis and metallic toxins. *Arch. environm. Hlth.*, 1968, 17, 712—719.
6. Erbslöh F., Kunze K., Recke B., Abel M.: Die myatrophische Lateralsklerose. Klinische, elektromyographische und bioptisch-histologische Untersuchungen an 112 Kranken. *Dtsch. med. Wschr.*, 1968, 93, 1131—1141.
7. Friedmann A. P., Freedman D.: Amyotrophic lateral sclerosis. *J. nerv. ment. Dis.*, 1950, 111, 1—18.
8. Ghatak N. R., Hirano A., Zimmerman H. M.: Rheumatoid arthritis with arteritis and neuropathy masking amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurol. (Japan)*, 1972, 12, 401—410.
9. Hirano A.: Progress in pathology of motor neuron diseases. *Progr. Neuropathol.*, 1973, 2, 181—215.
10. Hirano A., Malamud N., Elizan T. S., Kurland L. T.: Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia-complex on Guam. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1966, 15, 35—51.
11. Kononov N. V.: Zur Ätiologie der amyotrophischen Lateralsklerose. *Zbl. ges. Neurol. Psychiat.*, 1954, 127, 145.
12. Kurland L. T.: Amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal. *NINDB Monograph No 2. Slow, latent and temperate virus infections* 1966, 13—22.
13. Minauf M., Jellinger K.: Kombination von amyotrophischer Lateralsklerose mit Pickscher Krankheit. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1969, 212, 279—288.
14. Nemo G. J., Brody J. A., Cruz M.: Lymphocyte transformation study of Guamanian patients with amyotrophic lateral sclerosis and parkinson-dementia. *Neurology (Minneapolis)*, 1974, 24, 579—581.
15. Nishigaki S.: Zur Klinik und Pathologie verschiedener Formen der myatrophischen Lateralsklerose. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1970, 213, 121—138.
16. Quick O. T., Greer M.: Pancreatic dysfunction in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology (Minneapolis)*, 1967, 17, 112—116.
17. Schliack V.: Persönliche Mitteilung, 1974.
18. Zil'ber L. A., Bajdakova Z. L., Gardasjan A. N., Kononov N. V., Bunina T. L., Barabadze E. M.: Study of the etiology of amyotrophic lateral sclerosis. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1963, 29, 449—456.

Anschrift des Autors: Pathologisches Institut der Karl Marx-Universität Leipzig, DDR-701 Leipzig, Liebigstr. 26.

JOLANTA BOROWSKA-LEHMAN, WALENTY NYKA

PRZEWLEKŁA BIAŁACZKA SZPIKOWA O OBRAZIE KLINICZNO-MORFOLOGICZNYM POLYGANGLIORADICULONEURITIS

Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Patologii, AM Gdańsk

Kierownik: doc. dr med. E. Boj

Klinika Neurologii Dorosłych Instytutu Chorób Układu Nerwowego
i Narządów Zmysłów AM Gdańsk

Kierownik: doc. dr med. S. Banach

W ostatnich latach obserwuje się ze wzrastającą częstością powikłania w obrębie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) w przebiegu białaczek, głównie u dzieci. Zjawisko to łączy się z wydłużeniem życia chorych w związku ze stosowaniem nowoczesnej, intensywnej chemioterapii (Evans i wsp., 1970; Holland, 1970; West i wsp., 1972).

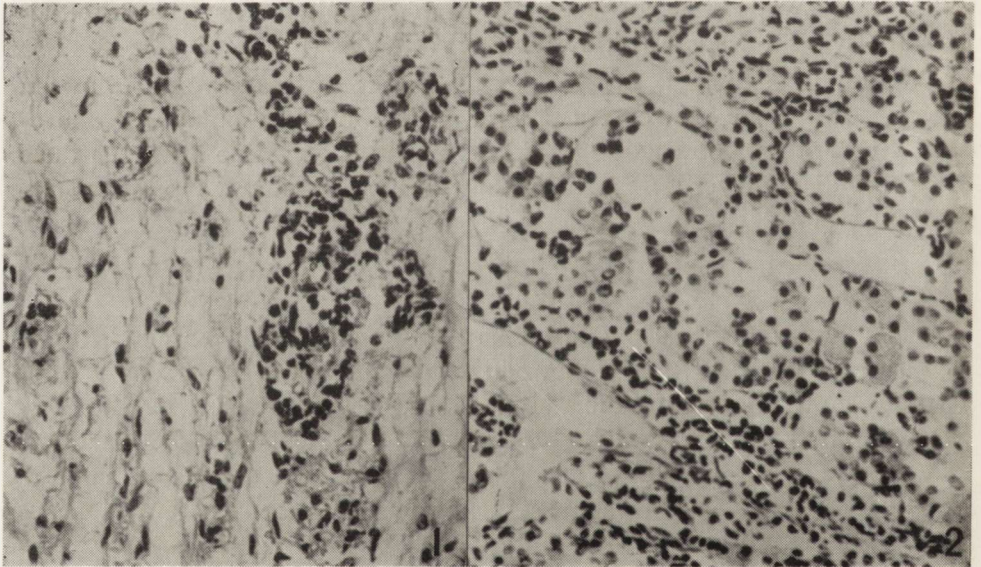
Kilkuletnia remisja w przebiegu białaczki cechująca się prawidłowym obrazem krwi obwodowej i szpiku, współistniejąca z objawami chorobowymi ze strony obwodowego układu nerwowego, może stwarzać duże trudności diagnostyczne. Przedstawiony przypadek stanowi przykład tego typu trudności.

OPIS PRZYPADKU

Chory Z. J. (N.H.Ch.9782/73) lat 20 został przyjęty do Kliniki Neurologicznej w lipcu 1972 r. z powodu osłabienia lewej kończyny dolnej i trudności w chodzeniu. Pierwsze dolegliwości — gwałtowny ból łydki — pojawiły się w maju tego roku po przebiegnięciu 500 metrów. Z wywiadu wiadomo, że w grudniu 1969 r. u pacjenta rozpoznano w Instytucie Hematologii w Warszawie ostrą białaczką szpikową i przeprowadzono 2-miesięczną kurację 6-merkaptopuryną oraz L-asparaginazą, po której obraz krwi i szpiku wrócił do normy.

Badaniem neurologicznym stwierdzono zaniki mięśniowe lewego uda, opadanie stóp, obniżenie siły i napięcia mięśniowego, zniesienie odruchów kolanowych, skokowych i podeszwowych. Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego wykazało: białko 1,32 mg%, cytoza 1492, próba Quackenstedta patologiczna. Ponieważ nie stwierdzono zmian we krwi

i szpiku, hematolodzy wyrazili opinię, że obraz obserwowany przed 2,5 laty przemawia raczej za odczynem białaczkowym u pacjenta mającego uprzednio kontakt z substancjami toksycznymi. Wobec powyższego rozpoznano zapalenie rdzenia i opon o etiologii alergicznej bądź wirusowej. Po 2-tygodniowej kortykoterapii dexametazonem stan chorego powrócił do normy na okres 2 miesiące. W następnym nawrocie nasiliły się uprzednio obserwowane objawy chorobowe. Chód pacjenta miał charakter rotacyjny z wybitnym zaangażowaniem mięśni grzbietu, z nadmierną lordozą. Badanie cytologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego ujawniło liczne komórki limfocytopodobne, z wyraźną anizocytozą. Pomimo leczenia enkortonem stan chorego szybko się pogarszał. Zaobserwowano dalsze upośledzenie ruchów. Niesprawność kończyn górnych uniemożliwiała wykonywanie nawet prostych czynności. Ponadto dołączyły się silne bóle okolicy lędźwiowo-krzyżowej. Badanie krwi obwodowej i szpiku oraz biopsja węzła chłonnego, nie wykazały odchylenia od stanu prawidłowego. Wobec braku poprawy po ponownej kuracji sterydowej, zdecydowano się na rtg-terapię. Chory otrzymał 2000 r na czaszkę i kręgosłup oraz dokanałowo 17 iniekcji methotrexatu, po których remisja utrzymywała się około 6 miesięcy. Po raz trzeci chory zo-



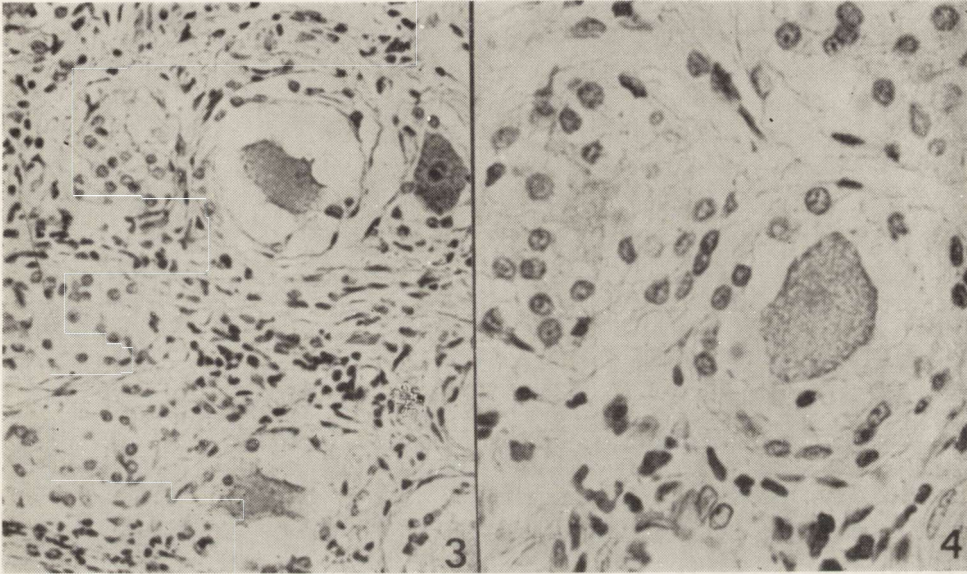
Ryc. 1. Przysadka mózgowa, część nerwowa. Nacieki mieloblastyczne wokół naczyń włosowatych. H—E. Pow. 320 \times .

Fig. 1. Neurohypophysis. Myeloblastic infiltrations around the capillaries. H—E. \times 320.

Ryc. 2. Przysadka mózgowa, część gruczołowa. Obfite nacieki białaczkowe. H—E. Pow. 320 \times .

Fig. 2. Adenohypophysis. Abundant leukaemic infiltrations. H—E. \times 320.

stał przyjęty do Kliniki Neurologicznej w październiku 1973 r. w stanie ciężkim, leżący, z dużymi zanikami mięśniowymi, niedoczulicą korzonkową podudzi, bólami pojawiającymi się przy każdym ruchu, z podwyższoną ciepłotą ciała. We krwi obwodowej stwierdzono agranulocytozę z trombocytopenią. Chory zmarł nagle po epizodzie bólu głowy, z objawami ostro rozwijającego się niedowładu połowiczego po 4 latach od momentu wystąpienia pierwszych objawów choroby, a 1,5 roku od pojawienia się objawów neurologicznych.



Ryc. 3. Zwój międzykręgowy. Zanikające komórki zwojowe, przerost i rozplem amficytów, nacieki białaczkowe. H—E. Pow. 320 \times .

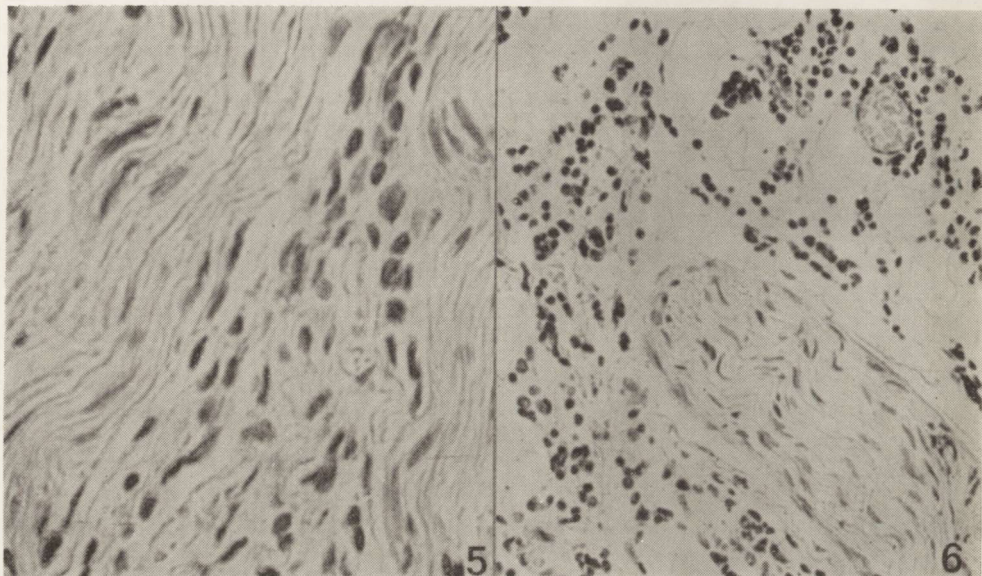
Fig. 3. Intervertebral ganglion. Atrophic ganglion cells, hypertrophy and proliferation of amphicytes, leukaemic infiltrations. H—E. \times 320.

Ryc. 4. Zwój międzykręgowy. Rozplem amficytów wokół komórki zwojowej, obok guzek zejściowy. H—E. Pow. 480 \times .

Fig. 4. Intervertebral ganglion. Proliferation of amphicytes around the neuron. Nearby visible an inveterate nodule. H—E. \times 480.

Badanie pośmiertne wykazało: wczesne ognisko krwiotoczne o średnicy około 4 cm w okolicy ciemieniowo-skroniowej lewej, niszczące wyściółkę rogu tylnego komory bocznej oraz następowe krwiogłowie. Rdzeń kręgowy, opony, korzonki nerwowe i zwoje międzykręgowy były niezmiennione. Ponadto stwierdzono znaczne powiększenie wątroby (2600 g) i śledziony (730 g). Mikroskopowo w wycinkach z wątroby, śledziony, węzła limfatycznego i nerek stwierdzono metaplastę szpikową układu mieloblastycznego. W szpiku kostnym była widoczna przewaga mieloblastów.

Skrawki z mózgu barwiono hematoksyliną-eozyną oraz metodą Nissla, van Gieson i Spielmeyera. W wycinkach z obwodu ogniska krwotocznego stwierdzono liczne kuliste wylewy krwawe oraz cechy obrzęku, a w drobnych naczyniach żylnych i włosowatych pojedyncze zakrzepy białaczkowe. W ścianach naczyń obserwowano pojedyncze lub kilkurzędowe mankiety z komórek układu mieloblastycznego. W oponach twardej i miękkich okolicy przysadki mózgowej i rdzenia kręgowego nacieki białaczkowe były widoczne w przydanie naczyń oraz pozanaczyniowo.



Ryc. 5. Nacieki białaczkowe w korzeniu nerwowym. H—E. Pow. 480 \times .

Fig. 5. Leukaemic infiltration in nervous root. H—E. \times 480.

Ryc. 6. Włókno nerwu obwodowego otoczone obfitymi naciekami mieloblastycznymi. H—E. Pow. 320 \times .

Fig. 6. Peripheral nerve fibre surrounded by abundant myeloblastic infiltrations. H—E. \times 320.

Podobne nacieki stwierdzano wokół naczyń w części nerwowej, pośredniej i gruczołowej przysadki (ryc. 1, 2.) W zwojach międzykręgowych odcinka lędźwiowego ujawniono bardzo znaczne ubytki komórek zwojowych, a zachowane komórki miały cechy zaniku i zawierały brunatny barwnik, a miejscami skąpą ilość tigroidu. W miejscu zanikłych komórek zwojowych widoczny był przerost i rozplem amficytów, guzki zejściowe oraz rozplem elementów tkanki łącznej, wśród których widoczne były mieloblasty występujące pojedynczo lub w skupieniach (ryc. 3, 4). W korzeniach nerwowych obserwowano nacieki białaczkowe i ogniskową demielinizację włókien nerwowych (ryc. 5), a w rdzeniu kręgowym

stwierdzano ubytki i zwyrodnienie neuronów. Wokół włókien nerwów obwodowych i w tkance tłuszczowej były widoczne bardzo gęste nacieki białaczkowe (ryc. 6).

OMÓWIENIE

Nacieki białaczkowe w zwojach międzykręgowych, korzeniach nerwowych i nerwach obwodowych należą do powikłań białaczek najrzadziej spostrzeganych i najtrudniejszych do oceny klinicznej (Alajouanine i wsp., 1949, Dickenman i wsp., 1958, Czarnecki i wsp., 1963). Obserwowane przez nas zmiany w obwodowym układzie nerwowym, głównie zaś w zwojach międzykręgowych świadczą o długotrwałym procesie chorobowym. Zwraca uwagę brak, obserwowanej z reguły w przebiegu zmian białaczkowych w OUN, równoległości pomiędzy ciężkimi objawami neurologicznymi a obrazem krwi obwodowej i szpiku, które z wyjątkiem końcowej fazy chorobowej, nie wykazują odchyień od stanu prawidłowego. Zmiany białaczkowe w OUN rozwijają się zwykle równoległe z narastającą leukocytozą i trombocytopenią i stosunkowo szybko prowadzą do zgonu (Moore i wsp., 1960; West i wsp., 1972).

Pochodzenie nacieków białaczkowych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym, przy okresowym braku zmian hematologicznych jest niejasne. Nie przyjęła się koncepcja Litteral'a i wsp. (1955), zakładająca, że nacieki białaczkowe są pochodzenia miejscowego, oparta o założenia embriogenetyczne, zgodnie z którymi splot naczyniówkowy i opony jako twory pochodzenia mezenchymalnego, mają potencjalną zdolność do hemopoezy. Cytogenetyczne badania przeprowadzone przez Mastrangelo i wsp. (1970) wykazały jednakową chromosomalną budowę populacji komórek białaczkowych, pochodzących z płynu mózgowo-rdzeniowego i ze szpiku tego samego chorego, utrzymującą się przy nawrotach choroby. Fakt ten przemawia za przerzutowym charakterem zmian w OUN, a zajęcie układu nerwowego byłoby więc wtórne w stosunku do ogniska zlokalizowanego poza tkanką nerwową i mózg byłby kolonizowany przez komórki białaczkowe.

W OUN nie ma naczyń limfatycznych, a więc inwazja komórek białaczkowych może odbywać się jedynie drogą krwi. Przy trombocytopenii, drobne wybroczyny torują komórkom białaczkowym drogę w głąb tkanki mózgowej. Z drugiej strony istnienie bariery krew—mózg dla leków utrudnia lub uniemożliwia przejście leków do tkanki nerwowej i chroni komórki białaczkowe przed zniszczeniem (West i wsp., 1972). Komórki te mogą zachować zdolność do rozplemu w okresie remisji i mogą stanowić źródło ponownego wysiewu komórek białaczkowych.

И. Боровска-Лехман, В. Ныка

ХРОНИЧЕСКАЯ КОСТНОМОЗГОВАЯ ЛЕЙКЕМИЯ
С КЛИНИКО-МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТИНОЙ
POLYGANGLIORADICULONEURITIS

Резюме

Авторы приводят случай 22-летнего больного, у которого через 2,5 года после вылеченной острой костномозговой лейкемии, при полной гематологической ремиссии, появились неврологические изменения в виде исчезновения рефлексов, ослабления и мышечной атрофии в левой нижней конечности. После проведения курса лечения стероидами неврологические симптомы исчезли, что позволило предположить, что больной прежде контактировал с токсичными веществами. Больной умер через 4 года после появления первых симптомов болезни, в период рецидива изменений, проявившихся в виде прогрессирующего паралича нижних конечностей, дефективности движений верхних конечностей, которым сопутствовали иррадиирующие боли. Посмертное исследование выявило в паренхиматозных органах и в костном мозге морфологические картины, характерные для хронической костномозговой лейкемии, а в области межпозвоночных ганглиев, в нервных корешках, периферических нервах, гипофизе, в оболочках спинного и головного мозга, а также в мозговой ткани — инфильтраты из миелобластов.

Авторы обсуждают трудности в диагностике, а также нетипичный клинико-морфологический ход лейкемии, протекающей в форме polyganglioradiculoneuritis.

J. Borowska-Lehman, W. Nyka

CHRONIC MYELOBLASTIC LEUKAEMIA WITH A CLINICAL
AND MORPHOLOGICAL APPEARANCE
OF POLYGANGLIORADICULONEURITIS

Summary

The authors present a case of 22 years old patient who two and a half years ago after acute myelogenic leukaemia during complete hematologic remission developed neurological symptoms in the form of abolished reflexes, weakening and muscular atrophy in the left lower extremity. Following steroid therapy neurological changes regressed suggesting a previous leukaemic changes due to the patient's contact with toxic substances before the onset of the illness. The patient died four years after the first symptoms during the recurrence of neurological signs manifested by progressing paraparesis of lower extremities and impairment of the movements of the upper extremities accompanied by radiating pain. Post-mortem examination revealed in the parenchymal organs and in the bone marrow morphological changes characteristic for chronic myelogenic leukaemia. Myeloblastic infiltrations were found in spinal ganglia, spinal roots, peripheral nerves, hypophysis, in the meninges of the spinal cord and brain and in the cerebral tissue.

The authors discuss diagnostic difficulties and atypical clinical and morphological course of leukaemia under the form of polyganglioradiculoneuritis.

PIŚMIENNICTWO

1. Alajouanine T., Thurel R., Castaigne P., Lhermitte F.: Leucémie aiguë avec syndrome polynevritique et infiltration leucosique des nerfs. *Rev. Neurol.*, 1949, 81, 249—261.
2. Czarnecki J., Niezabitowski A.: Nacieki białaczkowe w ośrodkowym układzie nerwowym w przebiegu ostrej białaczki szpikowej. *Pol. Tyg. Lek.*, 1963, 50, 1892—1894.
3. Dickenman R. C., Chason J. L.: Alterationes in the dorsal root ganglia and adjacent nerves in the leukemias, the lymphomas and multiple myeloma. *Amer. J. Path.*, 1958, 34, 349—361.
4. Evans A. E., Gilbert E. S., Zandstra H.: The increasing incidence of central nervous system leukemia in children. *Cancer* 1970, 20, 404—409.
5. Holland J. F.: Hopes for tomorrow v.s. realities of today therapy and prognosis in acute lymphocytic leukemia of childhood. *Pediatrics* 1970, 45, 191—193.
6. Litteral E. B., Malamud N.: Leukemia with predominant neurologic manifestations. *Neurology* 1955, 5, 740—744.
7. Mastrangelo R., Zuelzer W. W., Ecklund P. S., Thompson R. J.: Chromosomes in the spinal fluid. Evidence for metastatic origin of meningeal leukemia. *Blood* 1970, 35, 227—235.
8. Moore E. W., Thomas L. B., Shaw R. K., Freireich E. J.: The central nervous system in acute leukemia. *Arch. Int. Med.*, 1960, 105, 451—468.
9. West R. J., Graham-Pole J., Hardisty R. M., Pike M. C.: Factor in pathogenesis of central nervous system leukemia. *Brit. Med. J.*, 1972, 5, 311—314.

Adres autorów: Instytut Patologii, Zakład Anatomii Patologicznej Akademii Medycznej, 80-211 Gdańsk, ul. Dębinki 7.

MIROSLAW B. KOZIK, KAZIMIERZ WOJCIECHOWSKI
JADWIGA WIGOWSKA-SOWIŃSKA

PRZEPUKLINA OPONOWA O NIEZWYKŁYCH ROZMIARACH

Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego
i Narządów Zmysłów AM w Poznaniu
Kierownik: doc. dr hab. med. M. B. Kozik
Oddział Chirurgii Dziecięcej Wojewódzkiego Szpitala Dziecięcego
im. J. Krysiewicza w Poznaniu
Ordynator: doc. dr med. K. Wojciechowski

Wśród wrodzonych wad ośrodkowego układu nerwowego, niemałą grupę stanowią przepukliny oponowe mózgu (meningocele) lub oponowo-mózgowe (meningo-encephalocele) połączone z rozszczepem czaszki. Charakterystyczną cechą tych nieprawidłowości jest duże zróżnicowanie poszczególnych przypadków. Dlatego pomimo obszernego piśmiennictwa (Jacob, 1939; Ostertag, 1956; Nowicki i wsp., 1970; Windle, 1970) dotyczącego zaburzeń rozwojowych mózgu pojawiają się nadal opisy kazuistyczne wrodzonych wad układu nerwowego (Engel, Buchan, 1974; Field, Kerr, 1974; Wackenheim i wsp., 1974).

W tej sytuacji wydawało nam się celowe przedstawienie przypadku przepukliny oponowej o niezwykłych rozmiarach, uszypułowanej w okolicy potylicznej i połączonej z innymi zaburzeniami rozwojowymi mózgu.

OPIS PRZYPADKU

Noworodek z drugiej ciąży, urodzony siłami natury, o ciężarze 2900 g. Po urodzeniu dziecka stwierdzono dużą przepuklinę oponową uszypułowaną w okolicy potylicznej czaszki (ryc. 1).

Wymiar podłużny przepukliny wynosił 20 cm, poprzeczny 14 cm. Podczas badania dotykiem stwierdzono miękką i chęłboczącą zawartość worka przepuklinowego, który po lekkim ucisku zmniejszał swoje rozmiary. W pierwszych czterech dniach u noworodka występowały kilkanaście razy dziennie uogólnione drgawki toniczno-kloniczne połączone z prężeniem i prostowaniem wszystkich kończyn oraz z okresami bezdechu i sinicy. W następnych dniach stan dziecka pogarszał się, poja-

wiła się sinica całego ciała, tętno słabo napięte i przyspieszone do 160/min, drogi oddechowe ulegały zaśluzowaniu. Po intensywnych zabiegach reanimacyjnych uzyskano lekką poprawę stanu ogólnego i przystąpiono w 7 dobie życia do operacyjnego usunięcia worka przepuklinowego. Zgon noworodka nastąpił w osiem godzin po zabiegu chirurgicznym.



Ryc. 1. Olbrzymia przepuklina oponowa uszypułowana w okolicy potylicznej.

Fig. 1. Giant pedunculated meningocele in occipital area.

Sekcja mózgu wykonana bezpośrednio po zgonie wykazała symetryczne, bardzo małe półkule, dość szerokie zakręty i płytkie rowki, mały most i rdzeń przedłużony oraz brak widocznego makroskopowo mózdzku. Na przekrojach czołowych przez półkule stwierdzono brak spoidła wielkiego i sklepienia, bardzo małe zwoje podstawy i poszerzony układ komorowy (ryc. 2). Komorę IV pokrywała warstwa nieupostaciowanej tkanki szarawej barwy. Na przekrojach czołowych mostu w części brzusznej włókna poprzeczne były niewidoczne, a na przekrojach rdzenia przedłużonego brak było charakterystycznego rysunku jąder oliwy.

Worek przepuklinowy od wewnątrz pokryty wyściółką oponową a po stronie zewnętrznej skórą. Zawartość worka oponowego stanowił płyn

przejrzysty, żółtawej barwy, nie zawierający jakichkolwiek fragmentów tkankowych.

Rozpoznanie sekcyjne: *Malformationes congenitae cerebri multiplices cum meningocele regionis occipitalis.*

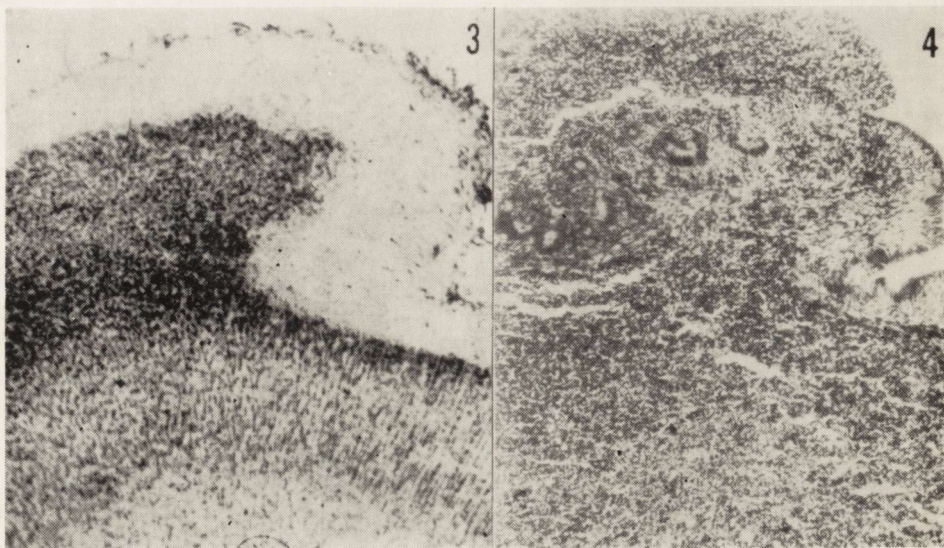


Ryc. 2. Przekrój czołowy przez półkule. Brak spoidła wielkiego i sklepienia oraz poszerzenie układu komorowego.

Fig. 2. Frontal section of hemispheres. Lack of corpus callosum and fornix, dilation of ventricular system.

Badanie mikroskopowe: W obrębie kory mózgowej zwraca uwagę nieprawidłowa i zmienna architektonika poszczególnych zakrętów. W niektórych zawojach lub ich częściach kora mózgu składa się z 3 warstw: szerokiej warstwy drobinowej, pod nią cienkiej warstwy gęsto ułożonych komórek kształtu kulistego (warstwa ziarnista zewnętrzna), a niżej szerokiego pasma o luźniejszym utkaniu, składającego się z komórek owalnych i kulistych. W tym typie budowy kory komórki zazwyczaj posiadają dość duże, ubogochromatynowe jądro otoczone wąską obwódką cytoplazmatyczną pozbawioną wyraźnych ziarnistości Nissla. W innych okolicach kora składa się z jednej szerokiej warstwy nieróżnicowanych komórek kulistego kształtu. Miejscami natomiast obserwuje się korę czterowarstwową (ryc. 3) zbudowaną z warstwy drobinowej, ziarnistej, piramidowej i mało zróżnicowanych komórek kształtu kulistego lub owalnego. Spotykano również odcinki kory mózgu o budowie sześciowarstwowej, jednak z wyraźnie zmniejszoną liczbą komórek piramidowych. Na uwagę zasługuje dość dobry stopień dojrzałości neurocytów kory amodalnej oraz komórek nerwowych prążkowania, gałki bladej i wzgórza wzrokowego. Neurocyty zwojów podstawy wykazują jednak dość znaczne przprzedzenie.

W istocie białej półkul można zaobserwować rozsiane pojedynczo komórki nerwowe, a niekiedy nawet ich małe skupienia. Nie udaje się natomiast w istocie białej półkul zaobserwować włókien mielinowych.



Ryc. 3. Płat skroniowy. Kora czterowarstwowa utkana z warstwy drobinowej, ziarnistej, piramidowej i warstwy mało zróżnicowanych, kulistych i owalnych komórek. Nissl. Pow. 25 \times .

Fig. 3. Temporal lobe. Four-layered cortex consisting of molecular, granular, pyramidal cell layers and of the layer formed by low differentiated round or oval cells. Nissl. \times 25.

Ryc. 4. Wyściółka komory bocznej z licznymi zachyłkami i kanałami wnikałymi w szeroką warstwę niezróżnicowanych komórek macierzy. Nissl. Pow. 64 \times .

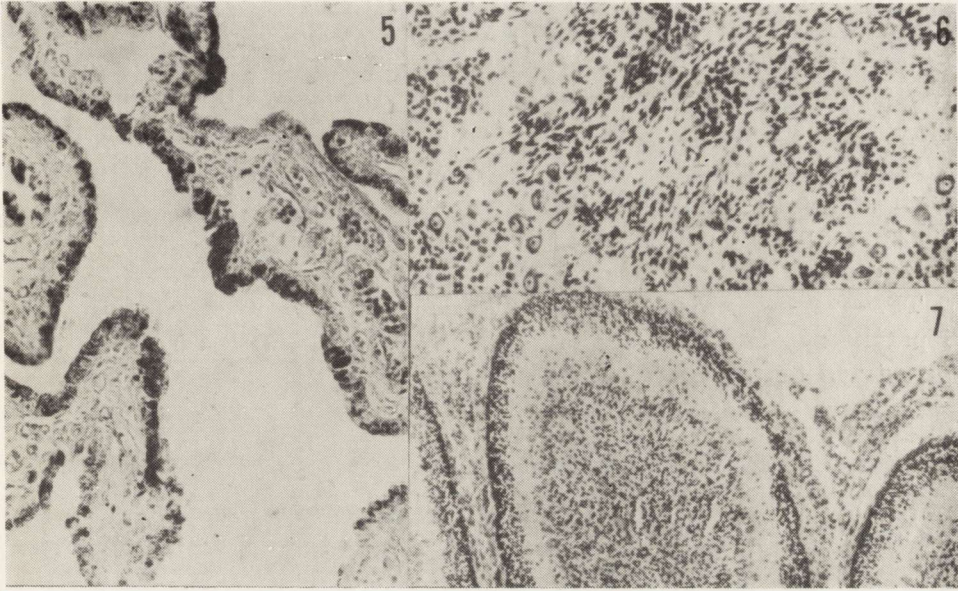
Fig. 4. Ependyma of lateral ventricle forming multiple recesses and channels penetrating into the wide layer of nondifferentiated matrix cells. Nissl. \times 64.

Barwienie czerwienią oleistą O wykazuje dość znaczną liczbę komórek tłuszczonośnych występujących zarówno w istocie białej jak i w wielu mało zróżnicowanych obszarach kory mózgowej. Na przekrojach czołowych przez obie półkule nie stwierdzono spoidła wielkiego, sklepienia i spoidła przedniego.

Duże nieprawidłowości budowy wykazuje wyściółka komór (ryc. 4) wysłana nabłonkiem sześciennym lub wielorzędowym cylindrycznym z migawkami. Warstwa wyściółki tworzy liczne zachyłki i zagłębienia, nieraz nawet w postaci głębokich kanałów. Pod wyściółką komór bocznych występuje szeroka warstwa niezróżnicowanych komórek macierzy z rozsiانymi wśród nich dużymi kulistymi komórkami zawierającymi w cytoplazmie ziarniste złogi barwy brunatnej. W niektórych odcinkach komór bocznych nie udaje się zauważyć nabłonka wyściółki, w innych wyściółka wnika w warstwę niezróżnicowanych komórek macie-

rzy, które znajdują się wówczas zarówno pod wyściółką jak i nad wyściółką (ryc. 4).

W obrębie mostu i rdzenia przedłużonego widać dobrze wykształcone jądra n. V, VI, VII i VIII, natomiast nie udaje się znaleźć jąder n. IX, X, XI i XII. Z pośród jąder oliwy widoczne jest tylko górne.



Ryc. 5. Splot naczyniasty komory IV pokryty nabłonkiem walcowatym zawierającym złogi barwnikowe w cytoplazmie. Kanzler-Arendt. Pow. 150 \times .

Fig. 5. Plexus choroideus of the IVth ventricle covered by cylindrical epithelial cells containing pigment deposits. Kanzler-Arendt. \times 150.

Ryc. 6. Sklepienie komory IV. Konglomerat mało zróżnicowanych komórek ziarnistych z rozrzuconymi wśród nich komórkami Purkinjego. H—E. Pow. 65 \times .

Fig. 6. Vault of the IVth ventricle. Accumulation of low differentiated granular cells with dispersed Purkinje cells. H—E. \times 65.

Ryc. 7. Część grzbietowa sklepienia komory IV. Kilka słabo wykształconych zakrętów kory mózdzku. Pasma embrjonalnych komórek ziarnistych w warstwie drobinowej. H—E. Pow. 50 \times .

Fig. 7. Dorsal part of the vault of the IVth ventricle. Few poorly developed cerebellar cortical gyri. The band of embryonal granular cells in the molecular layer. H—E. \times 50.

W splocie naczyniastym komory IV część komórek nabłonkowych posiada cytoplazmę wypełnioną złoгами brązowego barwnika (ryc. 5).

Sklepienie komory IV zbudowane jest z konglomeratów neuro- i spongioblastów oraz pasm mało zróżnicowanych komórek ziarnistych. W tym nie uporządkowanym skupisku komórkowym znajdują się również nieliczne komórki Purkinjego (ryc. 6).

W grzbietowej części sklepienia IV komory udaje się wyróżnić kilka zaledwie wykształconych zakrętów kory mózdzku, charakteryzujących

się obecnością pasma embrionalnych komórek ziarnistych w zewnętrznej części warstwy drobinowej (ryc. 7). Również warstwa komórek Purkiniego jest słabo rozwinięta.

Przeprowadzone reakcje histoenzymatyczne dla wykazania aktywności fosfataz i esteraz zasługują na oddzielne przedstawienie.

Fosfataza kwaśna — w postaci drobnoziarnistej występuje w cytoplazmie większych neurocytów zarówno kory jak i zwojów podstawy. Stopień aktywności FK w zwojach podstawy jest większy niż w neurocytach kory mózgu. Gdzieś tam udaje się również zaobserwować aktywność enzymu w oligodendrogleju.

Fosfataza zasadowa — wyraźna aktywność jest tylko w ścianach naczyń krwionośnych, jednak dyfuzyjny odczyn można zaobserwować także w neuropilu i czasem w neurocytach górnych warstw kory mózgu.

TPP-aza — bardzo silna aktywność występuje w oligodendrocytach i przynaczyniowych wypustkach astrogleju istoty białej. W korze mózgu odczyn ten obserwuje się tylko w większych komórkach nerwowych.

ATP-aza — odczyn widoczny jest głównie w ścianach naczyń krwionośnych oraz w przynaczyniowych wypustkach astrogleju.

Esteraza nieswoista — występuje głównie w pericytach naczyń krwionośnych. Słaby, drobnoziarnisty odczyn widoczny jest jednak również w większych komórkach nerwowych, szczególnie w obrębie podwzgórza. Komórki glejowe nie wykazują aktywności tego enzymu.

AChE — jedynie w wyściółce komorowej i włóknach glejowych podwyściółkowych jest widoczny słaby dyfuzyjny odczyn. Aktywność AChE nie występuje w neurocytach, komórkach glejowych i naczyniach. Szczególną uwagę zwraca brak aktywności AChE w zwojach podstawy.

OMÓWIENIE

Przedstawiony przypadek dotyczy zarówno wad związanych z nieprawidłowym zamykaniem narządów w linii środkowej jak i wad nie wynikających z zaburzeń w zamykaniu się rynienki nerwowej (Windle, 1970; Field, Kerr, 1974). Z punktu widzenia patogenezy na podkreślenie zasługuje różnoczasowe działanie czynnika uszkodzającego.

Wydaje się, że w naszym przypadku nieznany czynnik uszkodzający spowodował w 2 lub 3 tygodniu rozwoju osobniczego zaburzenia w zamknięciu rynienki nerwowej i doprowadził do powstania przepukliny oponowej w okolicy potylicznej, natomiast brak spoidła wielkiego, sklepienia i spoidła przedniego jest wynikiem czynnika szkodliwego w 7 tygodniu rozwoju płodowego (Ostertag, 1956; Windle, 1970). Zazwyczaj zaburzenia rozwojowe w postaci rozszczepu czaszki i przepu-

klin oponowych lub oponowo-mózgowych, dotyczą również innych struktur ośrodkowego układu nerwowego (Ostertag, 1956; Windle, 1970; Engel, Buchan, 1974).

Niedorozwój mózdzku, brak spoidła wielkiego, ciała modzelowatego itp. nie są zjawiskami rzadkimi (Nowicki i wsp., 1970; Żarski i wsp., 1972; Wackenheim i wsp., 1974). Rzadziej natomiast spotyka się uszkodzenie cytoarchitektury kory mózgu w postaci jej jednowarstwowości lub trójwarstwowości jak również rozległe nieprawidłowości w budowie kory mózdzku (Jacob, 1939; Ostertag, 1956; Wackenheim i wsp., 1974).

Obok zmian morfologicznych występujących w omawianym przypadku, na uwagę zasługują również zaburzenia w aktywności enzymatycznej. Szczególnie zwraca uwagę brak aktywności acetylocholinesterazy w zwojach podstawy. W warunkach prawidłowych aktywność AChE w obrębie tej struktury jest zwykle dość silna i pojawia się już we wczesnych okresach rozwoju ontogenetycznego (Wender i wsp., 1970). Brak aktywności AChE w zwojach podstawy może wskazywać, że obok zaburzeń morfologicznych obserwowanych w mikroskopie świetlnym, występują w tym przypadku również nieprawidłowości ultrastrukturalne w postaci niedorozwoju lub nieprawidłowej budowy synaps. Chociaż to przypuszczenie wymagałoby potwierdzenia w badaniach mikroskopowo-elektronowych, wydaje się celowe zwrócenie uwagi na taką możliwość. Aktywność pozostałych badanych hydrolaz nie wykazuje większych nieprawidłowości.

Obecność znacznej liczby komórek tłuszczonośnych w istocie białej poprzedza zwykle mielinizację dróg nerwowych w mózgu i spotykana jest powszechnie w tym okresie rozwoju osobniczego (Wender i wsp., 1970; Jellinger i wsp., 1971). Zwraca natomiast uwagę trudne do wyjaśnienia występowanie znacznej liczby komórek tłuszczonośnych również w korze mózgu.

Oddzielnej wzmianki wymagają, w naszym przypadku, olbrzymie rozmiary przepukliny oponowej przy porodzie dokonany siłami natury. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono przepuklin oponowych uszypułowanych w okolicy potylicznej o takich rozmiarach (Ostertag, 1956; Nowicki i wsp., 1970; Żarski i wsp., 1972).

М. Б. Козик, К. Войцеховски, Я. Виговска-Совиньска

ГРЫЖА МОЗГОВЫХ ОБОЛОЧЕК НЕОБЫЧНЫХ РАЗМЕРОВ

Резюме

У новорожденного после нормальных родов была описана огромная грыжа, ущемленная в затылочной области. Смерть наступила после операции удаления мешка. Вскрытие мозга обнаружило ряд отклонений в развитии, например, отсутствие мозолистого тела и свода, неправильное строение мозговой коры,

отсутствие мозжечка итд., а микроскопическое исследование показало обширные аномалии в развитии во многих участках мозга. Гистоэнзиматические реакции также выявили нарушения, а частности в виде сильно увеличенной активности ТФФ-азы в олигодендроглии и астроглии, а также в виде отсутствия активности АХЭ в базальных ганглиях.

M. B. Kozik, K. Wojciechowski, J. Wigowska-Sowińska

MENINGOCELE OF EXCEPTIONALLY LARGE SIZE

Summary

Enormous pedunculated meningocele was found in the occipital area of a normally born infant. The newborn passed away few hours after removal of the herniation sack. During autopsy some malformations such as lack of corpus callosum, fornix and cerebellum and abnormal cerebral cortex were noted. Microscopical observations revealed extensive anomalies in many parts of the brain. Histochemical studies demonstrated enzymatic abnormalities such as very strong TPP-ase activity in oligodendroglia and astroglia cells and the lack of AChE activity in basal ganglia.

PIŚMIENICTWO

1. Engel . C., Buchan G. C.: Potentiels évoqués visuels dans deux cas d'encephalocèles occipitales. *Rev. Otoneuroophthalmol.*, 1974, 46, 137—141.
2. Field B., Kerr Ch.: Twenning and neural-tube defects. *Lancet* 1974, 2, 964—965.
3. Jacob H.: Über die Fehlentwicklungen des Kleinhirns, der Brücke und des verlängerten Markes (Arnold-Chiari'sche Entwicklungsstörung) bei kongenitaler Hydrocephalie und Spaltbildung des Rückenmarkes. *Z. Neur.*, 1939, 164, 229—253.
4. Jellinger K., Seitelberger F., Kozik M.: Perivascular accumulation of lipids in the infant human brain. *Acta neuropath. (Berl.)* 1971, 19, 331—342.
5. Nowicki S., Dębicka-Małkowska D., Nowicka C.: Występowanie przepuklin mózgowo-rdzeniowych u dzieci. II Ogólnopolskie Symp. Neurochirurgów. *Augustów*, 1970, s. 44.
6. Ostertag B.: Die Einzelformen der Verbildungen. W.: Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie. Wyd.: W. Scholtz. Springer Veri., Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956, XIII/IV, 363—427.
7. Wackenheim A., Braun J. P., Babin E., Tournade A., Dupuis M., Haller M.: The herniation of the superior cerebellar vermis. *Neuroradiology* 1974, 7, 221—227.
8. Wender M., Kozik M., Wojciechowski T.: Enzymhistochemische Untersuchungen zu Entwicklung der Neuroglia des menschlichen Gehirns. *Acta Histochem* 1970, 36, 32—43.
9. Windle W. F.: Development of neural defects in human embryos of four to seven weeks gestation. *Exp. Neurol.*, 1970, 28, suppl. 44.
10. Żarski S., Dziduszko J., Rycembel Z., Dietrich-Rap Z.: Pomyślny wynik chirurgicznego leczenia zespołu Dandy-Walkera współistniejącego z agenezją mózdzku. *Neur. Neurochir. Pol.*, 1972, 6, 653—656.

Adres autorów: Samodzielna Pracownia Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów Akademii Medycznej, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań.

T R E Ś C

B. Zgorzalewicz, V. Neuhoff, T. V. Waehneltd: Skład białkowy mieliny obwodowej w rozwoju ontogenetycznym szczura	1
Z. Adamczewska: Lipidy mieliny w rozwijającym się mózgu szczura	11
J. Szczech: Mielinizacja układu limbicznego w rozwoju ontogenetycznym szczura	25
H. Hager, R. Metz: Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym regeneracji włókien mielinowych w autologicznych i homologicznych przeszczepach nerwowych	37
D. Maślińska, E. Thomas: Badania histochemiczne rozpadu mieliny w koagulowanym nerwie kulszowym	45
M. J. Mossakowski: Morfologia i histochemia uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli tkankowej	53
Z. Kraśnicka, A. Przybylski: Poanoksyjne zmiany potencjału spoczynkowego komórek nerwowych i osłonkowych ze zwojów kręgowych hodowanych <i>in vitro</i>	65
D. Markiewicz, J. Dymecki: Dynamika zmian morfologicznych w mózgu myszy z padaczką audiogenną po wywołanych doświadczalnie napadach drgawkowych	73
M. Wender, A. Petrescu, H. Filipek-Wender, J. Stanisławska: Estry cholesterolu w uszkodzeniach demielinizacyjnych w świetle korelacji histochemiczno-biochemicznych	83
H. Jędrzejowska: Rodzaje demielinizacji występujące w nerwach obwodowych w polineuropatiach	97
M. Alexianu, M. Macovei-Patrichi, A. Petrovici: Ultrastrukturalne zmiany w mięśniach w amiotrofii cukrzycowej	117
J. Lehmann: O klinice i patologii stwardnienia zanikowego bocznego	127
J. Borowska-Lehman, W. Nyka: Przewlekła białaczka szpikowa o obrazie <i>polyganglioradiculoneuritis</i>	135
M. B. Kozik, K. Wojciechowski, J. Wigowska-Sowińska: Przepuklina oponowa o niezwykłych rozmiarach	143

AK
AK

СОДЕРЖАНИЕ

В. Згожалевич, В. Нойхофф, Т. В. Вехнелдт: Белковый состав периферического миелина во время онтогенетического развития крысы	1
З. Адамчевска: Липиды миелина в развивающемся мозге	11
Ю. Шчех: Миелинизация лимбической системы в онтогенетическом развитии крысы	25
Х. Хагер, Р. Метц: Исследования в оптическом и электронном микроскопе регенерации миелиновых волокон в аутологических и гомологичных трансплантатах нервов	37
Д. Масьлиньска, Е. Томас: Гистохимические исследования распада миелина в коагулированном седалищном нерве	45
М. Я. Моссаковски: Морфология и гистохимия повреждений невроглии вызванных цианидом натрия в культуре ткани	53
З. Красьницка, А. Пшыбыльски: Послеаноксийные изменения потенциала покоя нервных и шванновских клеток из поясничных ганглиев, выращиваемых <i>in vitro</i>	65
Д. Маркевич, Е. Дымецки: Динамика морфологических изменений в мозге мышей с аудиогенной эпилепсией после экспериментально вызванных судорожных припадков	73
М. Вендер, А. Петреску, Х. Филипек-Вендер, Я. Станиславска: Эфиры холестерина при демиелинизационных повреждениях в свете гисто-биохимических корреляций	83
Х. Енджеёвска: Виды демиелинизации, выступающие в периферических нервах при полиневропатиях	97
М. Алексиану, М. Маковой-Патричи, Ал. Петровичи: Ультраструктурные изменения в мышцах при диабетической амиотрофии	117
И. Леман: О клинике и патологии бокового амиотрофического склероза	127
М. Б. Козик, К. Войцеховски, Я. Виговска-Совиньска: Грыжа мозговых с клинико-морфологической картиной <i>polyganglioradiculoneuritis</i>	135
М. Б. Козик, К. Войцеховски, Я. Виговска-Совиньска: Грыжа мозговых оболочек необычных размеров	143

CONTENTS

B. Zgorzalewicz V. Neuhoff, T. V. Waehneltd: Protein composition of peripheral myelin during ontogenesis of the rat	1
Z. Adamczewska: Myelin lipids in the developing rat brain	11
J. Szczech: Myelination of the limbic system in ontogenic development of rat	25
H. Hager, R. Metz: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Regeneration markhaltiger Nervenfasern in autologen und homologen Nerventransplantaten	37
D. Maślińska, E. Thomas: Histochemical study of myelin degeneration in the sciatic nerve severed by coagulation	45
M. J. Mossakowski: Morphology and histochemistry of glia damage produced by sodium cyanide in tissue culture	53
Z. Kraśnicka, A. Przybylski: Postanoxic changes of the resting potential of the nerve cells and amphicytes from intervertebral ganglia cultured <i>in vitro</i>	65
D. Markiewicz, J. Dymecki: Dynamics of morphological changes in the brain of mice with audiogenic epilepsy following experimentally evoked multiple epileptic fits	73
M. Wender, A. Petrescu, H. Filipek-Wender, J. Stanisławska: Cholesteryl esters in demyelinating lesions in the light of histochemical and biochemical correlations	83
H. Jędrzejowska: The types of demyelination of peripheral nerves in polyneuropathies	97
M. Alexianu, N. Macovei-Patrichi, A. Petrovici: Ultrastructural alterations in the muscle in diabetic amyotrophy	117
J. Lehmann: Zur Klinik und Pathologie der myatrophischen Lateral-sklerose	127
J. Borowska-Lehman, W Nyka: Chronic myeloblastic leukemia with a clinical and morphological appearance of <i>polyganglioradiculoneuritis</i>	135
M. B. Kozik, K. Wojciechowski, J. Wigowska-Sowińska: Meningoceles of exceptionally large size	143

WARUNKI PRENUMERATY

Cena prenumeraty krajowej:

rocznie	— zł 100.—
półrocznie	— zł 50.—

Prenumeratę na kraj przyjmują Oddziały RSW „Prasa — Książka — Ruch” oraz urzędy pocztowe i doręczyciele — w terminach:

- do 25 listopada na styczeń, I kwartał, I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do dnia 10 miesiąca, poprzedzającego okres prenumeraty, na pozostałe okresy roku bieżącego.

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje i organizacje społeczno-polityczne składają zamówienie w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa — Książka — Ruch”.

Zakłady pracy i instytucje w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW, oraz prenumeratorzy indywidualni zamawiają prenumeratę w urzędach pocztowych lub u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę, która jest o 50% droższa od prenumeraty krajowej, przyjmuje RSW „Prasa — Książka — Ruch”, Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto PKO nr 1531-71 — w terminach podanych dla prenumeraty krajowej.

*

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: 36668