

cop 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH



# NEUROPATOLOGIA POLSKA

P, 105

63, -

~~Milner, Mo~~

TOM XVI

1978

ZESZ. 4

---

WARSZAWA



# NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XVI

PAŹDZIERNIK—GRUDZIEŃ

Nr 4

## KOMITET REDAKCYJNY

*Jerzy Dymecki* (Warszawa), *Janusz Groniowski* (Warszawa), *Jerzy Kulczycki* (Warszawa), *Adam Kunicki* (Warszawa), *Tadeusz Majdecki* (Warszawa), *Mirostlaw Mossakowski* (Warszawa), *Ewa Osetowska* (Mińsk Mazowiecki), *Mieczystaw Smiatek* (Warszawa), *Mieczystaw 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*,  
*Mieczystaw 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



HALINA KROH, AGNES LUCIANI

THE EFFECT OF TRANSPLACENTAL ETHYLNITROSOUREA  
ON THE FINE STRUCTURE OF THE ADULT MOUSE BRAIN

I. NERVE CELL \*

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



Previous morphological and histochemical investigations have revealed demyelinating foci in the brain of the offspring and their mothers after a single dose of cancerogenic ethylnitrosoarea (ENU) administered during pregnancy (Kroh 1973, 1976 a, b). Biochemical studies performed on the offspring of mice under identical experimental conditions presented abnormal composition of myelin proteins as early as after the first experimental month (Wender et al. 1978), whereas in rats methylnitrosoarea administered at mature age caused, among other changes, a massive loss of the sphingomyelin content and an increase in cholesterol esters in the cerebral myelin fraction (Wender et al. 1977).

Our own morphological and histochemical observations prompted us to perform ultrastructural studies on the animals at various stages of the experiment with the aim of clearing up the pathogenesis and dynamics of the process which differs considerably from known human or experimental disease but is characterized by a definite shift in myelin content (Wender et al. 1978).

The presented electron microscopic investigations were performed on animals at such a point of the experiment during which numerous mice previously presented demyelinating foci in the brain. This point of the experiment seems to be of great importance to determine the share of particular structural elements in pathological process.

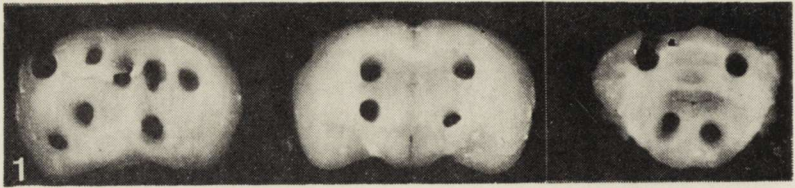
MATERIAL AND METHODS

The offspring of noninbred Swiss female mice which had been injected i.v. with a single dose of ENU (80 mg/kg of body weight) on 15th

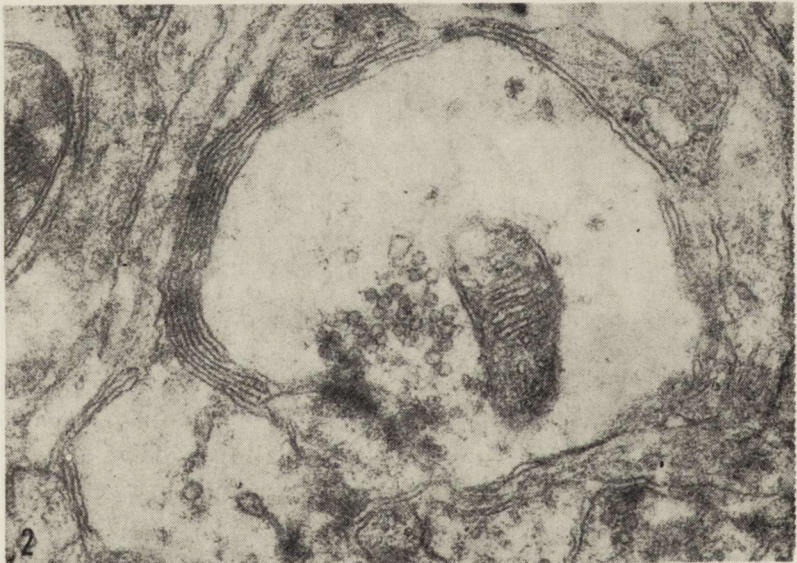
\* Polish Academy of Sciences Programm No 10.4.2.02.3.1.



day of pregnancy and of control mice, both 100 days old, were anesthetized with i.p. Nembutal and killed by whole body perfusion with 20—30 ml of the fixative for about 10 min. The fixative contained 3% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2—7.4. Following perfusion the brain was dissected and blocks of tissue from 16 selected locations (Fig. 1) were taken with an arterial needle (Kifa No 3) and immersed in glutaraldehyde solution prepared as described above. Afterwards the tissue was fixed in 2% OsO<sub>4</sub> in cacodylate buffer, pH 7,2—



*Fig. 1.* Cross section of mouse brain after cutting out standard tissue blocks. 5 ×  
*Ryc. 1.* Przekroje poprzeczne mózgu myszy po pobraniu standardowym bloków tkanki. Pow. 5 ×



*Fig. 2.* Cerebral cortex. The fibre with synaptic vesicles and irregular synaptic cleft surrounded partly by the cellular process forming parallel membranes resembling myelin lamellae. In contact presynaptic (?) segment of other fibre with parallel arranged membranes. × 38 400

*Ryc. 2.* Kora mózgu. Włókno z pęcherzykami i zagęszczeniem synaptycznym otoczone częściowo wypustką komórkową tworzącą równoległe układające się błony przypominające blaszki mieliny. Obok część presynaptyczna (?) innego włókna, przy którym także występują ułożone równoległe błony. Pow. 38 400 ×



7.4, rinsed in the buffer, dehydrated in increasing concentrations of ethanol and in propylene oxide and embedded in Epon 812. Ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. From each block semithin sections were made and stained with toluidine blue. The remaining cerebral tissue was postfixed in 10% formalin, embedded in paraffin and the sections were stained according to Klüver-Barrera method.

## RESULTS

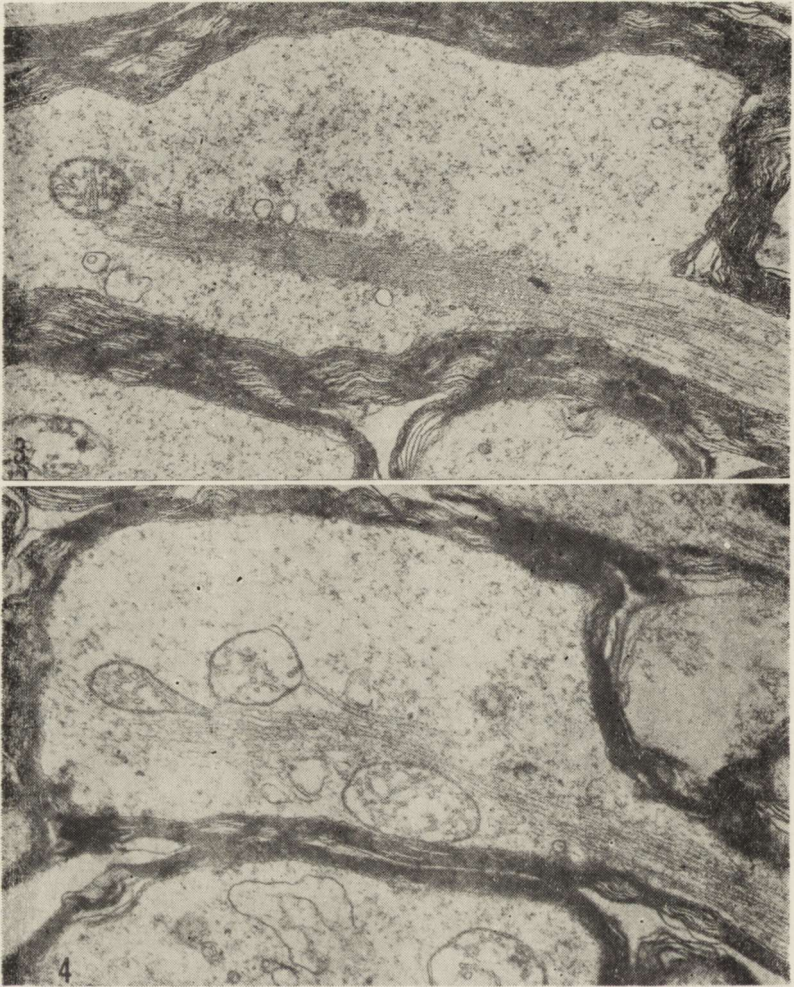
The following morphological changes were observed: loss of nerve cells most marked in the IIIrd and IVth frontal and parietal cortical layer, moderate loosening of the callosal fibres, and fragmentation of axons in the medulla oblongata.

The changes of fine structure concerned all types of cellular elements of the nerve tissue. None of the examined brain areas was spared but the intensity of the observed abnormalities and pathological changes varied. The nerve cells revealed the most pronounced alterations. Their nuclei often presented irregular profiles. The channels of the rough endoplasmic reticulum were usually short, narrow and branching. The Golgi apparatus was well developed with numerous wide channels accompanied by multiple coated vesicles and multivesicular bodies. Lysosomes were often visible.

Prominent changes were observed in axons. Besides myelinated, normally developed nerve fibres there were incompletely myelinated axons and damaged axons. Axons considered as not fully myelinated were surrounded by a small number of myelin lamellae as compared to the diameter of the fibre. In some fibres the mesaxon was well preserved. In one electronogram only there were changes suggesting abnormal myelin formation, namely in the transverse section of the nerve fibre one could observe synaptic vesicles and the synaptic membrane. The process of the cell adjacent to the fibre surrounded it almost completely with the exception of the synaptic membrane. Between the axolemma and the process of the adjacent cell there were parallelly arranged membranes resembling myelin lamellae (Fig. 2).

Numerous myelin fibres were damaged to a various degree. The observed pathological changes concerned the myelin sheath and the axoplasm. The moderately damaged fibres were characterized by preserved or slightly delaminated lamellae. Some inner myelin lamellae were detached in a mushroom-like manner, sometimes 2—3 detached lamellae divided the fibre into two parts (Fig. 10). On longitudinal cross section, the fibres with normal or slightly loosened myelin lamellae





*Fig. 3.* Commissura anterior. Longitudinal section of myelinated fibre. In balloon-like dilatation the dense band of neurotubules and neurofilaments to which some vesicles and mitochondrion are closely apposed.  $\times 14\ 250$

*Ryc. 3.* Spoidło przednie. Przekrój podłużny włókna zmielinizowanego. W balonowatym rozszerzeniu włókna zbita wiązka neurotubuli i neurofilamentów; bezpośrednio przy niej widoczne pęcherzyki i mitochondrium. Pow.  $14\ 250 \times$

*Fig. 4.* Commissura anterior. Longitudinal section of myelinated fibre. In dilated part of the fibre numerous mitochondria; the outer membrane of one of them in immediate contact with a neurotubule.  $\times 14\ 250$

*Ryc. 4.* Spoidło przednie. Przekrój podłużny włókna zmielinizowanego. W rozszerzonej części włókna liczne mitochondria; błona zewnętrzna jednego z nich łączy się z neurotubulą. Pow.  $14\ 250$

presented segmental dilatations, which were also seen in semithin sections. The neurofilaments and neurotubules, at first dispersed and running parallel to the fibre axis, in the dilated part became a dense wide



band which disappeared in the central part of the dilatation. Mitochondria and vesicles of different diameters were present in the vicinity or even in close contact with this band (Fig. 3). The delaminated outer membrane of some mitochondria was connected with the tubular structure (Fig. 4).

The most damaged myelin sheaths were either interrupted (Fig. 5) or composed of 1—2 residual lamellae only (Fig. 6). The myelin lamellae of many neighbouring axons cohered. In some areas the course of detached myelin lamellae was so weavy and loose that the inner part of the axon was scarcely visible (Fig. 7). One could also observe myelin conglomerates in which separate fibres were difficult to distinguish.

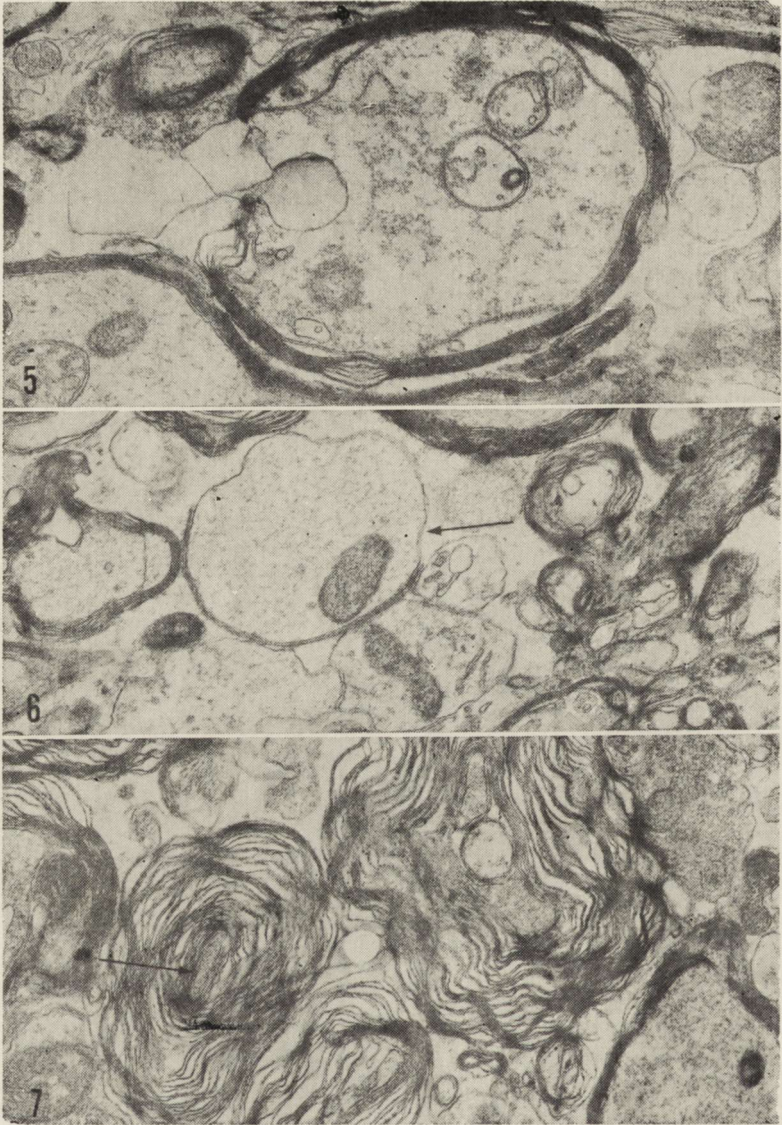
The damage to synaptic terminals concerned, the size, number and localization of synaptic vesicles, though normal synaptic terminals were also observed. Some presynaptic terminals contained an increased number of dark vesicles of 400 Å in diameter (Fig. 8) or electron lucent vesicles of similar size (Fig. 9). Some synaptic vesicles were extremely densely accumulated (Fig. 10) whereas in other terminals only a few or single vesicles were present near the synaptic membrane, the remaining area of the terminal being devoid of any organelles (Fig. 11).

#### DISCUSSION

All the examined brain areas showed neuroaxonal changes. However, the demyelination foci which could correspond to the plaques described previously (Kroh 1976 a, b) could not be found. The fine structural changes were more pronounced in the axons and their myelin sheaths than in the nerve cell perikaria. Only rarely normal neuronal perikaria or normal axial fibres could be demonstrated. The numerous fibres with an evident mesaxon and many others with an abnormal relation between the axial diameter and the thickness of the myelin sheath speak in favor of delayed myelination. According to Folch-Pi (1955) myelination should be terminated in Swiss mice by the 8th week of life. The structures resembling myelin lamellae around the synaptic terminal were indicative of abnormal myelination. The pathological changes resulting from ENU action do not fully correspond with those observed in the course of other types of experimental neuronal injuries which according to Lampert (1967) result in either reactive, degenerative, regenerative or dystrophic changes. The explanation of the changes presented in our material is difficult because the elements of these changes are connected with number of neuroaxonal diseases.

Chou and Hartmann (1964) stressed the susceptibility of the axoplasm to various noxious factors of endo- and exogenous origin. They have





*Fig. 5.* Commissura anterior. Disintegrated segment of myelin sheath. Remnants of myelin lamellae left *in situ*.  $\times 14\ 250$

*Ryc. 5.* Spidrio przednie. Włókno o przerwanej ciągłości osłonki mielinowej. Resztki blaszek mielinowych w miejscu rozpadu. Pow. 14 250

*Fig. 6.* Cerebral cortex. Nerve fibre with a single preserved myelin lamella (arrow). Nearby conglomerates of myelinated fibres.  $\times 14\ 000$

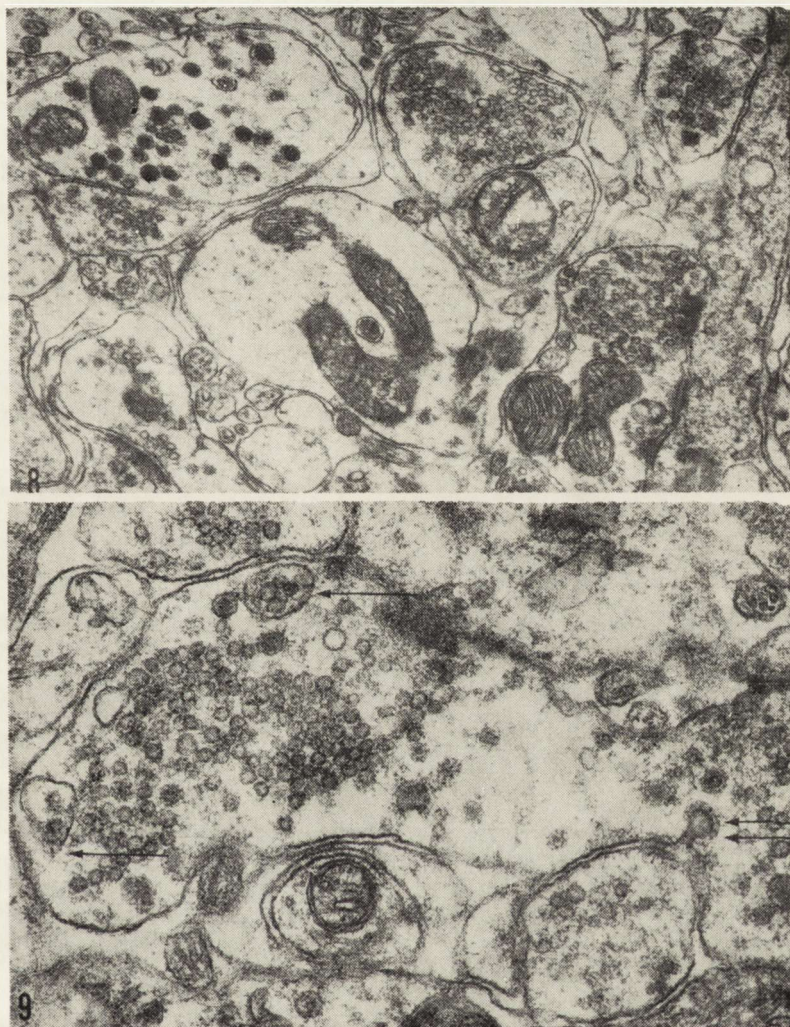
*Ryc. 6.* Kora mózgu. Włókno nerwowe z zachowaną pojedynczą blaszką mielinową (strzałka). W pobliżu konglomeraty włókien osiowych. Pow. 14 000

*Fig. 7.* Medulla oblongata. Weavy course of delaminated myelin sheath. The axon almost invisible (arrow).  $\times 18\ 000$

*Ryc. 7.* Rdzeń przedłużony. Blaszki osłonki rozwarstwione, o falistym przebiegu. Włókno osiowe prawie niewidoczne (strzałka). Pow. 18 000  $\times$



found a damaging effect of  $\beta$ - $\beta$ -iminodipropionitrile on the nerve fibre resulting in balloon-like dilation of the axonal conus with condensation and huge increase in the number of neurofilaments. The authors relate



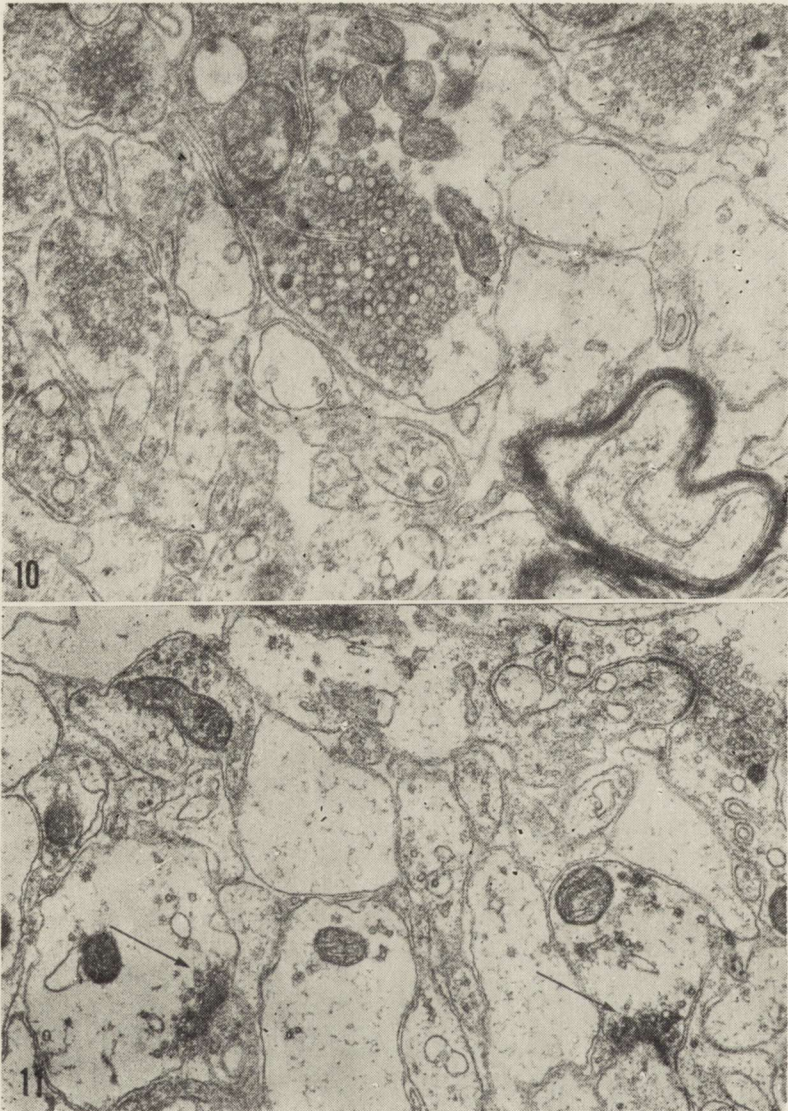
*Fig. 8.* Cerebral cortex. Numerous synaptic terminals. One of them contains mainly large dark synaptic vesicles.  $\times 11\ 000$

*Ryc. 8.* Kora mózgu. Liczne zakończenia synaptyczne. W jednym z nich przeważa dużych ciemnych pęcherzyków synaptycznych. Pow.  $11\ 000 \times$

*Fig. 9.* Cerebral cortex. Irregular presynaptic terminal containing numerous vesicles, some of them optically dense. Few vesicles surrounded by a single membrane (arrow). Two arrows indicate a vesicle contacting axolemma.  $\times 15\ 000$

*Ryc. 9.* Kora mózgu. Nieregularne zakończenie presynaptyczne zawierające liczne pęcherzyki, niektóre optycznie gęste. Kilka pęcherzyków otoczonych przez pojedynczą błonę (strzałka). Dwie strzałki wskazują pęcherzyk synaptyczny mający łączność z aksolemą. Pow.  $15\ 000 \times$





*Fig. 10.* Cerebral cortex. Presynaptic terminal with numerous large, empty vesicles. Abnormal accumulation of synaptic vesicles. In right lower corner delaminated myelin lamellae divide the fibre into two part.  $\times 11\ 000$

*Ryc. 10.* Kora mózgu. Zakończenie synaptyczne z licznymi, dużymi, pustymi pęcherzykami. Nadmierne zagęszczenie pęcherzyków. W prawym dolnym rogu włókno osiowe podzielone odwarstwioną blaszką mieliny. Pow.  $11\ 000 \times$

*Fig. 11.* Cerebellar cortex. Synaptic terminals with scarce number of vesicles at the synaptic membrane (arrow).  $\times 19\ 000$

*Ryc. 11.* Kora mózdzku. Zakończenie synaptyczne z niewielką liczbą pęcherzyków tuż przy błonie synaptycznej (strzałka). Pow.  $19\ 000 \times$



this phenomenon to the impairment of axonal flow. Chou and Hartmann suggest that under the influence of toxins or chemical substances which increase the viscosity of the axoplasmic proteins, primary axostasis develops which may lead to the dilation of fibres in their non-myelinated segments. One cannot exclude that in our material, the coalescing of neurofilaments and neurotubules into wide bands in the myelinated segments of the axon could be the result of the altered physico-chemical properties of the axoplasm, caused by ENU. However, it seems that the changes do not correspond with those observed in fibrillary degeneration after aluminium phosphate administration (Terry, Pena 1971) or with those observed in the course of Alzheimer's disease, senile dementia or Down's disease (Terry 1971, Wiśniewski et al. 1976). Close contact of neurofilaments with vesicular structures is a feature of axonal dystrophy in experimental vitamin E deficiency (Lampert 1967).

The altered structure of synaptic terminals indicates the involvement by the pathological process also distant parts of the axonal fibre. The enlargement of synaptic vesicles is considered to be an early sign of Wallerian degeneration. It can arise as a deformation of newly formed or as a transformation of already formed vesicles (Akert et al. 1971). Similar large vesicles were observed in the developing axon (Del Cerro, Snider 1968). The loss of synaptic vesicles or the formation of abnormal vesicular patterns during degenerative process was described by de Robertis (1958, 1959), whereas Birke et al. (1960) observed the formation of a honeycomb-like pattern of vesicles in degenerating nerve terminals (cit. after Gray, Guillery 1966). All those types of changes were observed in our material. In addition, dark, large vesicles of varying diameter, which rarely appear in control material, were present. Laatch and Cowan (1967) demonstrated that six days after dissection of the commissural fibres, in degenerating terminals there was either increased density of the axoplasm and aggregation of the synaptic vesicles or complete depletion of vesicles and mitochondria. These observations can indicate that the variety of changes in synaptic terminals in our material reflects various stages of the same pathological process.

Interpretation of the concomitant changes in the myelin sheaths is uneasy. The delamination of inner myelin lamellae bulging into the fibre interior or the formation of mushroom-like protrusions are probably due to the contraction of the axoplasm in the course of the degenerative process. Kim and Rizutto (1975) observed a collapse of myelin sheaths preceded by axonal and presynaptic terminal swelling in tissue culture of mouse neurons after intoxication with sodium diethyldithiocarbamate. Lampert (1965) and Lampert and Schochet (1968)



found in other demyelinating diseases the signs of removal of myelin destruction products or the signs of remyelination. We did observe either of these processes. The changes in neuronal perikaria were less pronounced than those in the axons. The well developed Golgi apparatus and the numerous lysosomes may indicate increased neuronal katabolism. According to Lantos (1971), several hours after ENU administration to the adult rat the only observed changes in neurons were irregular nuclear profiles and nuclear segregation of fibrillar and granular components. The irregular nuclear profiles were observed also in our material. The slight neuronal changes demonstrated by Lantos could probably be due to the short duration of the experiment and a different reactivity of the rat nervous tissue to ENU.

The dynamics of the alterations in the mice nerve tissue cannot be explained on the ground of late brain changes only. As the toxic agent was applied to the fetal brain during the migration of immature nerve cells and before the formation of the processes and myelin sheaths, it is probably only the neuronal perikaria that were affected, as was shown by the loss of cortical cells. One is inclined to believe that the delayed and abnormal myelination, the pathological changes in axons, synaptic terminals and myelin sheaths were caused by the primary neuronal damage.

H. Kroh, A. Luciani

#### WPLYW ETYLNITROZOMOCZNIKA ZASTOSOWANEGO PRZEZŁOŻYSKOWO NA ULTRASTRUKTURĘ MÓZGU DOROSŁEJ MYSZY. I. KOMÓRKA NERWOWA

##### Streszczenie

W celu wyjaśnienia patogenezy procesu demielinizacyjnego w mózгах myszy potomnych pod wpływem etylnitrozomocznika (ENU) podanego przezłożyskowo przeprowadzono badania ultrastrukturalne na zwierzętach 100-dniowych. W tym okresie doświadczenia stwierdzono wybitne zmiany w komórkach nerwowych, szczególnie w ich wypustkach osiowych, i do nich ograniczono przedstawioną pracę. Zmiany dotyczące osłonek mielinowych polegały, oprócz oznak opóźnionej i nieprawidłowej mielinizacji, na uszkodzeniu mieliny pod postacią rozwarstwień i zapadania się blaszek wewnętrznych, ubytku blaszek zewnętrznych i przerwania ciągłości osłonek z pozostawieniem resztek błon *in situ*, bez objawów uprzążania. Zmiany w najbardziej odbiegających od normy włóknach osiowych polegały na ich odcinkowym poszerzeniu i na zbijaniu się neurotubuli i neurofilamentów w szerokie pasma. Zmianom tym towarzyszyło uszkodzenie zakończeń synaptycznych dotyczące wielkości, liczby i rozmieszczenia pęcherzyków synaptycznych bądź opustoszenie zakończeń synaptycznych. Zmiany miały charakter zwyrodnieniowy i dystroficzny.



Stwierdzone zmiany neuroaksonalne mogą być następstwem pierwotnych zaburzeń w przepływie aksoplazmy pod wpływem substancji toksycznej na różniące się komórki nerwowe.

X. Крох, А. Люциани

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛНИТРОЗОМОЧЕВИНЫ, ВВЕДЕННОЙ  
ТРАНСПЛАЦЕНТАРНО НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ МОЗГА  
ВЗРОСЛОЙ МЫШИ. I. НЕРВНАЯ КЛЕТКА

Резюме

В целях выяснения патогенеза процесса демиелинизации в мозгах потомков мышей под влиянием этилнитрозомочевина (ЭНМ), введенной трансплацентарно, проведены ультраструктурные исследования на 100-дневных животных. В этот период опыта установлены отчетливые изменения в нервных клетках, особенно в их осевых отростках, и ими ограничилась представленная работа. Изменения, касающиеся миелиновых оболочек, заключались, кроме признаков запаздывающей и неправильной миелинизации, в повреждении миелина в виде расслоений и западания внутренних бляшек, утрате наружных бляшек и прерывании непрерывности оболочек с оставлением остатков мембран *in situ*, без признаков уборки. Изменения в наиболее отклоняющихся от нормы осевых волокнах заключались в расширении их участков и в суживании нейротубул и нейрофиламентов в широкие полосы. Эти изменения сопровождалось повреждением синаптических окончаний, касающимся величины, числа и размещения синаптических пузырьков, или разрушением синаптических окончаний. Изменения носили дегенеративный и дистрофический характер.

Установленные нейроаксональные изменения могут быть последствием первичных нарушений в потоке аксоплазмы под воздействием токсического вещества на дифференцирующиеся нервные клетки.

PISMIENNICTWO

1. Akert K., Cuenod M., Moor H.: Further observations on the enlargement of synaptic vesicles in degenerating optic nerve terminals of the avian tectum. *Brain Res.*, 1971, 25, 255—263.
2. Chou S. M., Hartmann H.: Axonal lesions and waltzig syndrome after IDPN administration in rats. *Acta neuropath. (Berl)*, 1964, 3, 428—450.
3. Del Cerro M. P., Snider R. S.: Studies on the developing cerebellum. Ultrastructure of the growth cones. *J. comp. Neurol.*, 1968, 133, 342—362.
4. Folch-Pi J.: Composition of the brain in relation to maturation. In: *Biochemistry of the developing nervous system*. Ed. H. Waelsch. Academic Press, NY, 1955.
5. Gray E. G., Guillery E. W.: Synaptic morphology in the normal and degenerating nervous system. In: *Internat. Review of Cytology*. Ed. G. H. Bourne, J. F. Danielli. Academic Press, NY, London, 1966, 19, 111—182.



6. Kim S. U., Rizutto N.: Neuroaxonal degeneration induced by sodium diethyl-dithiocarbamate in cultures of central nervous system. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1975, 34, 531—541.
7. Kroh H.: Ethylnitrosourea induced microcephaly in Swiss mice and Wistar rats. *Current topics in neuropathology*. Ed. K. Jellinger, Facultas Verlag, Wien, 1973, 29—35.
8. Kroh H.: Demyelination in the mouse brain after transplacental administration of N-ethyl-N-nitrosourea (ENU). Preliminary report. *Neuropat. Pol.*, 1976a, 14, 115—119.
9. Kroh H.: Multiple degenerating foci induced with ethyl-nitrosourea (ENU) in mouse brain. *Internat. Symposium on „Chemical brain injuries and brain tumors”*. Polish Neuropath. Assoc. and Neuropath. Society of DDR, Warszawa, September 23—25, 1976b.
10. Laatsch R. H., Cowan W. M.: Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. II. Degeneration of commissural afferents. *J. comp. Neurol.*, 1967, 130, 241—262.
11. Lantos P. L.: The effects of a single dose of N-ethyl-N-Nitrosourea on the fine structure of the brain of the rat. *Experientia*, 1971, 27, 1322—1323.
12. Lampert P.: Demyelination and remyelination in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1965, 24, 371—385.
13. Lampert P., Schochet S.: Demyelination and remyelination in lead neuropathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 527—545.
14. Lampert P.: A comparative electron microscopic study of reactive, degenerating, regenerating and dystrophic axons. *J. Neuropat. exp. Neurol.*, 1967, 26, 345—368.
15. Terry R., Pena C.: Experimental production of neurofibrillary degeneration. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1965, 24, 200—210.
16. Terry R.: Neuronal fibrous protein in human pathology. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1971, 30, 8—19.
17. Wender M., Adamczewska-Gonczewicz Z., Mularek O., Pankrac J., Sędzik J.: The effect of intoxication with methylnitrosourea on the lipid composition of cerebral myelin. *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 219—230.
18. Wender M., Piechowski A., Sędzik J., Mularek O., Talkowska D.: Myelin proteins after transplacental intoxication with ethylnitrosourea. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 339—346.
19. Wiśniewski H., Narang H., Terry R.: Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *J. Neurol. Sci.*, 1976, 27, 173—181.

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



BARBARA GAJKOWSKA, AGNES DANIELEWICZ, JERZY W. BOROWICZ

ULTRASTRUKTURA  
UKŁADU PODWZGÓRZOWO-PRZYSADKOWEGO SZCZURA  
ZATRUWANEGO MORFINĄ W OKRESIE ROZWOJU

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN

Kierownik: doc. dr med. J. Borowicz

W poprzednich badaniach nad wpływem morfiny na ultrastrukturę układu podwzgórzowo-przysadkowego u dorosłych zwierząt wykazano, że zarówno ostre, jak i przewlekłe zatrucie morfiną powoduje wystąpienie zmian morfologicznych wskazujących na zmniejszenie syntezy neurosekreту w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego (Borowicz, Gajkowska, 1976; Gajkowska, Borowicz, 1976). W wielu włóknach płata nerwowego przysadki stwierdzono zmiany zwyrodnieniowe i zmniejszone gromadzenie się ziarnistości elementarnych, przy braku morfologicznych objawów wydzielania ich z włókien (Borowicz i wsp., 1976). W świetle tych wyników wydaje się celowe prześledzenie zmian morfologicznych w układzie podwzgórzowo-przysadkowym młodych szczurów, urodzonych z rodziców przewlekłe zatrutowanych morfiną.

MATERIAŁ I METODA

Doświadczenie przeprowadzono na szczurach szczepu Wistar z hodowli losowej. Zwierzęta podzielono na 2 grupy doświadczalne:

Grupa I. Pięciu samcom i pięciu samicom podawano podskórnie przez 60 dni *Morphinum hydrochloricum* w dawce 5 mg/kg wagi ciała dziennie. Po tym okresie szczury połączono i samice w dalszym ciągu otrzymywały taką samą dawkę morfiny przez cały okres ciąży. Po okresie 2 miesięcy z mózgów urodzonych młodych szczurów pobrano wycinki z jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz wycinki z płata nerwowego przysadki do badań w mikroskopie elektronowym.



Grupa II. Pięć samic i samców otrzymywało *Morphinum hydrochloricum* w takiej samej dawce i w takich samych warunkach doświadczalnych jak w grupie I-ej; samice otrzymywały ponadto morfinę w tej samej dawce przez okres laktacji. Młode zwierzęta po odstawieniu od matki otrzymywały 2,5 mg *Morphinum hydrochloricum* podskórnie przez 30 dni, a przez następne 30 dni po 5 mg/kg wagi ciała dziennie. Po ostatniej iniekcji pobrano z mózgów zwierząt wycinki z jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz płata nerwowego przysadki do badań w mikroskopie elektronowym.

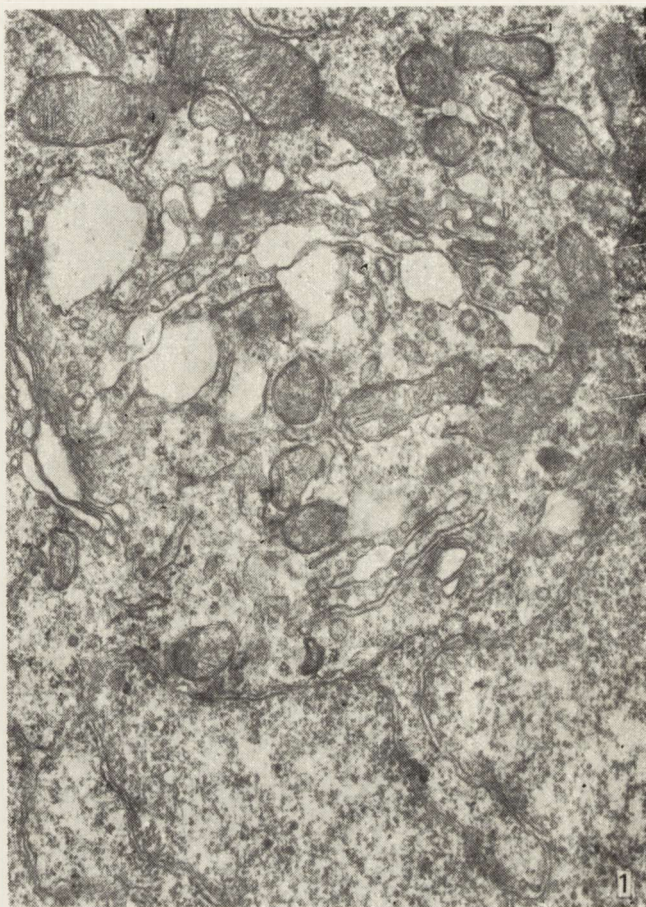
Kontrolę stanowiło 5 zdrowych, dwumiesięcznych szczurów. Materiał do badań w mikroskopie elektronowym utrwalano w 5% aldehydzie glutarowym i w 2% czterotlenku osmu, odwadniano w alkoholach i tlenku propylenu oraz zatapiano w Epon 812.

Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A na płytach fotograficznych ORWO EU 2 z preparatów barwionych octanem uranilu i cytrynianem ołowiu.

#### WYNIKI

I Grupa doświadczalna. Neurony jądra nadwzrokowego i przykomorowego wykazywały podobne zmiany morfologiczne. Wszystkie jądra komórek neurosekrecyjnych charakteryzowało występowanie głębokich wpukleń błony jądrowej i duże, elektronowo-gęste jąderko. Bardzo duże zmiany obserwowano w budowie aparatu Golgiego, którego liczne i zazwyczaj wąskie kanały były w znacznym stopniu poszerzone i niekiedy balonowato rozdęte, przeważnie optycznie puste (ryc. 1). W pobliżu mocno rozdętych kanałów aparatu Golgiego występowały liczne, drobne pęcherzyki wypełnione substancją o małej gęstości elektronowej lecz dojrzałe ziarnistości neurosekrecyjne były prawie nieobecne. Ciała wielopęcherzykowe i lizosomy spotykano w ilościach nie odbiegających od normy. Siatka ergastoplazmatyczna była zazwyczaj dobrze rozwinięta lecz niektóre jej kanały ulegały dość znacznym poszerzeniom i wypełnione były niewielką ilością materiału włóknatego o małej gęstości elektronowej. Zmianom ulegały również mitochondria. W wielu neuronach były one dość liczne lecz drobne i jak gdyby obkurczone, z macierzą o dużej gęstości elektronowej, w innych występowały mitochondria znacznie wydłużone, o jasnej macierzy, w których pojedyncze grzebienie mitochondrialne były wyraźnie poszerzone. Zarówno w jądrze nadwzrokowym, jak i przykomorowym, w cytoplazmie neuronów występowały pojedyncze, duże skupienia drobnoziarnistego materiału zwane ciałami jąderkopodobnymi. We włóknach jąder neurosekrecyjnych, w neuropilu, obserwowano niewiele ziarnistości neuro-





Ryc. 1. Grupa I. Fragment neuronu jądra przykomorowego. Inwaginacje błony jądrowej i dobrze rozwinięty aparat Golgiego z licznymi, balonowato rozdętymi kanałami. Pow. 26 700 ×

Fig. 1. Group I. Fragment of neuron of *nucleus paraventricularis*. Invaginations of nuclear membrane, and well developed Golgi apparatus with numerous, balloon-like distended channels. × 26 700

sekrecyjnych. Były one również nieliczne we włóknach płata nerwowego przysadki i często o zmniejszonej gęstości optycznej. W niektórych włóknach aksonalnych spotykano dość duże nagromadzenie mikropęcherzyków, przy minimalnej ilości ziarnistości neurosekrecyjnych. Nieliczne włókna zawierały także struktury lizosomalne i figury mielinowe (ryc. 2). Obserwowano również włókna osiowe, w których ziarnistości występowały pojedynczo, prawie nie zawierały mikropęcherzyków i neurotubuli, były natomiast wypełnione drobnoziarnistym materiałem o małej gęstości elektronowej (ryc. 3). Pituicyty były niezmienione.

U zwierząt II grupy doświadczalnej, w neuronach jądra



nadwzrokowego i przykomorowego obserwowano zmiany ultrastrukturalne, o podobnym charakterze jak opisywane w I-ej grupie lecz ich nasilenie było znacznie mniejsze. W wielu komórkach neurosekrecyjnych występowały dość duże wpuklenia błony jądrowej. Aparat Golgiego zlokalizowany zazwyczaj w strefie przyjądrowej był prawidłowo i dobrze rozwinięty, niekiedy tylko jego pojedyncze kanały były nieco poszerzone i zwykle optycznie puste (ryc. 4). W okolicy aparatu Golgiego spotykano znaczną ilość drobnych pęcherzyków niekiedy optycznie pustych, a niekiedy wypełnionych materiałem o małej gęstości elektronowej oraz większą ilość ciał wielopęcherzykowych, lizosomów i tzw. coated vesicles w porównaniu z grupą I-szą.

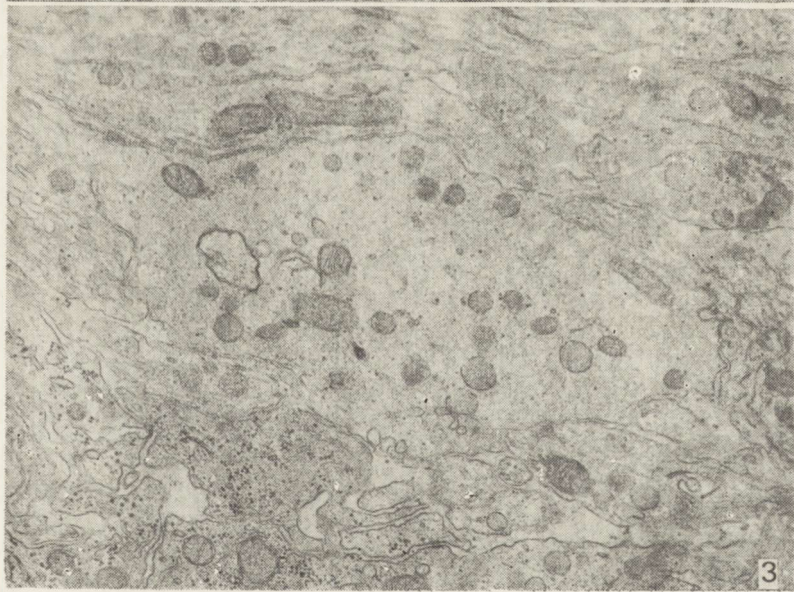
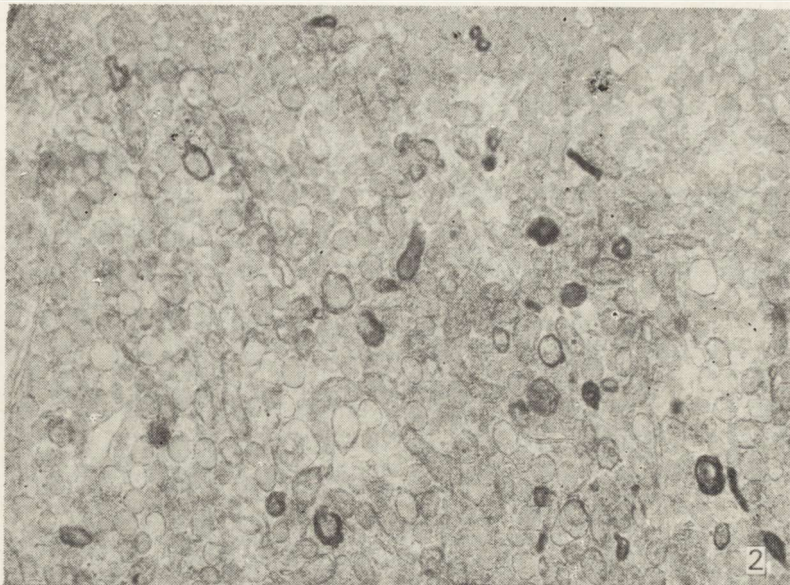
Siatka ergastoplazmatyczna nie wykazywała większych odchyień od normy, natomiast w dość licznych mitochondriach obserwowano przejaśnienie macierzy i zmniejszenie liczby grzebieni poprzecznych. Ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w cytoplazmie komórek neurosekrecyjnych była mniejsza niż w kontroli. Nagromadzenie ziarnistości neurosekrecyjnych we włóknach płata nerwowego przysadki było również nieznaczne. Wiele włókien zawierało tylko pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne.

W tych włóknach obserwowano niewielkie ilości mikropęcherzyków i neurotubuli (ryc. 5). W zakończeniach aksonalnych znajdujących się w pobliżu naczyń krwionośnych niekiedy ilość mikropęcherzyków i neurotubuli była zbliżona do normy. Liczne włókna zawierały także struktury lizosomopodobne i figury mielinowe (ryc. 5); w niektórych można było stwierdzić także glikogen. Pituicyty były prawidłowe.

#### OMÓWIENIE

W obydwu grupach doświadczalnych stwierdzono zmiany ultrastrukturalne w układzie podwzgórzowo-przysadkowym szczurów zatrutowanych morfiną w okresie rozwoju. Interpretacja zmian mikroskopowo-elektrowych powstałych pod wpływem działania morfiny jest bardzo trudna ze względu na współistnienie zaburzeń metabolizmu węglowodanów, białek oraz gospodarki wodnej. Do najbardziej charakterystycznych zmian w neuronach zarówno jądra nadwzrokowego jak i przykomorowego należą zmiany dotyczące układu GERL i zmiany wskazujące na zmniejszenie lub zwolnienie syntezy ziarnistości neurosekrecyjnych w obydwu badanych jądrach. Zmiany te były bardziej nasilone u zwierząt I grupy doświadczalnej. W tym przypadku działanie morfiny na mózg płodu mogło być bezpośrednie, wiadomo bowiem, że morfina przechodzi łatwo przez barierę łożyskową i pojawia się u płodu już w 2 min po wstrzyknięciu matce (La Du i wsp., 1971).





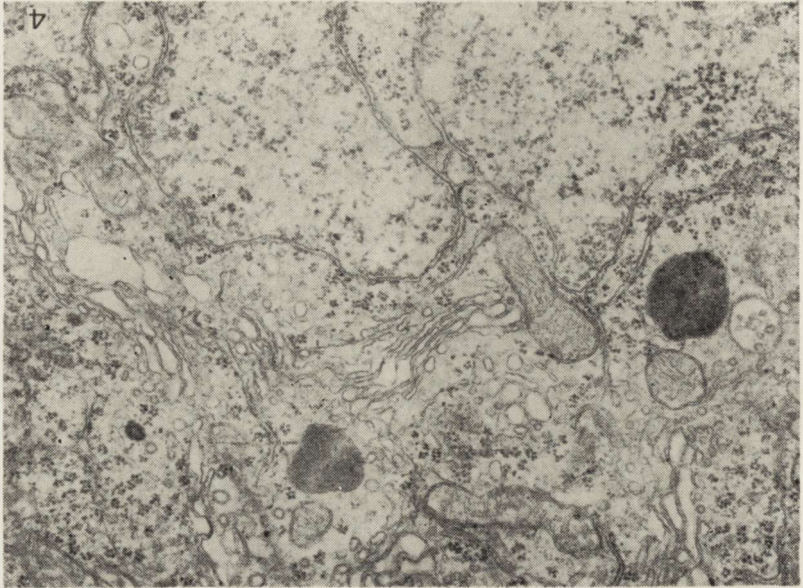
Ryc. 2. Grupa I. Płat nerwowy przysadki. Ziarnistości neurosekrecyjne o zmniejszonej gęstości elektronowej, dość liczne figury mielinowe. Pow. 13 650  $\times$

Fig. 2. Group I. Neurohypophysis. Neurosecretory granules of diminished electron density, numerous myelin figures.  $\times$  13 650

Ryc. 3. Grupa I. Płat nerwowy przysadki. Włókno nerwowe wypełnione materiałem bezstrukturalnym zawiera także pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 13 650  $\times$

Fig. 3. Group I. Neurohypophysis. Nerve fiber filled with homogenous substance contains also singular neurosecretory granules.  $\times$  13 650



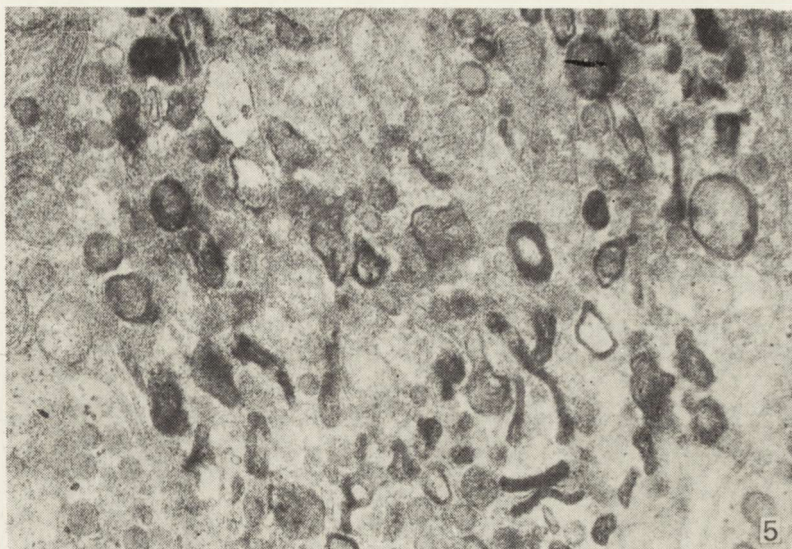


Ryc. 4. Grupa II. Fragment neuronu jądra nadwzrokowego. W cytoplazmie dobrze rozwinięty aparat Golgiego z nieco poszerzonymi pojedynczymi kanałami, obecne również lizosomy i ciała wielopęcherzykowe. Pow. 13 650 ×

Fig. 4. Group II. Fragment of neuron of *nucleus supraopticus*. In the cytoplasm well developed Golgi apparatus with some channels slightly dilated; lysosomes and multivesicular bodies also present. × 13 650

Stwierdzone zmiany w układzie GERL mogły być jednakże wynikiem wielu nakładających się na siebie czynników patogennych. Od dawna już wiadomo, że morfina powoduje bardzo znaczne zmniejszenie rezerw energetycznych wszystkich tkanek. Liczne badania biochemiczne wykazały, że morfina ma depresyjne działanie na wiele enzymów odpowiedzialnych za glikolizę i biorących udział w cyklu kwasów trójkarboxylowych (Takemori, 1965; Dodge, Takemori, 1969). Znany jest także wpływ morfiny powodujący depresję oddychania poprzez hamowanie ośrodków oddechowych. Tak więc morfina działając hamująco na ośrodki oddechowe w mózgu mogła powodować niedotlenienie mózgu matki i płodu (Schute, Davis, 1933; Florez i wsp., 1968; Eidelberg, Schwartz, 1970). Można również przypuszczać, że obserwowane zmiany w układzie sekrecyjnym młodych szczurów były również spowodowane wzrostem koncentracji CO<sub>2</sub> w ośrodkowym układzie nerwowym, na co wskazują dość wyraźne zmiany stwierdzone w ultrastrukturze mitochondriów, najbardziej wrażliwych na działanie różnych czynników patogennych. Zawartość enzymów łańcucha oddechowego pozostaje w prostej proporcji do liczebności grzebieni mitochondrialnych. W badanym materiale,





Ryc. 5. Grupa II. Płat nerwowy przysadki. We fragmencie włókna duża liczba ciał lizosomopodobnych oraz figur mielinowych i nieliczne ziarnistości neurosekrecyjne. Pow. 30 600 ×

Fig. 5. Group II. Neurohypophysis. In a fragment of the fiber numerous lysosome-like bodies, myelin figures and some neurosecretory granules. × 30 600

w wielu mitochondriach stwierdzano przejaśnienie macierzy oraz zmniejszenie liczby lub też uszkodzenie grzebieni mitochondrialnych, które stanowią jeden z morfologicznych objawów obrzęku mitochondriów i wiążą się z rozkojarzeniem fosforylacji oksydacyjnej. Interesujące wydaje się również występowanie w cytoplazmie neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego dość dużej ilości drobnoziarnistego materiału w postaci tzw. ciał jąderkopodobnych, których pochodzenie i znaczenie fizjologiczne jest ciągle jeszcze nie wyjaśnione. Przypuszcza się, że reprezentują one materiał prerybosomalny i mogą pojawiać się niekiedy w komórkach w warunkach stymulacji (Hindelang-Gertner i wsp., 1974; Gajkowska, 1974; Gajkowska, Borowicz, 1976). W naszym przypadku ich obecność jest trudna do interpretacji.

Obrazy ultrastrukturalne włókien nerwowej części przysadki wskazują również na zwolnienie wydzielania neurosekretu do krwiobiegu. Związane jest to zapewne z ich małą syntezą w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego lecz regulacja ich ilości może się odbywać również drogą granulolizy w autofagicznych wakuolach (Boudier, Picard, 1976), za czym przemawia obecność licznych struktur lizosomalnych i figur mielinowych w zakończeniach włókien nerwowej części przysadki. Na podstawie obserwacji przeprowadzonych w I grupie doświadczalnej można sądzić, że zmiany, które powstały w układzie pod-



wzgórzowo-przysadkowym w okresie życia płodowego i w pierwszych tygodniach życia są trwałe i utrzymują się jeszcze przez 2 miesiące po odstawieniu leku.

W II grupie doświadczalnej, w której zwierzęta urodzone z rodziców przewlekle zatrutowanych morfiną, były podobnie jak w grupie poprzedniej zatrutowane transłożyskowo, a ponadto w okresie laktacji i jeszcze przez okres 2 miesiące po odstawieniu od matki, stwierdzono również wystąpienie podobnych zmian w utrastrukturze układu podwzgórzowo-przysadkowego. Nasilenie tych zmian nie było już jednak tak znaczne jak w grupie poprzedniej i przebiegało w nieco innym kierunku. Prawidłowa budowa aparatu Golgiego sugerowała jego prawidłową funkcję, jednakże ilość dojrzałych ziarnistości neurosekrecyjnych w porównaniu z ilością ciał wielopęcherzykowych i lizosomów przemawiała za przestawieniem się układu GERL na wytwarzanie lizosomów i ciałek gęstych (Novikoff, 1964; Picard i wsp., 1972). Jednocześnie w niektórych włóknach płata nerwowego przysadki stwierdzono nieznacznie większą ilość ziarnistości neurosekrecyjnych w porównaniu z poprzednią grupą, przy braku morfologicznych objawów wydzielania tych ziarnistości z włókien nerwowych. W wielu włóknach obserwowano liczne figury mielinowe i struktury lizosomopodobne. Zambrano i De Robertis (1967) a także Dellmann i Rodriguez (1970) przypuszczają, że tego rodzaju włókna mogą ulegać procesom zwyrodnieniowym. Z ostatnich doniesień w piśmiennictwie wynika, że biorą one udział w regulacji wydzielania ziarnistości z włókien nerwowej części przysadki (Boudier, Picard, 1976).

Reasumując wyniki przeprowadzonych badań można przypuszczać o wytworzeniu się reakcji adaptacyjnej w układzie podwzgórzowo-przysadkowym młodego szczura na przewlekle podawanie morfiny. Wyniki te są zgodne z naszymi poprzednimi obserwacjami prowadzonymi na układzie podwzgórzowo-przysadkowym zwierząt dorosłych przewlekle zatrutowanych morfiną (Gajkowska, Borowicz, 1976). Mechanizm tolerancji morfiny powstający w wyniku przewlekłego podawania leku nie jest jeszcze zbyt dokładnie poznany, jakkolwiek wiele badań było poświęconych temu ważnemu problemowi. Wydaje się, że tolerancja powstaje w wyniku zmniejszenia ilości swoistych receptorów morfiny (Axelrod, 1956; Axelrod i wsp. (cyt. wg Vessel, 1972).

#### WNIOSKI

1. W układzie podwzgórzowo-przysadkowym szczura zatrutowanego morfiną w okresie rozwoju stwierdza się zmiany wskazujące na zmniejszenie syntezy i wydzielania ziarnistości neurosekrecyjnych.



2. Zmiany ultrastrukturalne dotyczące układu GERL w neuronach jądra nadwzrokowego i przykomorowego oraz włókien nerwowej części przysadki powstają w okresie życia płodowego i występują jeszcze po odstawieniu morfiny u dwumiesięcznych, młodych szczurów.

3. Podawanie morfiny w sposób ciągły od okresu życia płodowego aż do 2 miesięcy życia, powoduje wytworzenie się tolerancji na ten lek w układzie podwzgórzowo-przysadkowym młodych szczurów.

Б. Гайковска, А. Данелевич, Е. Борович

#### УЛЬТРАСТРУКТУРА ГИПОФИЗАРНО-ГИПОТАЛАМУСНОЙ СИСТЕМЫ КРЫСЫ, ОТРАВЛЕННОЙ МОРФИЕМ В ПЕРИОД РАЗВИТИЯ

##### Резюме

Исследованы ультраструктурные изменения в надзрительном и околожелудочковом ядре подбугорья и в нервной доле гипофиза молодых крыс: группа I — рожденных от родителей, отравлявшихся *Morphinum hydrochloricum* в дозе 5 мг/кг веса в течение 60 дней перед оплодотворением, и матери которых получали такую же дозу морфия в течение беременности; группа II — рожденных от родителей, отравлявшихся морфием в дозе 5 мг/кг веса в течение 60 дней перед оплодотворением, и матери которых получали морфий в той же самой дозе в течение беременности и лактации, а затем молодые крысы получали морфий подкожно в дозе 5 мг/кг в течение 2 месяцев. У животных обеих опытных групп обнаружено уменьшение синтеза и выделения нейросекрета. Изменения ультраструктуры гипофизарно-гипоталамусной системы более выражены у животных, отравляемых трансплацентарно, и сохраняются еще и через 2 месяца после прекращения введения лекарства. Введение морфия дополнительно еще в течение 2 месяцев после рождения вызывает возникновение устойчивости к этому лекарству.

B. Gajkowska, A. Danielewicz, J. Borowicz

#### ULTRASTRUCTURE OF HYPOPHYSEO-HYPOTHALAMIC SYSTEM OF THE RAT TREATED WITH MORPHINE DURING DEVELOPMENT

##### Summary

The study concerns the changes in fine structure of supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei and of the neurohypophysis of young rats. Two groups of rats were investigated: I group consisted of the offspring whose parent animals were administered Morphine hydrochloricum in a dose 5 mg/kg of body weight for 60 days before fertilization and whose mothers received the same dose of the drug during gestation period; II group was the offspring of animals treated as above and to whose mothers the drug was administered also during lactation.



The newborns of the II group received additionally s.c. 5 mg/kg of body weight of Morphine for 2 months.

In animals of both experimental groups the synthesis and neurosecretory function was diminished. The changes in fine structure of hypophyseal-hypothalamic system were more distinct in animals intoxicated only transplacentally; the changes persisted after drug withdrawal. The additional administration of Morphine for 2 months after birth effected in tolerance to the drug.

#### PISMIENICTWO

1. Axelrod J.: The enzymic cleavage of aromatic ethers. *Biochem. J.*, 1956, 63, 634.
2. Axelrod J., Schmid R., Itamaker L.: Cyt. wg Vessell E. S.: Individual variations in drug response. *Liver and drugs*. Eds: F. Orlandi, A. M. Jezeguel. Academic Press, London, New York, 1972.
3. Borowicz J., Gajkowska B.: Electron microscopic studies on the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat in acute morphine poisoning. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 209—215.
4. Borowicz J., Danielewicz-Kotowicz A., Maryniak R.: Electron microscopic changes in rat hypophysis induced by morphine. II Neurohypophysis. *Neuropat. Pol.*, 1976, 15, 1, 47—56.
5. Boudier J. A., Picard D.: Granulolysis in neurosecretory neurons of the rat supraoptico-posthypophyseal system. *Cell. Tiss. Res.*, 1976, 172, 39—58.
6. Dellmann H. D., Rodriguez: Herring bodies, an electron microscopic studies of local degeneration and regeneration of neurosecretory axons. *Z. Zellforsch.*, 1970, 3, 293—315.
7. Dodge P., Takemori A.: Changes in rat cerebral glycolytic intermediates in vivo after treatment with morphine, nalorphine or pentobarbital. *Biochem. Pharmacol.*, 1969, 18, 1873—1882.
8. Eidelberg E., Schwartz A. S.: Possible mechanism of action of morphine on brain. *Nature*, 1970, 225, 1172.
9. Florez J., Mc Carthy L., Borison H.: A comparative study in the cat of respiratory effects of morphine. *J. Pharmacol. exp. Therap.*, 1968, 163, 445—448.
10. Gajkowska B.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe jądra nadwzrokowego i przykomorowego podwzgórza mózgu szczura w niedoczynności nadnerczy. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 329—343.
11. Gajkowska B., Borowicz J.: Electron microscopic observation of supraoptic and paraventricular nuclei of the rat in chronic morphine poisoning and after drug withdrawal. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 363—370.
12. Hindelang-Gertner C., Stockel M. E., Porte A., Dellmann H. D., Madarasz B.: Hematosomes or nucleus-like bodies in hypothalamic neurons, the subfornical organ and adenohypophysial cells of the rat. *Cell Tiss. Res.*, 1974, 155, 211—219.
13. La Du B. N., Mandel H. G., Way E. L.: *Fundamentals of drug metabolism and drug deposition*. Williams, Williams Co., Baltimore 1971.
14. Novikoff B. A.: GERL, its form and function in neurones of rat spinal ganglia. *Biol. Bull.*, 1964, 127, 358.



15. Picard D., Michelebechet M., Athouel A., Rua S.: Granules neurosecretaires, lysosomes et complex GERL dans le noyau supra-optique du rat. Bipolarite des complexes golgiens. *Exp. Brain. Res.*, 1972, 14, 331—353.
16. Shute E., Davis E.: Effect on the infant of morphine administered. *Lab. Surg. Gynec. Obst.*, 1933, 57, 727—736.
17. Takemori A.: Effects of central depressant agents on cerebral G-6-P-dehydrogenase activity of rats. *J. Neurochem.*, 1965, 12, 407—415.
18. Zambrano D., De Robertis E.: Ultrastructural changes in the neurohypophysis after destruction of the paraventricular nuclei in normal and castrated rats. *Z. Zellforsch.*, 1968, 88, 496—510.

Adres autorów: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.



## OCENA KSIĄŻKI

J. T. Hughes: *PATHOLOGY OF THE SPINAL CORD*. Second Edition. Lloyd-Luke. London 1978. Str. 257. Ryc. 74.

Patologia rdzenia kręgowego zajmuje stosunkowo najmniej miejsca w podręcznikach patomorfologii ośrodkowego układu nerwowego. Skąpe na ogół wiadomości dotyczące zmian patologicznych w rdzeniu kręgowym rozsiiane są w odpowiednich rozdziałach poręczników neuropatologii, a odrębne opracowania poświęcone tej części układu nerwowego są bardzo nieliczne. Ukazanie się w roku 1966 monografii J. T. Hughesa pt. „Pathology of the spinal cord”, zawierającej zwięzłe, a równocześnie wszechstronne i bogate opracowanie podstawowych wiadomości z dziedziny patomorfologii rdzenia stanowiło bardzo cenne uzupełnienie piśmiennictwa neuropatologicznego. W roku 1978 ukazało się drugie wydanie książki rozszerzone i uzupełnione we wszystkich tych działach, które uległy wzbogaceniu w okresie 10 lat dzielących od pojawienia się wydania pierwszego.

Po wprowadzeniu, zawierającym omówienie podstawowych odczynów patologicznych komórkowych elementów rdzenia kręgowego, w kolejnych rozdziałach autor omawia praktycznie wszystkie rodzaje procesów patologicznych występujących w rdzeniu, zarówno tych, które stanowią jedyny lub wiodący element procesu chorobowego, jak i tych, które są rdzeniowym eksponentem zmian obejmujących cały ośrodkowy układ nerwowy, jak wreszcie i tych, które wtórnie towarzyszą nieneurologicznej patologii ogólnoustrojowej lub miejscowej. Szczególnie cennym elementem opracowania są uzupełnienia danych z zakresu patologii, informacjami dotyczącymi prawidłowych stosunków anatomicznych i czynnościowych. Odnosi się to zwłaszcza do zagadnień rozwoju rdzenia kręgowego, jego unaczynienia oraz jego topografii uwarunkowanej biomechaniką kręgosłupa. Stałe odnośnienie procesu patologicznego toczącego się w rdzeniu do stosunków anatomicznych i przestrzennych jego otoczenia stanowi rys znamieny całego opracowania. Niezmiernie wartościowym rozdziałem książki jest część poświęcona patologii kręgosłupa, pozwalająca na precyzyjne wyjaśnienie patomechanizmu wtórnych uszkodzeń rdzenia, zwłaszcza w przypadkach urazów, zmian zwyrodnieniowych i nowotworów kręgosłupa.

W prezentacji poszczególnych zespołów i jednostek chorobowych autor nie ogranicza się wyłącznie do opisu morfologicznego, makroskopowego i mikroskopowego, omawia również zwięzłe informacje dotyczące etiologii i patomechanizmu choroby oraz uzupełnia je, co uważam za szczególnie cenne, danymi obrazu klinicznego. Niekiedy przytacza opis poszczególnych przypadków.

Poszczególne rozdziały książki są nierówne w stopniu szczegółowości i wszechstronności opisu. Znacznie bogaciej i szerzej potraktowane są w sposób zamierzony, te rozdziały patologii rdzenia, z którymi neurolog i neuropatolog spotykają się częściej, lub w których autor ma większe osobiste doświadczenie. Wieloletnie doświadczenia dr J. T. Hughesa jako patomorfologa w Stroke Mandaville Hospital w Aylesbury, współpracującego z National Spinal Injury Centre, znajdują swoje niewątpliwie odzwierciedlenie w szerokim omówieniu urazów rdzenia kręgowego i zmian rdzeniowych w przebiegu patologii kręgosłupa. To samo dotyczy naczyniopochodnych uszkodzeń rdzenia. W tej dziedzinie dr J. T. Hughes ma bardzo bogaty własny dorobek piśmienniczy. Bogato omówione są procesy zapalne rdzenia, zwłaszcza w grupie zapaleń grzybiczych i pasożytniczych, oraz zmiany wywołane przez czynniki toksyczne i niedoborowe, skromniej natomiast choroby demielinizacyjne, zwyrodnienia układowe i nowotwory.

Każdy z rozdziałów uzupełnia bogaty spis piśmiennictwa, obejmującego zarówno pozycje najnowsze, jak i dawne, niejednokrotnie o znaczeniu historycznym.

cd. na str. 496



ANDRZEJ LOESCH, AGNES DANIELEWICZ, JERZY W. BOROWICZ

OBRAZ MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY  
UKŁADU NEUROSEKRECYJNEGO  
W ZABURZENIACH OSMOTYCZNYCH U SZCZURA

Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN

Kierownik Pracowni: doc. dr hab. med. J. W. Borowicz

Zmiany wodno-elektrolitowe płynów ustrojowych oddziałują bezpośrednio na czynność gruczołów wydzielania wewnętrznego. Zmiany stężenia jonów  $H^+$  uruchamiają wtórną regulację hormonalną i nerwową, modyfikując pierwotne zmiany metaboliczne. W prawidłowych warunkach płyny ustrojowe są elektroobojętne, uwarunkowane równą ilością kationów i anionów (Kokot, 1976). W regulacji izosmolalności bierze udział wazopresyna. Wzrost osmolalności osocza już o 2% zwiększa poziom wazopresyny we krwi (Kokot, 1976), powodując jednocześnie zmniejszenie zawartości hormonów w tylnym płacie przysadki (Lederis, 1962; Sloper i King, 1963). Nawadnianie organizmu prowadzi natomiast do nagromadzenia neurosekretu w szlaku podwzgórzowo-przysadkowym, prawdopodobnie hamując jego wydzielanie z przysadki (Feudler i wsp., 1969). Hypermolalność płynów ustrojowych, która jest wynikiem zarówno śród-, jak i pozakomórkowego niedoboru wolnej wody, manifestuje się głównie objawami ze strony ośrodkowego układu nerwowego, układu krążenia oraz błon śluzowych. Nasilenie poszczególnych objawów przy odwodnieniu organizmu może być różne. Są one bardziej nasilone przy szybkim odwodnieniu, natomiast słabiej w przypadku powoli narastającego ujemnego bilansu wodnego.

Badania Livingstona (1973) oraz Choya i Watkinsa (1977) nad wpływem osmotyczności płynów ustrojowych na układ neurosekrecyjny należą do nielicznych prac ostatnio opublikowanych na ten temat.

Celem pracy była morfologiczna ocena podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego u szczurów z wolno rozwijającym się

---

Praca wykonana w ramach problemu węzłowego PAN 10.4.2.01.3.5.

ujemnym bilansem wodnym i następnie pojonych wodą destylowaną lub płynem Ringera.

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia wykonano w miesiącach wiosennych na 72 szczurach samcach szczepu Wistar z hodowli losowej. Zwierzęta zostały całkowicie pozbawione wody do picia przez 4 dni (36 szczurów — grupa I) lub 7 dni (36 szczurów — grupa II). Następnie 16 zwierząt w każdej z tych grup dostało do picia *ad libitum* wodę destylowaną (grupy I/H, II/H), a 16 — płyn Ringera (grupy I/R, II/R). Pozostałe, nie pojone zwierzęta stanowiły kontrolę. Wszystkie zwierzęta ważono przed rozpoczęciem doświadczenia, po 4 i 7 dniach odwodnienia oraz po 3, 12, 24 i 48 godzinach od chwili podania płynów. W każdym z wymienionych okresów 4 szczury z każdej grupy dekapitowano. Do badań w mikroskopie elektronowym pobrano wycinki z jądra nadwzrokowego i przykomorowego podwzgórza oraz z płata nerwowego przysadki. Wycinki utrwalano w 2% aldehydzie glutarowym i 1% OsO<sub>4</sub>, następnie odwadniano w alkoholach i zatopiono w Eponie 812. Ultracienkie skrawki kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonano w mikroskopie elektronowym JEM-7A.

#### WYNIKI

##### *Stan somatyczny zwierząt*

Grupa I i II. Od chwili pozbawienia zwierząt wody do picia początkowo zanotowano jedynie stały spadek ciężaru ciała. Średnio wynosił on 27% oraz 31% odpowiednio po 4 i 7 dniach (tabela 1). Między 4 a 7 dniem doświadczenia szczury jadły niechętnie, były mało ruchliwe i z opóźnieniem reagowały na bodźce akustyczne i dotykowe.

Grupa I/H i I/R. Po 4 dniach odwodnienia i podaniu wody destylowanej do picia obserwowano stopniowy przyrost ciężaru ciała zwierząt. Po 48 godzinach nawadniania ich waga ciała zbliżona była do wyjściowej. Ciężar ciała zwierząt pojonych płynem Ringera początkowo wzrastał a potem ulegał znacznemu obniżeniu (tabela 1). Ogólny stan zwierząt, którym podano wodę destylowaną wydawał się prawidłowy. Natomiast szczury pojone płynem Ringera były mało ruchliwe. Po kilku godzinach od chwili podania płynu Ringera miały zaczerwienione, łzawiące spojówki.

Grupa II/H i II/R. Po 7 dniach pozbawienia wody zarówno zwierzęta, którym podano wodę destylowaną jak i te, którym podano płyn



Tabela 1. Średni ciężar ciała w procentach wagi wyjściowej

Table 1. Mean percent of body weight at the beginning of experiment

Grupy dośw. Exp. groups	Po odwodnieniu After dehydration	Czas pojenia (godz.) Administration of fluids (hrs)			
		3	12	24	48
I	73 (36)*	—	—	—	—
I/H	—	81 (16)	93 (12)	95 (8)	98 (4)
I/R	—	92 (16)	92 (12)	79 (8)	80 (4)
II	69 (36)	—	—	—	—
II/H	—	79 (16)	91 (12)	81 (8)	92 (4)
II/R	—	80 (16)	91 (12)	83 (8)	80 (4)

\*) W nawiasach podano liczbę zwierząt  
In parentheses number of animals

Ringera wykazywały wahania wagi ciała (tabela 1). Podobnie jak w poprzedniej grupie początkowo nastąpił znaczny przyrost ciężaru ciała a po 24 godzinach jego spadek. Po dwóch dobach pojenia, waga ciała zwierząt znów się zwiększyła nie osiągając jednak wartości początkowej. Zwierzęta pojone wodą destylowaną po paru godzinach stawały się ruchliwe, węszyły i reagowały na bodźce zewnętrzne. Zwierzęta pobierające płyn Ringera pozostawały ospałe a ich sierść matowiała. Spojówki oczu stawały się czerwone i łzawiące. Niektóre zwierzęta pojone płynem Ringera ginęły już po upływie pierwszej doby.

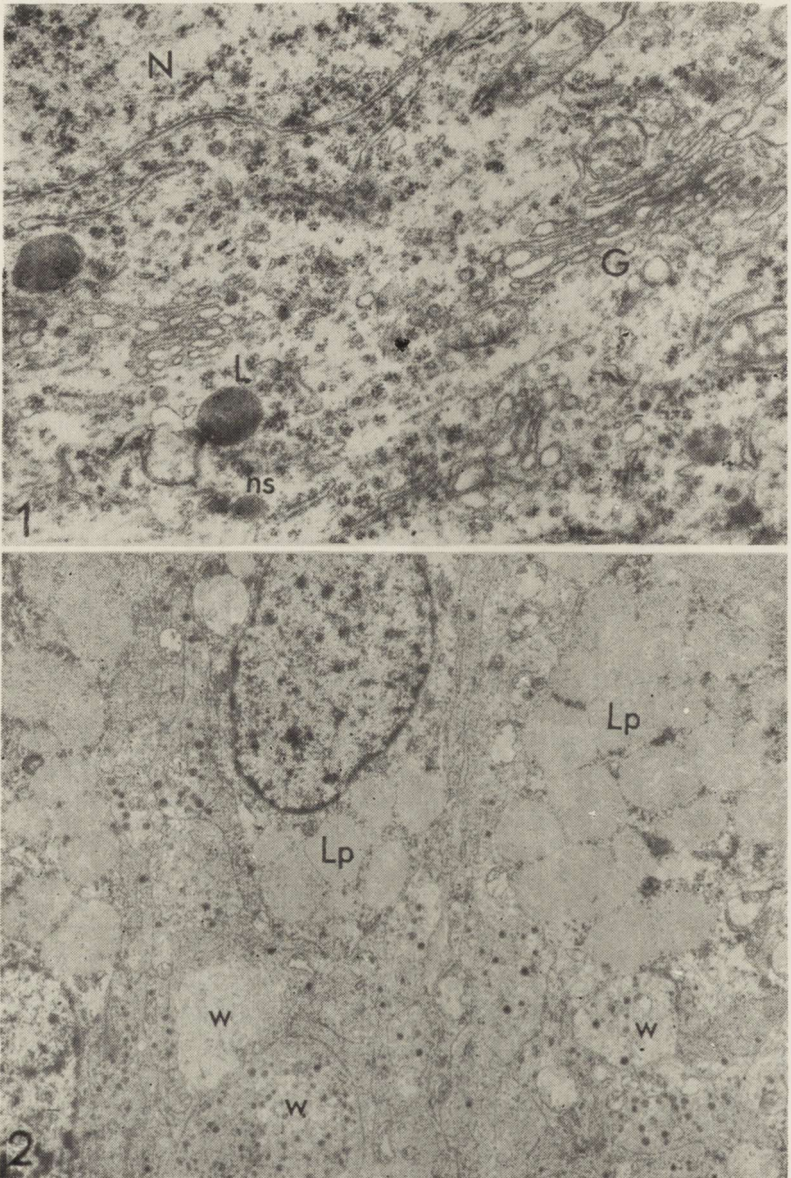
### Obraz mikroskopowo-elektronowy

#### Zwierzęta w przebiegu odwodnienia (grupa I i II).

Po 4 i 7 dniach odwodnienia obraz morfologiczny badanych struktur był podobny.

1. Jądro nadwzrokowe i przykomorowe. W neuronach stwierdzono zwiększoną aktywność neurosekrecyjną. Dobrze rozwinięty aparat Golgiego składał się z licznych kanałów, często poszerzonych oraz drobnych pęcherzyków. Niekiedy pęcherzyki te zawierały gęsty elektronowo materiał i prawdopodobnie odpowiadały tworzącym się ziarnistościom neurosekrecyjnym. Poza nowo powstającymi ziarnistościami występowały ich dojrzałe formy. Siatka śródplazmatyczna szorstka miała postać krótkich, niekiedy poszerzonych kanałów. W cytoplazmie występowały liczne lizosomy (ryc. 1).

2. Płat nerwowy przysadki. Zwiększone wydzielanie neurosekretu przejawiało się zmniejszeniem liczby ziarnistości i obecnością pustych pęcherzyków we włóknach nerwowych. Niektóre włókna pozbawione były ziarnistości sekrecyjnych, natomiast obficie występowały mikropęcherzyki. W pituicytach aparat Golgiego był słabo rozwinięty. W całym obszarze cytoplazmy występowały drobne skupienia rybo-



*Ryc. 1.* Jądro przykomorowe, 7 dni odwodnienia. Dobrze rozwinięty aparat Golgiego (G), pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne (ns) oraz lizosomy (L). Jądro komórki (N). Pow. 21 000 ×.

*Fig. 1.* Nucleus paraventralis, 7 days of dehydration. Well developed Golgi apparatus (G), single neurosecretory granules (ns) and lysosomes (L). Cell nucleus (N). × 21 000

*Ryc. 2.* Płat nerwowy przysadki, 7 dni odwodnienia. Ubytek ziarnistości neurosekrecyjnych we włóknach (w), nagromadzenie kropli lipidów (Lp) w pituicytach. Pow. 4 200 ×

*Fig. 2.* Neurohypophysis, 7 days of dehydration. Loss of neurosecretory granules in processes (w), accumulation of lipid droplets (Lp) in pituicytes. × 4 200



somów oraz niewielkie okrągłe mitochondria. W pobliżu jądra komórkowego gromadziły się krople lipidów w różnej ilości zwykle ciasno przylegające do siebie (ryc. 2).

*Zwierzęta w przebiegu pojenia wodą destylowaną (grupa I/H i II/H)  
lub płynem Ringera (grupa I/R i II/R)*

1. **Jądro nadwzrokowe i przykomorowe.** Po 3 godzinach od chwili podania zarówno wody destylowanej jak i płynu Ringera nie stwierdzono wyraźnych zmian w budowie neuronów sekrecyjnych. Aparat Golgiego był dobrze rozwinięty. Składał się z poszerzonych kanałów oraz licznych pęcherzyków. Ziarnistości neurosekrecyjne występowały w perikarionach, jak również pęcherzyki opłaszczone, ciała wielopęcherzykowe oraz lizosomy. Siatkę śródplazmatyczną szorstką tworzyły krótkie, czasem poszerzone kanały. W niektórych włóknach nerwowych w sąsiedztwie neuronów sekrecyjnych występowały nieliczne ziarnistości elementarne.

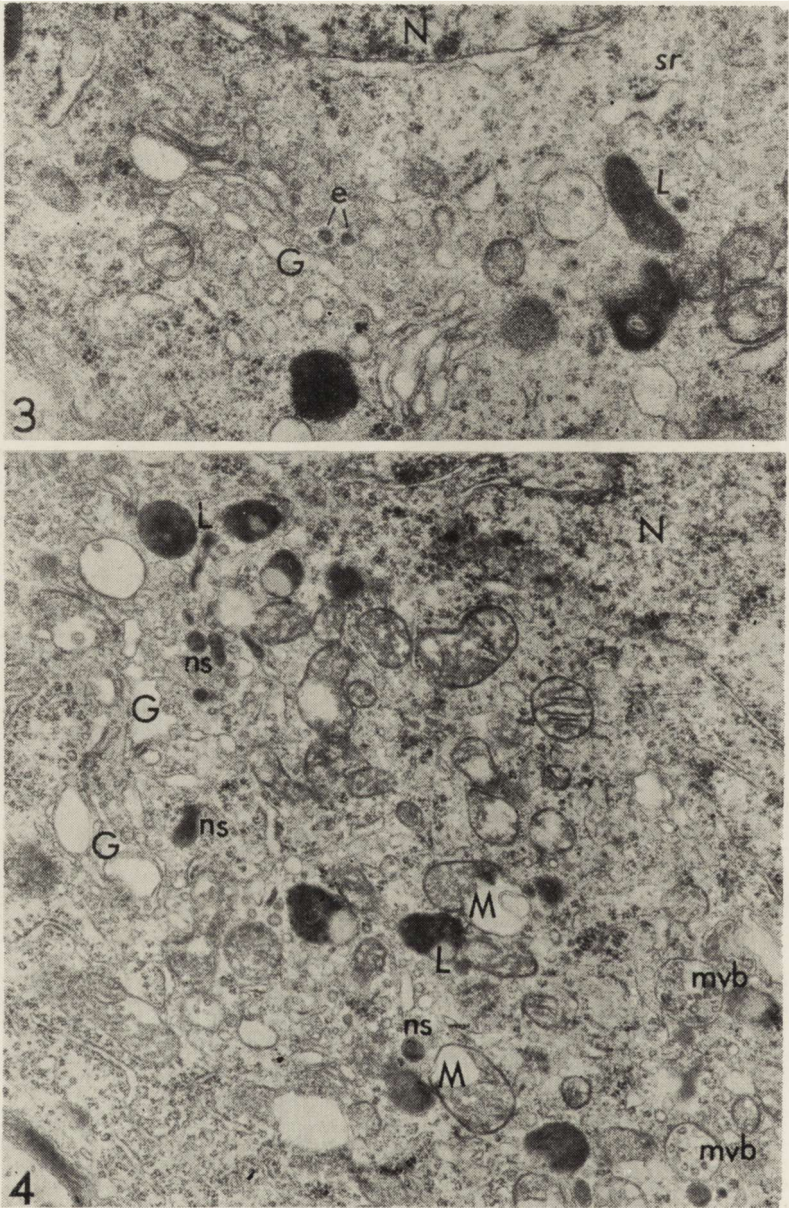
Po 12 godzinach pojenia zwierząt wodą destylowaną neurony sekrecyjne wykazywały podobną budowę do obserwowanych po 3 godzinach pojenia. Natomiast w neuronach sekrecyjnych zwierząt pojonych płynem Ringera nastąpiło wyraźne zwiększenie wytwarzania neurosekretu. Następowало poszerzenie światła struktur Golgiego. Zmianom tym towarzyszyła obfitość tworzących się ziarnistości elementarnych. Jednocześnie obserwowano zwiększoną liczbę gęstych ciał lizosomalnych (ryc. 3).

Po 24 godzinach obraz morfologiczny neuronów sekrecyjnych w obu grupach zwierząt był taki sam jak po 12 godzinach.

Po 48 godzinach nawadniania wodą destylowaną nie stwierdzono dalszych wyraźnych zmian w budowie aparatu Golgiego. W cytoplazmie widoczne były pojedyncze ziarnistości sekrecyjne, ciała wielopęcherzykowe i lizosomy. Natomiast w materiale zwierząt pojonych płynem Ringera neurony sekrecyjne podwzgorza w dalszym ciągu wykazywały cechy zwiększonej produkcji neurosekretu. Ponadto występowało znaczne poszerzenie światła kanałów aparatu Golgiego i zwiększenie ilości rybosomów w całym obszarze cytoplazmy. Jednocześnie obserwowano zwiększoną ilość ziarnistości neurosekrecyjnych, ciał wielopęcherzykowych oraz lizosomów występujących zazwyczaj w pobliżu obrzmiałych mitochondriów (ryc. 4).

2. **Płatek nerwowy przysadki.** Po 3 godzinach od chwili podania zarówno wody destylowanej jak i płynu Ringera stwierdzono we włóknach płata nerwowego przysadki zmniejszoną ilość ziarnistości sekrecyjnych. Niektóre włókna pozbawione były ziarnistości, obfitowały natomiast w mikropęcherzyki. Ponadto wiele włókien wykazywało





*Ryc. 3.* Jądro przykomorowe, 12 godz. po podaniu płynu Ringera. Rozbudowana strefa Golgiego (G), liczne ziarnistości elementarne (e) oraz lizosomy (L). Poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej szorstkiej (sr). Jądro komórki (N). Pow. 28 000 ×

*Fig. 3.* Nucleus paraventricularis, 12 h after administration of Ringer solution. Developed Golgi zone (G), numerous elementary granules (e) and lysosomes (L). Dilated channels of rough endoplasmic reticulum (sr). Cell nucleus (N). × 28 000



cechy zwyrodnienia. Miały one nieregularny kształt i wielkość, brak w nich było prawidłowo wykształconych neurotubuli, zawierały natomiast drobnoziarnisty materiał, pojedyncze ziarnistości neurosekrecyjne, puste, dość szerokie wakuole oraz liczne figury mielinowe (ryc. 5). W pituicytach w całym obszarze cytoplazmy siatka śródplazmatyczna szorstka była słabo rozwinięta. Obok niewielkich okrągłych mitochondriów obserwowano wydłużone mitochondria. Krople lipidów występowały w różnej ilości. U zwierząt pojonych płynem Ringera mniej było ziarnistości sekrecyjnych we włóknach, natomiast cechy ich zwyrodnienia były bardziej nasilone.

Po 12 godzinach ilość ziarnistości sekrecyjnych we włóknach nadal utrzymywała się na tym samym poziomie bez względu na rodzaj podawanego płynu. Obserwowano liczne puste pęcherzyki. Ponadto wiele włókien wykazywało cechy zwyrodnienia (ryc. 6). W cytoplazmie pituicytów zwierząt pojonych płynem Ringera, w okolicy rozwiniętego aparatu Golgiego obserwowano liczne ziarnistości osmofilne. Często ten obszar cytoplazmy pozostawał w kontakcie z aksonem neurosekrecyjnym (ryc. 7).

Po 24 godzinach od podania wody destylowanej i płynu Ringera jedynie część włókien nerwowych wypełniła się ziarnistościami. Obserwowano włókna o cechach zwyrodnienia, podobnie jak po 3 i 12 godzinach. Cytoplazma pituicytów była obfita, a aparat Golgiego dobrze rozwinięty. Zwiększała się ilość drobnych skupień rybosomów. W grupie zwierząt pojonych płynem Ringera, w cytoplazmie pituicytów obserwowano ponadto ziarnistości osmofilne, a liczne mitochondria wykazywały cechy obrzmienia (ryc. 8).

Po 48 godzinach, w obu grupach nie zaobserwowano wyraźnych zmian w stosunku do okresu poprzedniego, poza nieznacznym zwiększeniem liczby ziarnistości we włóknach płata nerwowego u zwierząt pojonych wodą destylowaną.

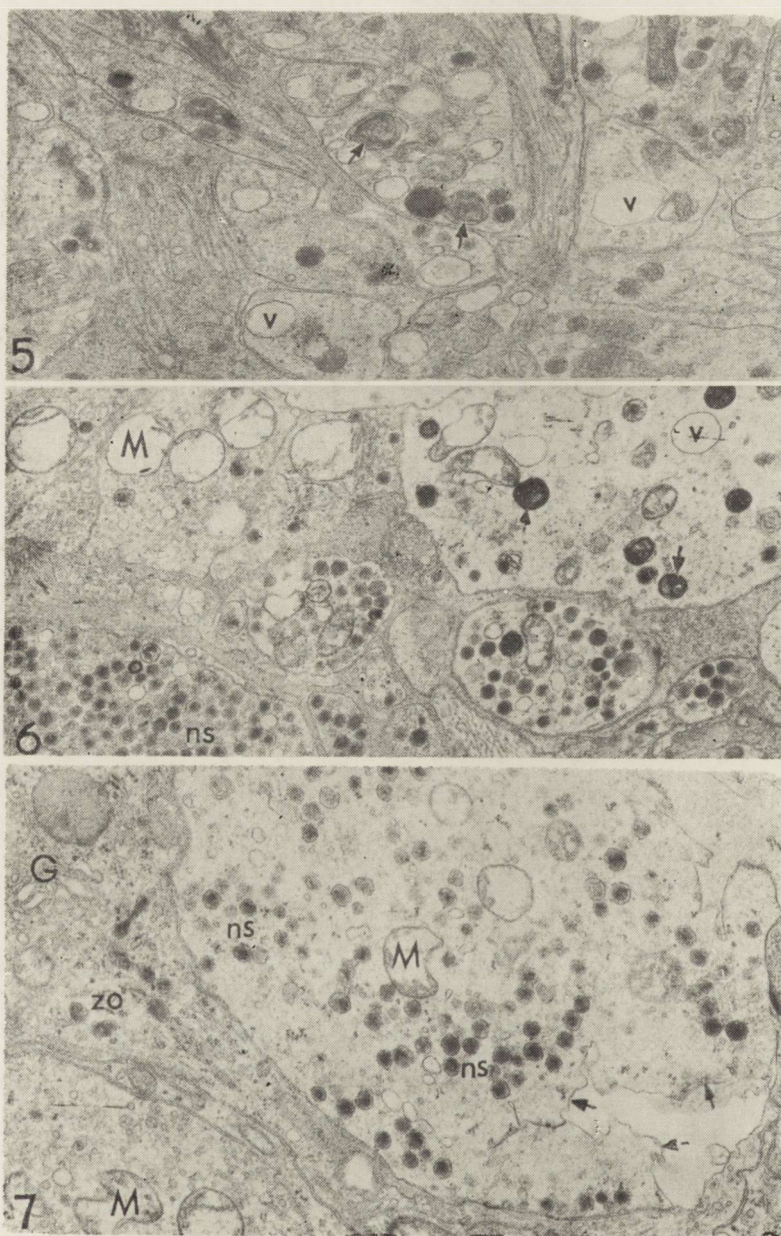
#### OMÓWIENIE

Otrzymane wyniki wskazują, że odwodnienie zwiększa aktywność sekrecyjną neuronów jąder nadwzrokowych i przykomorowych pod-

---

*Ryc. 4.* Jądro nadwzrokowe, 48 godz. po podaniu płynu Ringera. Znaczne poszerzenie światła kanałów aparatu Golgiego (G). Liczne ziarnistości neurosekrecyjne (ns), ciała wielopęcherzykowe (mvb), lizosomy (L) oraz mitochondria (M) o cechach obrzęku. Jądro komórki (N). Pow. 13 800 ×

*Fig. 4.* Nucleus supraopticus, 48 h after administration of Ringer solution. Significant dilation of the lumen of Golgi apparatus (G). Numerous neurosecretory granules (ns), multivesicular bodies (mvs), lysosomes (L) and swollen mitochondria (M). Cell nucleus (N). × 13 800



Ryc. 5. Płat nerwowy przysadki, 3 godz. po podaniu płynu Ringera. Zmniejszona ilość ziarnistości neurosekrecyjnych we włóknach. Cechy zwyrodnienia włókien; nieregularny kształt, puste wakuole (v) oraz figury mielinowe (strzałka).  
Pow. 15 200 ×

Fig. 5. Neurohypophysis, 3 h after administration of Ringer solution. Decreased amount of neurosecretory granules in the processes. The features of nerve fibers degeneration; irregular shape, empty vacuoles (v), and myelin bodies (arrow) × 15 200



wzgórze u szczurów, co wyraża się powiększeniem aparatu Golgiego oraz zwiększeniem tworzących się ziarnistości sekrecyjnych i ciał wielopęcherzykowych. Wzmóżonej produkcji ziarnistości w podwzgórze towarzyszy zwiększone wydzielanie neurosekretna z płata nerwowego przysadki z ubytkiem ziarnistości oraz występowaniem licznych mikro-pęcherzyków we włóknach. Podobne objawy obserwowali Boudier i wsp. (1970), Cotte i Picard (1970), Danielewicz-Kotowicz (1975).

Po podaniu płynu Ringera lub wody destylowanej stopniowo zwiększała się liczba lizosomów w neuronach, ale tylko pod wpływem płynu Ringera obserwowano również wzmóżone wytwarzanie ziarnistości neurosekrecyjnych. Równoczesne narastanie liczby ziarnistości sekrecyjnych i lizosomów, opisane jako zjawisko tzw. „synchronizacji funkcjonalnej” (Picard i wsp., 1972) wskazuje według Smith i Farquhar (1966) na udział lizosomów w procesie neurosekrecji.

Jądro nadwzrokowe i przykomorowe uczestniczyły równocześnie w procesie neurosekrecji. Podanie wody destylowanej powodowało wyrównanie poziomu ich aktywności sekrecyjnej a podanie płynu Ringera zwiększenie tej aktywności. Choy i Watkins (1977) sądzą, że hipertoniczne odwodnienie organizmu prowadzi do koncentracji hormonów w neuronach podwzgórze a liczba neuronów zawierających hormony zależy od czasu trwania odwodnienia. Ci sami autorzy na podstawie wyników badań immunocytochemicznych uważają, że jądra nadwzrokowe i przykomorowe są funkcjonalnie nie do odróżnienia i oba zawierają zarówno neurony wazopresynowe jak oksytocynowe.

Stwierdzona po 24 godzinach zwiększona ilość ziarnistości sekrecyjnych we włóknach płata nerwowego przysadki zwierząt pojonych wodą destylowaną jest zgodna z wynikami badań Boudier (1974). Natomiast już od pierwszych godzin podawania zarówno wody destylowanej jak

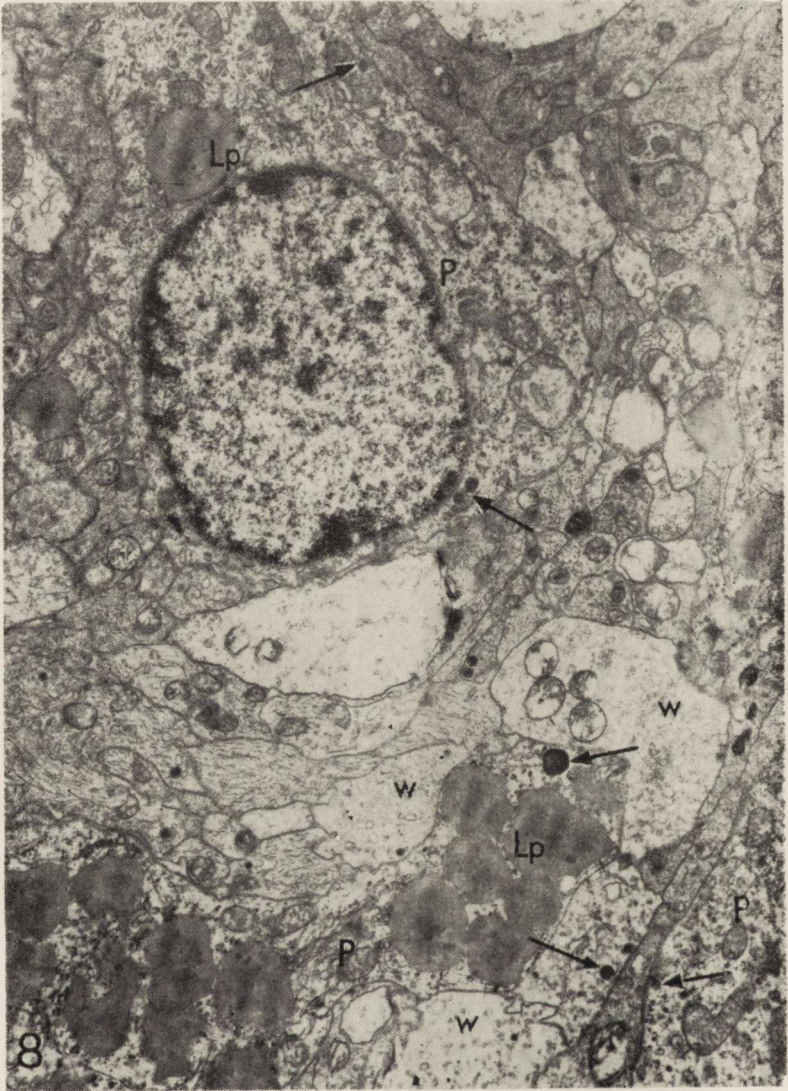
*Ryc. 6.* Płat nerwowy przysadki, 12 godz. po podaniu wody destylowanej. Część aksonów wypełniona ziarnistościami neurosekrecyjnymi (ns). Niektóre włókna zawierają optycznie puste wakuole (v), figury mielinowe (strzałka) oraz mitochondria (M) o cechach obrzęku. Pow. 9 500 X

*Fig. 6.* Neurohypophysis, 12 h after administration of distilled water. Some axons filled with neurosecretory granules (ns), some contain optically empty vacuoles (v), myelin bodies (arrow), and swollen mitochondria (M). X 9 500

*Ryc. 7.* Płat nerwowy przysadki, 12 godz. po podaniu płynu Ringera. Fragment dwóch neuronów neurosekrecyjnych o cechach zwyrodnienia; obkurczenie akso-plazmy (strzałka), obrzęk mitochondriów (M). Między aksonami widoczny fragment pituicyta z ziarnistościami osmofilnymi (zo) podobnymi do ziarnistości sekrecyjnych (ns) włókna sąsiadującego z komórką. Pow. 13 800 X

*Fig. 7.* Neurohypophysis, 12 h after administration of Ringer solution. Fragment of 2 degenerating neurosecretory neurons; shrunken axoplasm (arrow), swollen mitochondria (M). Between axons a fragment of pituicyte with osmophilic granules (zo) similar to secretory granules (ns) in the neighboring fiber. X 13 800





Ryc. 8. Płat nerwowy przysadki, 24 godz. po podaniu płynu Ringera. Cytoplazma pituicytów (P) obfituje w struktury komórkowe, obecne ziarnistości osmofilne (strzałka). Włókna nerwowe (w) pozbawione ziarnistości neurosekrecyjnych. Liczne krople lipidów (Lp) we fragmencie jednego z pituicytów. Pow. 7 700 ×

Fig. 8. Neurohypophysis, 24 h after administration of Ringer solution. Cytoplasm of pituicytes (P) filled with abundant organelles and osmophilic granules (arrow). Nerve fibers (w) deprived of neurosecretory granules. Numerous lipid droplets (Lp) in the fragment of pituicyte. × 7 700

i płynu Ringera występowały w przedstawionym materiale włókna z cechami zwyrodnienia, bardziej nasilonymi u zwierząt pojonych płynem Ringera. Podobne wyniki otrzymał Livingston (1973), który uważa,



że zwyrodnienie włókien nerwowych w przysadce jest następstwem wydzielenia z nich hormonu. U zwierząt pojonnych płynem Ringera w ciągu całego okresu doświadczenia liczne włókna były pozbawione ziarnistości neurosekrecyjnych. Choy i Watkins (1977) przypuszczają, że podczas hyperosmotycznej stymulacji szybkość wytwarzania neurosekretu w neuronach podwzgórza jest nieproporcjonalnie mniejsza w stosunku do szybkości przepływu aksonalnego.

Zmiany zaobserwowane w pituicytach wskazują na szczególny udział tych komórek w procesach metabolicznych płata nerwowego przysadki. W okresie pozbawienia zwierząt wody do picia i w pituicytach cytoplazma jest obfita. Wzrasta ilość siatki śródplazmatycznej szorstkiej, podczas gdy aparat Golgiego jest miernie rozwinięty. Podobne objawy obserwował Krsulovic i wsp. (1970).

Po podaniu płynu Ringera w pituicytach następuje rozbudowa strefy Golgiego. Jednocześnie w całej cytoplazmie rozmieszczona jest zmienna liczba kropli lipidów. W partiach obwodowych cytoplazmy występują osmofilne ziarnistości, które budową przypominają ziarnistości neurosekrecyjne. Występowanie tych ziarnistości w pituicytach u zwierząt pojonnych płynem Ringera może pośrednio przemawiać za udziałem tych komórek w procesach regulujących aktywność sekrecyjną w określonych stanach fizjologicznych organizmu. W bezpośredniej łączności z błoną pituicytów pozostawały liczne włókna wypełnione mikropecherzykami. Rufener i Dreifuss (1970) przypuszczają, że te mikropecherzyki zawierają acetylocholinę lub inny mediator i wpływają na czynność pituicytów. Krsulovic i wsp. (1970) sądzą, że ziarnistości osmofilne mogą być przeniesione z zakończeń nerwowych do cytoplazmy pituicytów na drodze mikropinocytozy (ultrafagocytozy) lub też poprzez system enzymów nośnikowych. Autorzy ci na podstawie badań autoradiograficznych wykazali odwrotną zależność pomiędzy ilością materiału sekrecyjnego w zakończeniach nerwowych a ilością i wielkością osmofilnych ziarnistości w obrębie cytoplazmy pituicytów.

Istnieją dwa poglądy dotyczące roli pituicytów. Hartmann (1958) uważa, że spełniają one tę samą rolę co komórki gęłowe. Inni autorzy przypisują im funkcję związaną z aktywnością sekrecyjną (Ortmann, 1951; Kurosumi i wsp., 1964), co byłoby zgodne z obecnymi spostrzeżeniami.

Płyny ustrojowe nie są jedynym czynnikiem, który wywiera wpływ na metabolizm komórek ustroju (Weisz, 1969). Jak się wydaje, głównym czynnikiem kontrolującym to działanie jest ośrodkowy układ nerwowy. Dlatego też w badaniach dotyczących czynników stabilizujących przemiany ustrojowe, istotnym uzupełnieniem byłaby ocena ultrastruktury

synaps w układzie neurosekrecyjnym podwzgórzowo-przysadkowym w stanach zaburzenia gospodarki wodno-elektrolitowej. Zagadnienie to jest przedmiotem badań jednego z autorów tej pracy.

#### WNIOSKI

1. Hypertoniczne odwodnienie szczurów pobudza aktywność sekrecyjną neuronów jądra nadwzrokowego i przykomorowego podwzgórza, której towarzyszy ubytek ziarnistości we włóknach płata nerwowego przysadki.

2. Woda destylowana wyrównuje aktywność neuronów sekrecyjnych w obu jądrach podwzgórza powodując jednocześnie stopniowe gromadzenie neurosekretu we włóknach płata nerwowego przysadki, czemu towarzyszą objawy zwyrodnienia włókien.

3. Płyn Ringera podwyższa aktywność neuronów sekrecyjnych podwzgórza utrzymując jednocześnie nieznaczną ilość ziarnistości neurosekrecyjnych we włóknach płata nerwowego przysadki, czemu towarzyszą cechy zwyrodnienia włókien. Można przypuszczać, że w tym procesie pewną dotychczas nie wyjaśnioną rolę odgrywają pituicyty.

4. Na podstawie otrzymanych wyników, korzystniejsze wydaje się podawanie do picia wody destylowanej niż płynu Ringera w przedstawionym modelu odwodnienia.

A. Loesch, A. Данелевич, Е. Борович

#### ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА НЕЙРОСЕКРЕТОРНОЙ СИСТЕМЫ ПРИ ОСМОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ У КРЫСЫ

#### Резюме

Исследовали электронно-микроскопическую картину надзрительного и околожелудочкового ядра подбугорья, а также нервной доли гипофиза крыс в ходе осмотических нарушений. Осмотические нарушения вызывали, не давая воды для питья в течение 4 и 7 дней, а затем давая для питья дистиллированную воду или жидкость Рингера. Морфологические исследования выполнялись непосредственно после окончания обезвоживания, а также через 4, 12, 24 и 48 часов от момента подачи жидкостей. Обезвоживание повышало секреторную активность нейронов в обоих ядрах подбугорья и вызывало уменьшение нейросекреторных зернистостей в волокнах нервной доли гипофиза. Наблюдала различия в электронно-микроскопической картине животных, поившихся дистиллированной водой и жидкостью Рингера. Дистиллированная вода выравнивала секреторную активность нейронов подбугорья, а жидкость Рингера повышала эту активность. После подачи как дистиллированной воды, так и жидкости Рингера в нервной доле гипофиза появлялись волокна с приз-



наками дегенерации, более сильными у животных, поившихся жидкостью Рингера.

Обращено внимание на возможную роль питуицитов в регуляции процесса нейросекреции.

A. Loesch, A. Danielewicz, J. W. Borowicz

## ELECTRON MICROSCOPIC PICTURE OF NEUROSECRETORY SYSTEM OF THE RAT DURING OSMOTIC DISTURBANCES

### Summary

Ultrastructural appearance of supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei and of the neurohypophysis in the rat in the course of osmotic disturbances was investigated. Osmotic disturbances developed after stopping the drinking water for 4 or 7 days followed by administration of distilled water or Ringer solution as the drinking fluids. Morphological investigations were performed immediately after cessation of dehydration and 4, 12, 24, 48 h after administration of fluids. Dehydration enhanced the secretory activity of neurons in both hypothalamic nuclei and effected in diminution of neurosecretory granules in neurohypophyseal nerve processes. Electron microscopic picture of tissue of rats given distilled water or Ringer solution differed. The administration of distilled water made even the secretory activity of hypothalamic neurons whereas the Ringer solution enhanced this activity. Administration of either of fluids resulted in degeneration of some neurohypophyseal nerve processes, more marked in animals drinking Ringer solution.

The authors consider the role of pituicytes in regulation of neurosecretory process as possible.

### PÍSMIENNICTWO

1. Boudier J. L., Boudier J. A., Picard D.: Ultrastructure du lobe posterieur de l'hypophyse du rat et ses modifications au course de l'exertion de vasopressine. *Z. Zellforsch.*, 1970, 108, 357—379.
2. Boudier J. A.: Autophagie du material neurosecretoire dans le lobe posterieur de l'hypophyse du rat au debut de la rehydratation. *C. C. Acad. Sc. Paris*, 1974, 278, 2959—2962.
3. Choy V. J., Watkins W. B.: Immunocytochemical study of the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Distribution of neurophisin, vasopressin and oxytocin in the normal and osmotically stimulated rat. *Cell Tiss. Res.*, 1977, 180, 467—490.
4. Cotte G., Picard D.: Les corps multivesiculaires des cellules neurosecretoire du noyau supra-optique du rat. *Bull. de L'Association des Anatomistes 55e Congres, Nancy 22—26 mars, 1970*, 147.
5. Danielewicz-Kotowicz A.: Zmiany mikroskopowo-elektronowe w przysadce szczura po adrenalectomii oraz po podaniu ACTH. II. Płat nerwowy przysadki. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 49—59.

6. Feudler K., Hefco V., Lissak K.: The effect of dehydration nad repeated water loading on the supraoptic-neurohypophyseoneurosecretory system and the ADH content of the neurohypophysis in the rat. *Acta physiologica*, 1969, 34, 285—293.
7. Hartmann J.: Electron-microscopy of the neurohypophysis in normal and histaminergic treated rats. *Z. Zellforsch.*, 1958, 48, 291—308.
8. Kokot F.: Gospodarka wodno-elektrolitowa i kwasowo-zasadowa w stanach fizjologii i patologii. PZWL, Warszawa, 1976.
9. Krsulovic J., Ermisch A., Sterba G.: Electron microscopic and autoradiographic study on the neurosecretory system of albino rats with special consideration of the pituicyte problem. W: *Aspect of neuroendocrinology*. Eds: Bargmann W., Scharrer B., Springer-Verlag Berlin—Heidelberg—New York, 1970.
10. Kurosumi K., Matsuzawa T., Kobayashi Y., Sato S.: On the relation between the release of neurosecretory substance and lipid granules of pituicyte in the rat neurohypophysis. *Gumma Symposium on Endocrinology*. Publ. Institute of Endocrinology, Gumma University, Maebashi, Japan, 1964, vol. 1.
11. Lederis K.: The distribution of vasopressin and oxytocin in hyperthalamic nuclei. W: *Neurosecretion*. Eds: H. Heller, R. B., Clark, Academic Press, New York, 1962.
12. Livingston A.: Ultrastructure of the rat neural lobe during recovery from hypertonic saline treatment. *Z. Zellforsch.*, 1973, 137, 361—374.
13. Ortmann R.: Über experimentelle Veränderungen der Morphologie des Hypophysen-Zwischenhirnsystems und die Beziehung der sog. „Gomorisubstanz“ zum Adiuretin. *Z. Zellforsch.*, 1951, 36, 92—140.
14. Picard D., Michel-Bechet M., Athouel A. M., Rua S.: Granules neurosecretaires, lysosomes et complex GRL dans le noyau Supraoptique du rat. *Bio-polarite des complexes Golgiens*. *Exp., Brain Res.*, 1972, 14, 331—353.
15. Rufener F., Dreiffus J. J.: Selective ZnIO-OsO<sub>4</sub> impregnation of synaptoid vesicles in the rat neurohypophysis. *Brain Res.*, 1970, 22, 402—405.
16. Sloper J. C., King C. B.: Activity and degeneration in secretory neurones of the hypothalamus and posterior pituitary of the rat. *J. Path.Bact.*, 1963, 86, 179.
17. Smith R. E., Farquhar M. G.: Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell. Biol.*, 1966, 31, 319—347.
18. Weisz P. B.: *Zarys Biologii*. PWN, Warszawa, 1969.

Adres autorów: Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk, 00-784 Warszawa, ul. Dworkowa 3.



DARIUSZ SITKIEWICZ, MARIA SKONIECZNA, ELŻBIETA ORŁOWSKA,  
WŁODZIMIERZ BICZ

THE EFFECT OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES ON THE  
OXIDATIVE PROCESSES IN RAT BRAIN MITOCHONDRIA. COM-  
PARATIVE STUDIES OF CHLORFENVINPHOS AND ITS CHEMICAL  
ANALOGS \*

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

Head: Prof. dr hab. med. W. Bicz

Recently we have shown that oxygen analog of Ronnel inhibits mitochondrial oxidoreducing enzymes and also uncouples oxidative phosphorylation in rat brain and liver mitochondria in vitro (Sitkiewicz 1975, 1977 and unpublished data). The effects were caused by the compounds containing aromatic ring and P = O but not P = S group. Several investigators have demonstrated that other insecticides — derivatives of chlorinated hydrocarbons: hexachlorphen and DDT caused in vitro uncoupling of oxidative phosphorylation (Cammer, Moore 1972; Byczkowski 1973). It has been reported that alkyl derivatives of organophosphates Dipterex and Dichlorvos did not affect the oxidative phosphorylation in mitochondria (Zalewska et al. 1977). These observations suggest that the uncoupling activity may be connected with the presence of chlorinated aromatic ring in molecule of insecticide.

The present investigation was designed to determine the effects of three other organophosphate insecticides on the oxidative phosphorylation and to check if this approach could add useful information for understanding the relationship between the chemical structure of insecticide and their capacity to affect the bioenergetic processes.

Chemical structure of the compounds used in this work is given in Fig. 1.

---

\* The work was supported by Polish Academy of Sciences. Research Programme No 10.4.2.02.3.4.

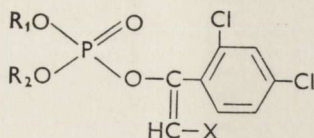


Fig. 1. Chemical structure and common name of insecticides used in experiments: Chlorfenwinfos (Birlane) X — Cl, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> — C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>; O,O-diethyl-2-chloro-1-/2,4-dichlorophenyl/-vinyl phosphate; IPO-62 (Ipfos) X — Br, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>—C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, O,O-die-  
thyl-2-bromo-1-/2,4-dichlorophenyl/-vinyl phosphate; IPO-63 (Polfos) X — Br, R<sub>1</sub>,  
R<sub>2</sub>—CH<sub>3</sub>, O,O-dimethyl-2-bromo-1-/2,4-dichlorophenyl/vinyl phosphate.

Ryc. 1. Struktura chemiczna i potoczne nazwy stosowanych insektycydów: Chlor-  
fenwinfos (Birlan) X — Cl, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>—C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, O,O-dwuetylo-2-chloro-1-/2,4-dwuchlo-  
rofenylo/winylo fosforan; IPO-62 (Ipfos) X — Br, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>—C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, O,O-dwuetylo-  
-2-bromo-1-/2,4-dwuchlorofenylo/winylo fosforan; IPO-63 (Polfos) X — Br, R<sub>1</sub>,  
R<sub>2</sub>—CH<sub>3</sub>, O,O-dwumetylo-2-bromo-1-/2,4-dwuchlorofenylo/-winylofosforan.

All tested insecticides are methyl or ethyl derivatives of vinyl phosphates. The first position of vinyl groups is substituted by 2,4-dichlorophenyl radical and second position by Cl or Br. Ipfos (IPO-62) and Polfos (IPO-63) are original new Polish insecticides synthesized in the Institute of Organic Industry, Warsaw.

#### MATERIAL AND METHODS

Adult male albino rats, fed a commercial diet with water ad libitum, weighing 200—220 g, were used in all experiments.

Preparation of mitochondria. After decapitation of rats, cerebral hemispheres were immediately removed and rinsed with the isolation medium (225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0,2 mM K<sup>+</sup> EDTA, 5 mM tris/HCl pH 7.4) and the tissue was homogenized in a glass homogenizer with a teflon pestle. For isolation of brain mitochondrial fractions procedure of Moore and Jobsis (1970) was used. All procedures were carried out at 0—4° C.

Enzymatic assays. The succinate dehydrogenase activity was determined by the spectrophotometric methods of King (1963). The cytochrome oxidase activity was assayed spectrophotometrically according to Smith (1954).

Protein was determined by the biuret method (Layne 1957). Protein and enzyme activities determinations were performed immediately after solubilization of mitochondrial fractions with sodium deoxycholate (final concentration 0,5%).

Oxygen consumption with succinate as substrate and oxidative phosphorylation were measured polarographically using a stationary platinum-silver Clark's type oxygen electrode (Estabrook 1967). Oxygen



uptake in the presence of succinate as substrate (3,5 mM) was defined as state 4 respiration. State 3 respiration was referred according to Chance and Hollunger (1961) as respiration in the presence of both succinate and ADP (600 nmoles). Other details of the methods as described previously (Rakowska et al. 1976).

**Chemicals.** Purified Chlorfenvinphos 96% (Birlane) was obtained from Shell. Preparations IPO-62 and IPO-63, purity 84% and 93% respectively, were obtained from the Institute of Organic Industry, Warsaw. All other chemicals were of the highest purity grade available.

## RESULTS

The effects of Chlorfenvinphos, as well as preparations IPO-62 and IPO-63 on the respiration of rat brain mitochondria are summarized in Table 1.

The oxidation of succinate in state 4 respiration was only slightly, if any, affected by the insecticides in a range of concentrations from 25 to 100  $\mu\text{M}$ . Chlorfenvinphos (100  $\mu\text{M}$ ) inhibits almost completely the state 3 respiration with succinate as substrate. This insecticide also inhibited the phosphorylation of ADP and respiratory control (ADP did not induce the stimulation of respiratory rate). Preparations IPO-62 and IPO-63 at the same concentrations, caused the decrease in the oxygen uptake in state 3 respiration but to minor degree than Chlorfenvinphos. The highest concentrations of IPO-62 and IPO-63, however, caused the inhibition of oxygen consumption for 32,2 and 35,1% respectively of control value. In the presence of these insecticides the decrease of ADP/O index and respiratory control ratio were observed.

ADP-stimulated respiration was completely inhibited by preparations IPO-62 and IPO-63 in concentrations 500  $\mu\text{M}$ , as demonstrated in Fig. 2.

IPO-62 (500  $\mu\text{M}$ ) caused the decrease of the respiratory rate from 23  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}$  to 8,5  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}$ . Addition of ADP did not induce the stimulation of respiratory rate. Preparation IPO-63 (500  $\mu\text{M}$ ) did not affect the state 4 respiration but after addition of ADP, the respiratory rate decreased from 31,55  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}$  to 12,51  $\mu\text{moles O}_2/\text{min}$ . The same effect of Chlorfenvinphos was observed already in 100  $\mu\text{M}$  concentration.

The observed inhibition of succinate oxidation in the presence of ADP (state 3 respiration), could be due to reduction of the respiratory chain enzymes activities by studied insecticides. In further experiments, the effect of Chlorfenvinphos and preparations IPO-62 and IPO-63 on the activities of succinate dehydrogenase and cytochrome

Table 1. Effect of Chlorfenvinphos, IPO-62 and IPO-63 on the oxygen uptake and respiratory control of rat brain mitochondria

Tabela 1. Wpływ Chlorfenvinfosu oraz IPO-62 i IPO-63 na zużycie tlenu i kontrolę oddechową frakcji mitochondrialnych mózgu szczura

Insecticide concentration	Oxygen uptake ( $\mu\text{mole O}_2/\text{min/mg protein}$ )		ADP/O	RCR
Stężenie insektycydu	Zużycie tlenu ( $\mu\text{mole O}_2/\text{min/mg białka}$ )		$\bar{X}$	$\bar{X}$
	state 4 stan 4	state 3 stan 3		
Control Kontrola	$8.71 \pm 0.77$	$46.54 \pm 1.32$	1.96	6.45
Chlorfenvinphos				
50 $\mu\text{M}$	$9.29 \pm 0.70$	$13.09 \pm 1.10^{**}$	1.33	1.50
75	$10.14 \pm 1.20$	$12.25 \pm 0.80^{**}$	*)	*)
100	$8.45 \pm 0.60$	$8.45 \pm 0.60^{**}$	*)	*)
IPO-62				
25 $\mu\text{M}$	$10.96 \pm 0.47$	$48.64 \pm 0.20$	1.81	2.89
50	$10.13 \pm 0.35$	$45.44 \pm 1.55$	1.65	1.93
75	$8.59 \pm 0.52$	$32.58 \pm 0.37^{**}$	1.54	1.84
100	$8.62 \pm 0.50$	$32.52 \pm 0.38^{**}$	1.43	1.77
IPO-63				
25 $\mu\text{M}$	$8.42 \pm 0.26$	$38.21 \pm 1.22$	1.80	8.01
50	$8.90 \pm 0.12$	$33.18 \pm 1.46$	1.71	7.44
75	$9.53 \pm 0.68$	$31.16 \pm 0.49^{**}$	1.61	9.22
100	$11.15 \pm 0.82$	$30.24 \pm 2.32^{**}$	1.51	5.71

Results are mean values ( $\bar{X}$ )  $\pm$  standard error of the mean.Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  średnie odchylenie od średniej arytmetycznej.

Number of animals in each group was 5

Liczba zwierząt w każdej grupie wynosiła 5

RCR — respiratory control ratio

RCR — współczynnik kontroli oddechowej

\*\*significantly different at  $p < 0,05$ \*\*różnice znaczące z  $p < 0,05$ 

\*) not detectable

\*) nieoznaczalne

oxidase were investigated. The results of these experiments are shown in Table 2.

Chlorfenvinphos in the concentrations from 10 to 100  $\mu\text{M}$  did not produce changes in the activities of both mitochondrial oxidoreductases. Very slight changes in the activities were not statistically significant at  $p \leq 0,05$ . The same concentrations (10—100  $\mu\text{M}$ ) of compounds IPO-62 and IPO-63 also did not affect the activities of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase. Low solubility of these compounds in water makes impossible the spectrophotometric determination of the enzymes activities in the presence of effective concentrations of



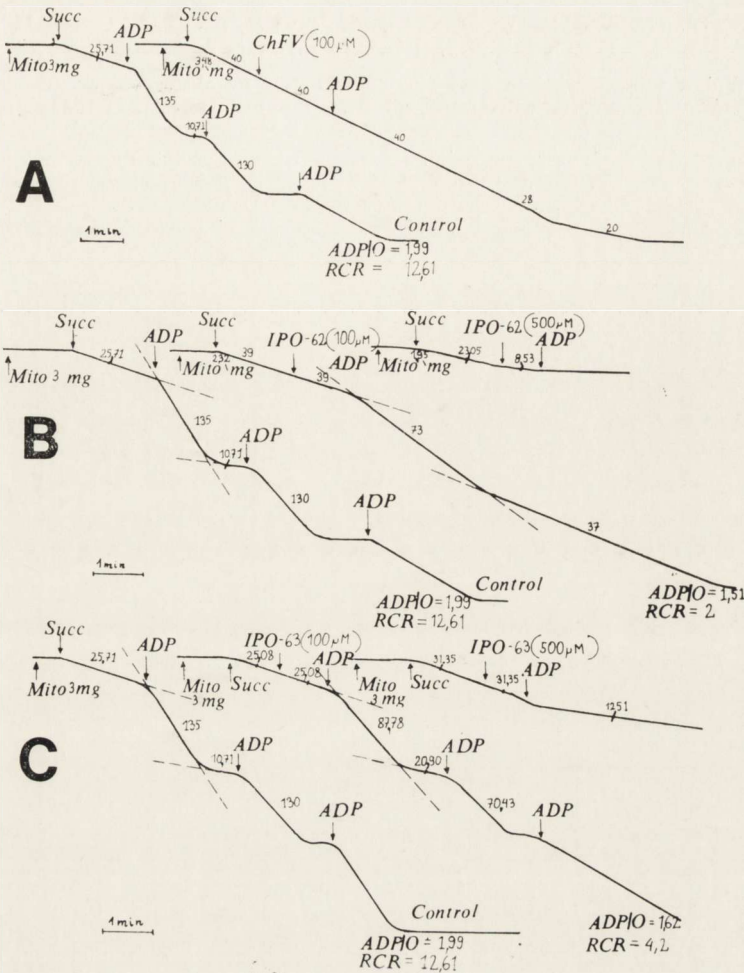


Fig. 2. Effect of Chlorfenvinphos and compounds IPO-62 and IPO-63 on the respiration of rat brain mitochondria. Succinate (succ.), ADP and insecticides were added as shown. The numbers next to the traces are rates of respiration in  $\mu\text{moles of oxygen/min}$ . Insecticides were added to the incubation mixture in ethanol solutions in concentration as shown. Final concentrations in all experiments were 0.48%. A — Chlorfenvinphos, B — IPO-62, C — IPO-63.

Ryc. 2. Wpływ Chlorfenwinfosu oraz związków IPO-62 i IPO-63 na oddychanie frakcji mitochondrialnych mózgu szczura. Bursztynian (succ.), ADP i insektycydy były dodawane jak pokazano, w roztworze etanolowym. Końcowe stężenie etanolu wynosiło we wszystkich przypadkach 0,48%. Liczby przy liniach oznaczają szybkość zużycia tlenu w  $\mu\text{molach tlenu/min}$ . A — Chlorfenwinfos, B — IPO-62, C — IPO-63.

insecticides which inhibited the oxygen uptake in polarographic measurements.

DISCUSSION

The obtained results suggest that Chlorfenvinphos is the stronger inhibitor of state 3 respiration than its chemical analogs IPO-62 and

Table 2. Effect of Chlorfenvinphos, IPO-62 and IPO-63 on the succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in rat brain mitochondria

Tabela 2. Wpływ Chlorfenwinfosu oraz IPO-62 i IPO-63 na aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej frakcji mitochondrialnych mózgu szczura

Insecticide concentration Stężenie insektycydu	Cytochrome oxidase k. sec <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> Oksydaza cytochromowa k. sek <sup>-1</sup> .mg białka <sup>-1</sup>		Succinate dehydrogenase μmoles.min <sup>-1</sup> .mg protein <sup>-1</sup> Dehydrogenaza bursztynianowa μmole.min <sup>-1</sup> .mg białka <sup>-1</sup>	
	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	%	$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	%
Control Kontrola	0.44 ± 0.03	(9) 100	14.45 ± 0.49	(10) 100
Chlorfenvinphos				
10 μM	0.38 ± 0.09	(5) 86,3	14.11 ± 0.78	(5) 99,7
25	0.43 ± 0.06	(4) 97,7	12.55 ± 1.19	(5) 86,8
50	0.49 ± 0.06	(4) 111,3	14.19 ± 0.75	(5) 98,2
75	0.38 ± 0.07	(4) 86,3	12.71 ± 0.55	(5) 87,9
100	0.41 ± 0.05	(4) 93,2	12.75 ± 0.78	(5) 88,2
IPO-62				
10 μM	0.44 ± 0.01	(4) 100	17.24 ± 2.98	(5) 119,8
25	0.46 ± 0.06	(4) 104,5	16.38 ± 2.26	(5) 113,3
50	0.42 ± 0.005	(4) 95,5	16.01 ± 1.61	(5) 110,8
75	0.40 ± 0.07	(4) 90,9	14.10 ± 2.51	(5) 97,6
100	0.42 ± 0.07	(6) 95,5	14.10 ± 2.03	(6) 97,6
IPO-63				
10 μM	0.52 ± 0.05	(4) 118,2	15.47 ± 1.62	(5) 107,1
25	0.53 ± 0.04	(4) 120,5	17.75 ± 2.59	(5) 122,8
50	0.49 ± 0.05	(4) 111,4	17.32 ± 2.68	(5) 119,9
75	0.47 ± 0.04	(4) 106,8	17.57 ± 1.74	(5) 121,6
100	0.45 ± 0.04	(6) 102,2	17.66 ± 2.31	(6) 122,2

The activities of both enzymes were determined immediately after solubilization of mitochondrial fractions with sodium deoxycholate (final concentration 0,5%).

Aktywność obu enzymów oznaczano we frakcjach mitochondrialnych bezpośrednio po solubilizacji dezoksycholanem sodu (stężenie końcowe 0,5%).

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$  — arithmetic mean  $\pm$  standard error of the mean

$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$  — średnia arytmetyczna  $\pm$  średnie odchylenie od średniej arytmetycznej.

In parenthesis are shown number of experiments.

W nawiasach podano liczbę doświadczeń.

IPO-63. All three compounds contain the chlorinated aromatic ring. In molecule of Chlorfenvinphos the second position of vinyl group is substituted by Cl, while in IPO-62 and IPO-63 by Br. This difference is probably responsible for stronger inhibitory action of Chlorfenvinphos.

The lack of inhibition of the mitochondrial oxidoreductases activities indicate that the inhibition of state 3 respiration is not due to modification of respiratory chain. Paralell studies have shown that Chlorfenvinphos did not inhibit DNP-stimulated respiration of liver mitochondrial fractions (Orłowska 1976). This suggests that the effects of investigated insecticides are probably connected with disturbances of



oxidative phosphorylation. The mode of action of Chlorfenvinphos and its analogs is unknown. It is possible that these compounds are inhibitors of coupled oxidative phosphorylation. On the other hand, the inhibition of state 3 respiration may be related to their inhibitory action on adenine nucleotide translocase.

Both inhibitors of oxidative phosphorylation and inhibitors of adenine nucleotide carrier caused very similar effects on mitochondrial respiration (Halder, Demetriou 1975, Chavez, Klapp 1975). These effects rely on inhibition of ADP stimulated respiration without affecting state 4 respiration.

Inhibitors of adenine nucleotide transport have three negative charges which play an important role in their inhibitory effect (Vignais, Vignais 1964; Weideman et al. 1970). Organophosphorus insecticides, however, contain relatively positive phosphorus atom (Corbett 1974). These facts suggest that Chlorfenvinphos could have an oligomycin-like effect i.e. the inhibition of oxidative phosphorylation. The inhibition of phosphate transport across mitochondrial membranes is the next object for consideration on mechanism of Chlorfenvinphos action. Direct evidence for the site of action of these insecticides would have to come from measurements of exchange of ADP and ATP and ATPase activity.

Previously we have suggested that insecticide containing 2,4,5-trichlorophenyl radical — the oxygen analog of Ronnel, may be an uncoupler of oxidative phosphorylation (Sitkiewicz 1975). Present results indicate, that organophosphorus compounds which contain 2,4-dichlorophenyl ring are not uncouplers of oxidative phosphorylation but can alter the processes of ATP formation on the site of transfer of high energy bonds.

Acknowledgements. We thank Doc. dr S. Fulde from the Institute of Organic Industry for supplying the insecticides used in this study.

We also thank Miss M. G. Mazurkiewicz for her skilled technical assistance.

D. Sitkiewicz, M. Skonieczna, E. Orłowska, W. Bicz

WPLYW FOSFOROORGANICZNYCH INSEKTYCYDÓW NA PROCESY  
UTLENIANIA W MITOCHONDRIACH MÓZGU SZCZURA. BADANIA  
PORÓWNAWCZE CHLORFENWINFOSU I JEGO CHEMICZNYCH ANALOGÓW

Streszczenie

Zbadano wpływ trzech pestycydów fosforoorganicznych — chlorfenwinfosu oraz jego analogów strukturalnych IPO-62 i IPO-63 na procesy oksydacyjnej fosforylacji w mitochondriach mózgu szczura. Pomiar zużycia tlenu przez frakcję

mitochondrialną prowadzono metodą polarograficzną przy użyciu stacjonarnej elektrody platynowo-srebrowej typu Clarka. Aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej oznaczano w solubilizowanej frakcji mitochondrialnej metodami spektrofotometrycznymi.

Wykazano, że wszystkie badane związki hamują zużycie tlenu w stanie 3 oddychania, przy czym najsilniejsze działanie inhibitorowe stwierdzono w przypadku chlorfenwinfosu. Badane preparaty w stężeniach 25—75  $\mu\text{M}$  nie wykazywały wpływu na stan 4 oddychania mitochondriów w obecności bursztynianu. Ponadto nie stwierdzono zmian w aktywności dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej pod wpływem badanych pestycydów. Na podstawie uzyskanych wyników autorzy sugerują, że obserwowane zmiany nie są bezpośrednio związane z zaburzeniami w transporcie elektronów lecz ze zmianami w oksydacyjnej fosforylacji. Mechanizm tego działania może polegać na zaburzeniu w transporcie nieorganicznego fosforanu lub  $\text{ADP} - \text{ATP}$ .

Д. Ситкевич, М. Скопечна, Е. Орловска, В. Вич

#### ВЛИЯНИЕ ФОСФООРГАНИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ НА ПРОЦЕССЫ ОКИСЛЕНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ. СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ХЛОРФЕНВИНФОСА И ЕГО ХИМИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ

##### Резюме

Исследовано влияние трех фосфоорганических пестицидов — хлорфенвинфоса и его структурных аналогов IPO-62 и IPO-63, — на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях мозга крысы. Измерение потребления кислорода митохондриальной фракцией проводили полярографическим методом при использовании стационарного платиново-серебряного электрода типа Кларка. Активность сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы определяли в солюбилизированной митохондриальной фракции спектрофотометрическими методами.

Показано, что все исследованные соединения подавляют потребление кислорода в состоянии 3 дыхания, причем наиболее сильное ингибирующее действие отмечено в случае хлорфенвинфоса. Исследованные препараты в концентрации 25—75  $\mu\text{M}$  не проявляли влияния на состояние 4 дыхания митохондрий в присутствии сукцината. Кроме того, не установлено изменений активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы под влиянием исследованных пестицидов. На основании полученных результатов авторы предполагают, что наблюдаемые изменения не связаны непосредственно с нарушениями транспорта электронов, а связаны с изменениями окислительного фосфорилирования. Механизм этого действия может основываться на нарушении транспорта неорганического фосфата или  $\text{АДФ-АТФ}$ .

##### REFERENCES

1. Byczkowski J.: The effect of p,p'-DDT (Dicophane) and its main metabolites on the respiration of rat liver mitochondria. Arch. Toxicol., 1973, 31, 137—145.
2. Cammer W., Moore C. L.: The effect of hexachlorophene on the respiration of brain and liver mitochondria. Biochem. Biophys. Res. Comm., 1972, 46, 1887—1894.



3. Chance B., Hollunger G.: The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 1961, 236, 1534—1543.
4. Chavez E., Klapp M.: A new inhibitor of adenine nucleotide translocase in mitochondria: agaric acid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1975, 67, 272—278.
5. Corbett J. R.: The biochemical mode of action of pesticides. Academic Press, London, New York, 1974, 109.
6. Estabrook R. W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurements of ADP/O ratios. In: *Methods in enzymology*, Eds: R. W. Estabrook, M. E. Pullman, Academic Press, New York, 1967, 10, 41—47.
7. Halder H. J., Demetriou I. M.: A new inhibitor of coupled oxidative phosphorylation. 5-Hydroxynaphthalenedicarboxylic anhydride a derivative of a carcinogenic polynuclear hydrocarbon. *Biochemistry*, 1975, 14, 5374—5378.
8. King T. E.: Reconstruction of respiratory chain enzymes system. *J. Biol. Chem.*, 1963, 238, 4032—4036.
9. Layne E.: Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In: *Methods in enzymology*, Eds: S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1957, 3, 447—454.
10. Moore C. L., Jobsis F. F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1970, 138, 295—305.
11. Orłowska E.: Wpływ insektycydów fosforoorganicznych chlorfenwinfosu oraz preparatów IPO-62 i IPO-63 na oksydacyjną fosforylację frakcji mitochondrialnych wątroby i mózgu szczura. *Praca dypl. A. M.*, Warszawa, 1976.
12. Rakowska I., Dybowska A., Malatyńska E., Kieducka A.: The activities of some oxidoreductases and respiratory control in rat brain mitochondria following Fenchlorphos intoxication. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 461—469.
13. Sitkiewicz D.: Procesy utleniania w mitochondriach ośrodkowego układu nerwowego i wątroby szczura w następstwie działania insektycydów tiofosforoorganicznych. *Praca doktorska, A. M.*, Warszawa, 1975.
14. Sitkiewicz D., Rakowska I., Skonieczna M., Chajdak A.: Effect of Ronnel and its oxygen analog on the succinate oxidation by rat brain and liver homogenates and mitochondria. *Post. Biochem. Physiol.*, 1977, 7, 501—509.
15. Sitkiewicz D.: The effect of Ronnel, Malathion and their oxygen analogs on respiration of rat brain and liver mitochondria, unpublished.
16. Smith L.: A study of some oxidative enzymes of bakers yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, 50, 285—298.
17. Weideman M. J., Erdelt H., Kingeberg M.: Effect of bongkreikic acid on the adenine nucleotide carrier in mitochondria: tightening of adenine nucleotide binding and differentiation between inner and outer site. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1970, 39, 363—370.
18. Vignais P. V., Vignais P. M.: Effect of ADP on the inhibition of oxidative phosphorylation by potassium atractylate. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, 14, 559—564.
19. Zalewska Z., Jurkiewicz G., Wenzel G.: Oksydacyjna fosforylacja i aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej mózgu szczura w następstwie zatrucia ustroju Dichlorfosem i Trichlorfonem. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 1977, 10, 357—365.

Authors' address: Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, 1 Banacha Str., 02-097 Warszawa

Ten właśnie stosunek dla pionierów i odkrywców neuropatologii uznać należy za bardzo miłą cechę opracowania. W tekście opracowania zawarte są liczne odnośniki do pozycji monograficznych, omawiających poszczególne zagadnienia szczegółowe, do których autor odsyła zainteresowanego czytelnika. Jedynym zarzutem jaki można w tym względzie postawić autorowi jest jednostronny wybór piśmiennictwa. Jest ono w przeważającej części anglosaskie z niewielkimi tylko uzupełnieniami, głównie zresztą historycznymi — francuskimi, niemieckimi i hiszpańskimi. Badania autorów poza tymi obszarami językowymi wniosły również interesujące i ważne spostrzeżenia w dziedzinie patologii rdzenia kręgowego.

Autor przeznaczając swoje opracowanie przede wszystkim dla neurologów i neurochirurgów oraz tych wszystkich specjalistów, którzy zajmują się leczeniem i rehabilitacją ludzi z uszkodzeniami rdzenia. Wyraża również nadzieję, że książka znajdzie czytelników ogólnych patomorfologów i zachęci ich do częstszego zajmowania się patologią rdzenia. Jestem głęboko przeświadczony, że książka J. T. Hughesa powinna znaleźć się w podręcznym księgozbiórce każdego, kto styka się z tej czy innej pozycji z patologią układu nerwowego i kręgosłupa. Skorzysta z niej zarówno patomorfolog, neurolog, neurochirurg, jak i specjalista z zakresu rehabilitacji, pediatrii i gerontologii. Wyniesie z niej wiele korzyści i neuropatolog, któremu powinna ponadto przypomnieć, że rdzeń kręgowy stanowi integralną część ośrodkowego układu nerwowego.

*M. J. Mossakowski*



LUBOMIRA DYDYK, ANDRZEJ PIEKARCZYK, TADEUSZ SZRETER,  
JADWIGA PROKOPCZYK

WPLYW NORMOBARYCZNEJ HIPEROKSJI  
NA ZAWARTOŚĆ GLIKOGENU  
W DOJRZEWAJĄCYM MÓZGU KRÓLIKA

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej  
i Klinicznej PAN

Kierownik: doc. dr med. M. Dąmbska

Zakład Farmakologii Instytutu Matki i Dziecka

Kierownik: dr n. biol. J. Prokopczyk

Oddział Intensywnej Terapii i Reanimacji Szpitala Klinicznego

im. Prof. M. Michałowicza, Warszawa

Ordynator: doc. dr med. T. Szreter

Ośrodkowy układ nerwowy (oun) ssaków jest po wątrobie i mięśniach trzecim z kolei narządem, w którym gromadzi się glikogen. Stanowi on 1/4 całkowitej rezerwy energetycznej oun i odgrywa ważną rolę w metabolizmie mózgu (Bruner i wsp. 1971; Edwards, Rogers 1972; Watanabe, Passonneau 1973). Gromadzenie się glikogenu w oun ssaków jest nieswoistą reakcją na działanie różnych czynników fizjologicznych i patologicznych. Jednym z podstawowych czynników prowadzących do zmian zawartości glikogenu w mózgu jest niedotlenienie. Wpływ hipoksji i ischemii na zawartość glikogenu w oun wykazały badania licznych autorów (Hager, 1966; Hirano i wsp. 1967; Bakay i Lee, 1968; Mossakowski i wsp. 1968; Ibrahim i wsp. 1968, 1970; Rivera i wsp. 1970; Crowell i wsp. 1971; Mossakowski i Zelman 1971; Pronaszko-Kurczyńska i wsp. 1971; Long i wsp. 1972; Mossakowski i wsp. 1973; Śmiałek i wsp. 1973; Ito i wsp. 1974). Wpływ oddychania czystym tlenem na zmianę poziomu glikogenu w mózgu dorosłych szczurów wykazali Gercken i Preuss (1969). Celem naszej pracy było zbadanie wpływu normobarycznej hiperoksji na zawartość glikogenu w mózgu królika w okresie jego dojrzewania.

## MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 60 noworodkach króliczych i 45 królikach 20-dniowych. Do ustalenia zawartości glikogenu w mózgu w warunkach prawidłowych użyto 16 noworodków i 11 królików 20-dniowych. Pozostałe króliki użyto do doświadczeń (25 noworodków i 19 królików 20-dniowych) i do badań kontrolnych (19 noworodków i 15 królików 20-dniowych). Zwierzęta doświadczalne umieszczano w komorze z ciągłym przepływem tlenu. Zwierzęta kontrolne umieszczano w komorze z ciągłym przepływem powietrza (4 l/min.). Czas przebywania zwierząt w komorach wynosił 6 godzin w I grupie doświadczalnej i I grupie kontrolnej i 24 godziny w II grupie doświadczalnej i II grupie kontrolnej. Ciśnienie w komorze odpowiadało ciśnieniu barometrycznemu i wynosiło 760—765 mm Hg. Temperatura wahała się w granicach 25—27° C. Stężenie dwutlenku węgla (oznaczane kapnografem f-my Godart) wynosiło średnio 0,1%. Stężenie tlenu w komorze tlenowej (oznaczane oksytestem f-my Hartman-Braun) wynosiło średnio 91,5%.

Materiał do badań pobierano w narkozie eterowej. Do prowadzenia narkozy posługiwano się małą komorą gazową. Zwierzęta poddane działaniu hiperoksji znieczulano stosując pary eteru z tlenem. Dopływ tlenu regulowano tak, aby stężenie tlenu wewnątrz małej komory wynosiło około 91,5%. Zwierzęta nie poddane doświadczeniu z nadmiarem tlenu (norma i kontrola) znieczulano stosując eter z powietrzem. Po uzyskaniu chirurgicznej narkozy, otwierano czaszkę i wyjmowano mózg w całości (do badań histochemicznych), lub pobierano tylko korę mózgu (do badań biochemicznych).

Mózgi wydobyte z czaszki dzielono czterema cięciami w płaszczyźnie czołowej na pięć bloków. Pierwsze cięcie prowadzono do przodu od skrzyżowania nerwów wzrokowych; drugie — na poziomie głowy jądra ogoniastego; trzecie — przez wzgórze i czwarte — przez opuszkę. Bloki utrwalano w płynie Rossmanna, zatapiano w parafinie i skrawano na skrawki grubości około 10  $\mu$ . Obecność glikogenu wykrywano przy pomocy odczynu PAS-dimedon wg metody opisanej przez Bulmera (1959).

Skrawki pobranej kory mózgu wagi około 100 mg przenoszono natychmiast do próbek i dodawano 0,9 cm<sup>3</sup> 33% wodorotlenku potasu. Probówki wstawiano do wrzącej łaźni wodnej na 20 minut, aż do zupełnego rozpuszczenia tkanki i chłodzono pod bieżącą wodą. Dalsze badanie prowadzono sposobem opisanym przez Krisman (1962). Ekstynkcję w ciągu 10 min. odczytywano na spektrofotometrze Unicam SP 500 przy długości fali 460 nm, wobec ślepej próby. Zawartość glikogenu wyrażano w mg na 1 g tkanki. Wyniki poddano analizie statystycznej posługując się testem t-Studenta.



## WYNIKI

*Obraz histochemiczny*

Obecność złogów glikogenu stwierdzono w mózgach zwierząt poddanych doświadczeniu z hiperoksją, w grupach kontrolnych i w normie. We wszystkich wymienionych grupach glikogen gromadził się w splocie naczyniówkowym, podwyściółkowo i podoponowo, w jądrach opuszki i w małych ilościach w korze mózgu i korze mózdzku.

Złogi glikogenu występowały w neuropilu w postaci drobnych, luźno rozsianych lub ogniskowo zagęszczonych ziarnistości, najobfitszych w pobliżu naczyń (ryc. 1). Śródkomórkową lokalizację złogów obserwowano jedynie w jądrach opuszki, w których glikogen gromadził się w perikariach i wypustkach komórek nerwowych (ryc. 2).

W mózgach noworodków króliczych poddanych działaniu 6-godzinnej hiperoksji, w porównaniu z normą i kontrolą, stwierdzono większe nagromadzenie złogów glikogenu w splocie naczyniówkowym i w jądrach opuszki. U noworodków poddanych działaniu 24-godzinnej hiperoksji, w porównaniu z normą i kontrolą, nie obserwowano wyraźnych różnic w gromadzeniu się złogów glikogenu.

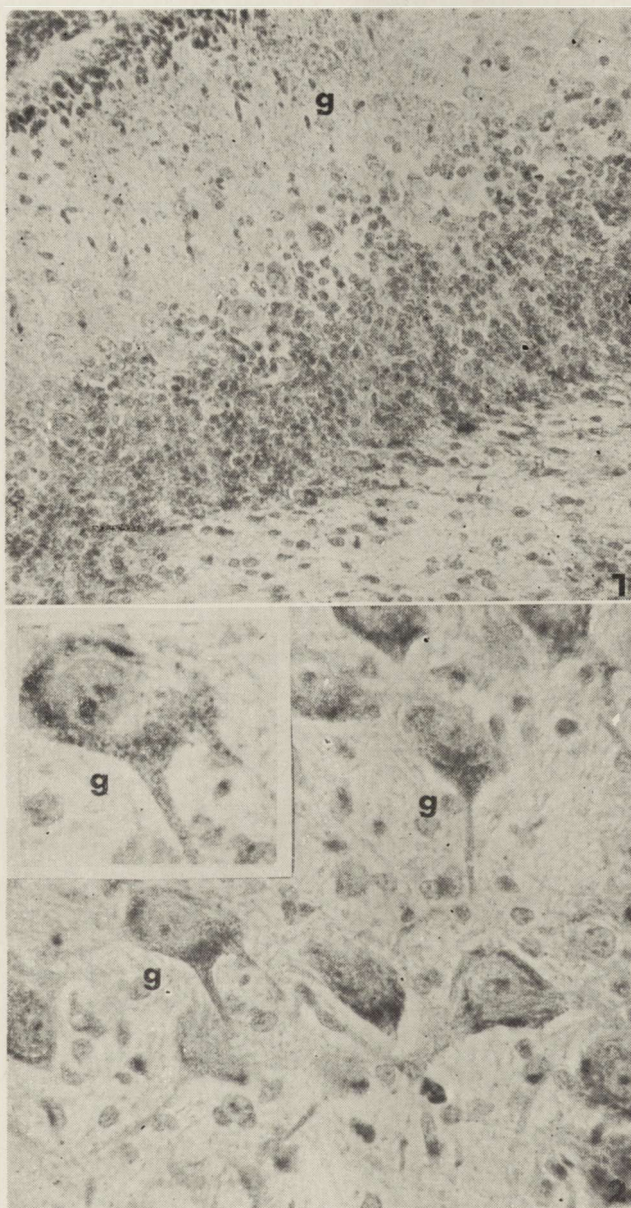
W mózgach królików 20-dniowych, we wszystkich grupach porównywanych z odpowiednimi grupami noworodków, stwierdzono większe nagromadzenie złogów glikogenu, które zaznaczało się szczególnie wyraźnie w korze mózgu. U tych królików, po 6-godzinnej i po 24-godzinnej hiperoksji nie obserwowano różnic w gromadzeniu się glikogenu w porównaniu z normą i kontrolą.

*Badanie biochemiczne*

Uzyskane wyniki badań przedstawiono na wykresach 1 i 2.

W grupie noworodków króliczych, poziom glikogenu w korze mózgu w normie wynosił 0,3041 mg/g tkanki. W grupie kontrolnej do 6-godzinnej hiperoksji, zawartość glikogenu była niższa o około 20% w stosunku do normy. Po 6-godzinnym doświadczeniu z nadmiarem tlenu zawartość glikogenu w korze mózgu wzrastała o około 50% w stosunku do kontroli. W grupie kontrolnej do 24-godzinnej hiperoksji stwierdzono obniżenie poziomu glikogenu o około 50% w stosunku do normy. Po 24-godzinnym doświadczeniu z nadmiarem tlenu, poziom glikogenu był niski i stanowił około 50% wartości stwierdzonej w kontroli.

W grupie normalnych królików 20-dniowych, zawartość glikogenu w korze mózgu była wyższa o około 130% w porównaniu z normą w grupie noworodków. W grupie kontrolnej do 6-godzinnej hiperoksji, poziom glikogenu w porównaniu z normą, ulegał niewielkiemu i statystycznie



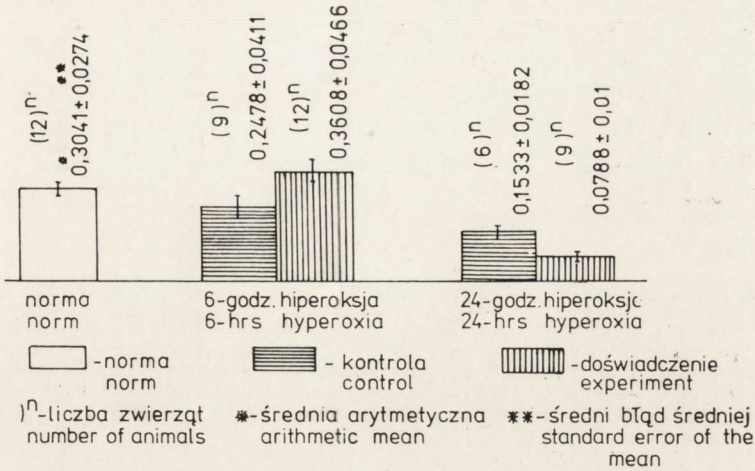
Ryc. 1. Złogi glikogenu (g) w neuropilu kory mózdzku. Królik 1-dniowy, po 24 godz. hiperoksji. PAS-dimedon. Pow. 200 ×

Fig. 1. Glycogen (g) deposits in neuropil of the cerebellar cortex. 1 day old rabbit, after 24 h hyperoxia. PAS-dimedon. × 200

Ryc. 2. Złogi glikogenu (g) w komórkach jądra ruchowego nerwu V. Królik 20-dniowy, po 6 godz. hiperoksji. PAS-dimedon. Pow. 400 ×

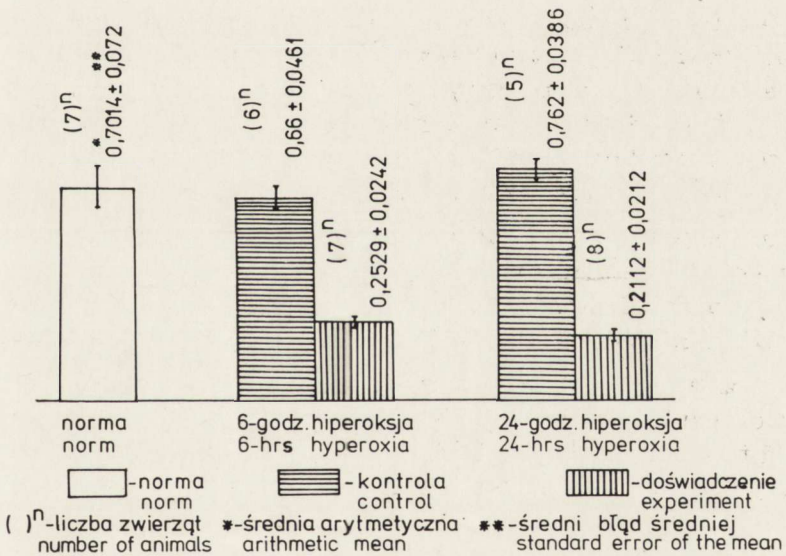
Fig. 2. Glycogen (g) deposits in the cells of *nucl. motorius n.V.* 20 days old rabbit, after 6 h hyperoxia. PAS-dimedon. × 400





Wykres 1. Zawartość glikogenu (mg/g tkanki) w korze mózgu noworodków króliczych w normie, po 6 godz. hiperoksji i po 24 godz. hiperoksji.

Diagram 1. Glycogen content (mg/g tissue) in cerebral cortex of newborn rabbits in the norm, after 6 h hyperoxia and after 24 h hyperoxia.



Wykres 2. Zawartość glikogenu (mg/g tkanki) w korze mózgu królików 20-dniowych w normie, po 6 godz. hiperoksji i po 24 godz. hiperoksji.

Diagram 2. Glycogen content (mg/g tissue) in cerebral cortex of 20 days old rabbits in the norm, after 6 h hyperoxia and after 24 h hyperoxia.

nieznamiennemu obniżeniu. Po 6-godzinnym doświadczeniu z nadmiarem tlenu, zawartość glikogenu obniżała się o około 65% w stosunku do kontroli. W grupie kontrolnej do 24-godzinnej hiperoksji zaznaczał się niewielki i statystycznie nieznamienny wzrost poziomu glikogenu w porównaniu z normą. Po 24-godzinnym doświadczeniu z nadmiarem tlenu, zawartość glikogenu była o około 73% niższa niż w kontroli.

#### OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych badań wykazują duże różnice w zawartości glikogenu w korze mózgu normalnych noworodków króliczych i królików 20-dniowych. Istniejące różnice można tłumaczyć dojrzwaniem białkowych układów enzymatycznych, między innymi fosforylasy i syntetazy glikogenowej. Zależność pomiędzy poziomem glikogenu a aktywnością tych enzymów w warunkach doświadczalnych obserwowali w mózgach niedojrzałych Mossakowski i wsp. (1968) i Rivera i wsp. (1970). Drugim czynnikiem, od którego zależy niski poziom glikogenu w okresie okołoporodowym jest duże nasilenie procesów metabolicznych. W tym okresie ważną rolę odgrywa przemiana beztlenowa z szybkim wyczerpywaniem się zapasów glikogenu.

Wydaje się, że obniżenie poziomu glikogenu stwierdzone w korze mózgu kontrolnych noworodków króliczych, jest związane z ich głodzeniem. Przemawia za tym zależność pomiędzy obniżaniem się poziomu glikogenu i czasem przetrzymywania noworodków króliczych w komorze powietrznej, oraz prawie niezmienny poziom glikogenu w korze mózgu kontrolnych królików 20-dniowych, które żywiły się podczas przebywania w komorze powietrznej.

Znaczne indywidualne różnice w zawartości glikogenu w korze mózgu noworodków króliczych występują w obu grupach kontrolnych i w obu grupach doświadczalnych. Są one związane z osobniczą wrażliwością na głód i z różnym czasem, jaki upłynął od ostatniego karmienia.

Wzrost zawartości glikogenu w mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu 6-godzinnej hiperoksji, stwierdzany zarówno w badaniach histochemicznych jak i biochemicznych, zasługuje na szczególną uwagę. Wydaje się, że wzrost ten można tłumaczyć bezpośrednim działaniem nadmiaru tlenu i niewielkim, prawdopodobnie dopiero rozpoczynającym się niedokrwieniem mózgu.

Nadmiar tlenu działający na mózg noworodka królika powoduje przejście metabolizmu beztlenowego, który dominuje u noworodka, w metabolizm tlenowy, w związku z czym zmniejsza się zużycie glikogenu. Ponadto istnieją sugestie odnośnie bezpośredniego działania hiper-



oksji na wzrost poziomu glikogenu w mózgu, które znajdują poparcie w tzw. efekcie Pasteura (hamowanie glikogenolizy przez tlen).

Sugestie dotyczące niedokrwienia mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu 6-godzinnej hiperoksji, a także wpływu niedokrwienia na zawartość glikogenu w korze mózgu tych zwierząt, znajdują potwierdzenie w naszych badaniach utrastrukturalnych (Dydyk i wsp. 1976 a, b). Wykazały one w korze mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu 6-godzinnej hiperoksji, niewielkie i odwracalne zmiany komórek glejowych i nerwowych o typie zmian ischemiczno-hipoksyjnych. Małe nasilenie i odwracalność tych zmian pozwalają przypuszczać, że w tych warunkach komórki glejowe i neurony kory mózgu zachowują zdolność do syntezy glikogenu.

W trzech pozostałych grupach doświadczalnych (noworodki królicze poddane działaniu 24-godzinnej hiperoksji, króliki 20-dniowe poddane działaniu 6-godzinnej hiperoksji i króliki 20-dniowe poddane działaniu 24-godzinnej hiperoksji) stwierdzono obniżenie zawartości glikogenu w korze mózgu, a badania utrastrukturalne wykazały ciężkie uszkodzenia komórek glejowych i nieodwracalne uszkodzenia komórek nerwowych kory mózgu (Dydyk i wsp., 1978). W następstwie tych uszkodzeń, komórki glejowe i komórki nerwowe kory mózgu tracą zdolność do gromadzenia glikogenu.

Wzrost zawartości glikogenu w korze mózgu noworodków króliczych poddanych działaniu 6-godzinnej hiperoksji i stwierdzone w tych samych warunkach doświadczalnych obniżenie zawartości glikogenu w korze mózgu królików 20-dniowych, wymaga dodatkowego omówienia. Istniejące różnice można tłumaczyć wcześniejszym występowaniem reakcji adaptacyjnych w ustroju bardziej dojrzałym. W związku z tym, skurcz naczyń mózgowych będący reakcją adaptacyjną na stres wywołany działaniem wysokiego ciśnienia cząstkowego tlenu w krwi tętniczej, występuje wcześniej u królików 20-dniowych i już po 6-godzinnej hiperoksji doprowadza u nich do znacznego niedokrwienia i niedotlenienia kory mózgu. Ponadto wydaje się, że różnice te należy interpretować w oparciu o różnice w dynamice procesów metabolicznych mózgu, w zależności od stopnia dojrzałości i utlenienia mózgu. Badania Mossakowskiego i wsp. (1973) nad wpływem niedotlenienia na poziom glikogenu w mózgach młodych szczurów, wykazały u zwierząt 1, 2 i 3-tygodniowych szczytowy przyrost glikogenu między 12 i 48 godziną doświadczenia, natomiast u zwierząt 6-tygodniowych — między 6 i 12 godziną doświadczenia. Gercken i Preuss (1969) badając wpływ czystego tlenu na zawartość glikogenu w mózgach młodych szczurów, stwierdzili wzrost poziomu glikogenu już po 2 godzinach trwania doświadczenia. W oparciu o powyższe dane można przypuszczać, że w naszych ba-

daniach, w grupie królików 20-dniowych, wzrost poziomu glikogenu miał miejsce w pierwszych godzinach doświadczenia, a następnie w wyniku utrzymującej się ischemii i narastającej hipoksji ulegał obniżeniu.

Śródkomórkowe gromadzenie się złogów glikogenu w jądrach opuszki jest związane z wcześniejszym, w porównaniu z półkulami mózgowymi, dojrzewaniem pnia mózgu. Jest ono wyrazem dojrzałości komórek, które posiadają w pełni wykształcony aparat enzymatyczny niezbędny dla syntezy glikogenu (Long i wsp. 1972).

#### WNIOSKI KOŃCOWE

1. Dynamika zmian zawartości glikogenu w mózgu królika zależy od dojrzałości oun i utlenienia.

2. Śródkomórkowe gromadzenie się glikogenu występuje wyłącznie w dojrzałych strukturach mózgu, zawierających komórki, które posiadają w pełni wykształcony aparat enzymatyczny.

A. Дыдык, А. Пекарчык, Т. Шретер, Я. Прокопчык

#### ВЛИЯНИЕ НОРМОБАРИЧЕСКОЙ ГИПЕРОКСИИ НА СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА В СОЗРЕВАЮЩЕМ МОЗГУ КРОЛИКА

##### Резюме

Исследовано влияние нормобарической гипероксии на содержание гликогена в мозгу новорожденных и 20-дневных кроликов. Гистохимические и биохимические исследования показали, что 6-часовая нормобарическая гипероксия вызывает возрастание содержания гликогена в коре мозга новорожденных кроликов, но снижение его в коре мозга 20-дневных кроликов. Нормобарическая гипероксия, длящаяся 24 часа, приводит к снижению уровня гликогена в коре мозга новорожденных и 20-дневных кроликов. Из проведенных исследований следует, что: 1. изменения содержания гликогена в мозгу зависят от зрелости нервной системы и парциального давления кислорода в артериальной крови, 2. внутриклеточное накопление гликогена имеет место исключительно в зрелых структурах мозга, клетки которых обладают полностью сформированным ферментативным аппаратом.

L. Dydyk, A. Piekarczyk, T. Szreter, J. Prokopczyk

#### THE EFFECT OF NORMOBARIC HYPEROXIA ON THE GLYCOGEN CONTENT IN MATURING RABBIT BRAIN

##### Summary

The effect of normobaric hyperoxia on the glycogen content in the brain of newborn and 20 days old rabbits was investigated. Histochemical and biochemical study demonstrated that 6 h normobaric hyperoxia causes the increase of glycogen content in the cerebral cortex of the newborns and the decrease of gly-



cogen in the cerebral cortex of the 20 days old rabbits. Normobaric hyperoxia lasting for 24 h causes the decrease of glycogen level in the cerebral cortex of both, newborns and 20 days old rabbits. It is concluded that the changes in glycogen content depend on the maturity of central nervous system and the partial oxygen pressure in the arterial blood. Intracellular glycogen accumulation is present only in the mature cerebral structures, the cells of which contain fully developed enzymatic system.

## PIŚMIENICTWO

1. Bakay L., Lee J. C.: The effect of acute hypoxia and hypercapnia on the ultrastructure of the central nervous system. *Brain*, 1968, 91, 697—706.
2. Brunner E. A., Passonneau J., Molstad C.: The effect of volatile anaesthetics on levels of metabolites and on metabolic rate in brain. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 2301—2316.
3. Bulmer D.: Dimedon as an aldehyde blocking reagent of facilitate the histochemical demonstration of glycogen. *Stain Tech.*, 1959, 34, 95—98.
4. Crowell R. M., Olsson Y., Klatzo I., Ommaya A. K.: Temporary focal ischaemia in the monkey. *Transact. Amer. Neurological Assoc.*, 1971, 95, 229—231.
5. Dydyk L., Dąbska M., Szreter T.: Wpływ hiperoksji na dojrzewający mózg królika. I. Zmiany wczesne. *Neuropat. Pol.*, 1976a, 14, 177—183.
6. Dydyk L., Dąbska M., Szreter T.: Wpływ hiperoksji na dojrzewający mózg królika. II. Zmiany późniejsze. *Neuropat. Pol.*, 1976b, 14, 324—330.
7. Dydyk L., Justyna M., Dąbska M.: Wpływ normobarycznej hiperoksji na korę mózgu i płuca królików 20-dniowych, 1978. W przygotowaniu do druku.
8. Edwards C., Rogers K. J.: Some factors influencing brain glycogen in the neonate chick. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2759—2766.
9. Gercken G., Preuss H.: The effect of breathing oxygen on the metabolism of the rat brain under normal and ischaemic conditions. *J. Neurochem.*, 1969, 16, 761—767.
10. Hager H.: Die frühen Alterationen des Nervengewebes nach Hyposidose und die fortschrittene Nekrose im elektronmikroskopischen Bild. p. 64. In: F. Lüthy, A. Bischoff (Eds.). *Proc. V. Intern. Congr. Neuropath. Amsterdam-Excerpta Med. Found.* 1966.
11. Hirano A., Levine S., Zimmerman H.: Experimental cyanide encephalopathy-electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1967, 26, 200—213.
12. Ibrahim M. Z. M., Miguel J., Haymaker W.: Glycogen, phosphorylase and branching enzyme in experimental and pathological conditions of the rat brain. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1968, 27, 119.
13. Ibrahim M. Z. M., Pascoe E., Alam S., Miguel J.: Glycogen and phosphorylase activity in rat brain during recovery from several forms of hypoxia. *Amer. J. Pathol.*, 1970, 60, 403—420.
14. Ito U., Go G., Spatz M., Klatzo I.: Cerebrovascular reactions to ischemia in the mongolian gerbil. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 183—192.
15. Krisman C. R.: A method for the colometric estimation for glycogen with iodine. *Anal. Biochem.*, 1962, 4, 17.

16. Long D. M., Mossakowski M. J., Klatzo I.: Glycogen accumulation in spinal motor neurons due to partial ischemia. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1972, 20, 335—347.
17. Mossakowski M. J., Long D. M., Myers R. E., Curet H. R., Klatzo I.: Early histochemical and ultrastructural changes in perinatal asphyxia. *J. Neuro-pathol. exp. Neurol.*, 1968, 27, 500—516.
18. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w mózgu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropat. Pol.*, 1973, 11, 53—63.
19. Mossakowski M. J., Zelman I.: Zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym na skutek niedoboru tlenowego w warunkach doświadczalnych. *Postępy Astronautyki*, 1971, Suppl. 1, 37—50.
20. Pronaszko-Kurczyńska A., Mossakowski M. J., Ostenda M., Korthals J.: Zmiany zawartości glikogenu w mózgu w doświadczalnej ischemii. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 281—296.
21. Rivera A., Jr., Brann A. W., Jr., Myers R. E.: Brain glycogen of the recovering asphyxiated monkey newborn. *Exp. Neurol.*, 1970, 26, 309—315.
22. Śmiałek M., Sikorska M., Korthals J., Bicz W., Mossakowski M. J.: The glycogen content and its topography and UDPglucose-glycogen-alfa-4-glucosyltransferase (E.C. 2.4.1.11) activity in rat brain after experimental carbon monoxide intoxication. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1973, 24, 222—231.
23. Watanabe H., Passonneau J. V.: Factors affecting the turnover of cerebral glycogen and limit dextrin in vivo. *J. Neurochem.*, 1973, 20, 1543—1554.

Adres autora: Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa.



MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, ROMAN GADAMSKI

ZABURZENIA MIKROKRĄŻENIA MÓZGOWEGO  
U CHOMIKÓW MONGOLSKICH (*Meriones unguiculatus*)  
PO JEDNOSTRONNYM PODWIĄZANIU TĘTNICY SZYJNEJ  
WSPÓLNEJ

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

Zaburzeniom mikrokrążenia mózgowego przypisuje się istotną rolę w patogenezie nieprawidłowości metabolicznych i strukturalnych w ośrodkowym układzie nerwowym w różnych typach niedotlenienia (Brown, Brierley 1968, Ginsberg, Myers 1974, Mossakowski, Zelman 1975, Zelman, Mossakowski 1975). Zwrócono przy tym uwagę na fakt, że zróżnicowane w swoim charakterze i dynamice zaburzenia mikrokrążenia mózgowego występowały nie tylko w okresie działania czynnika szkodliwego, lecz utrzymywały się przez dłuższy czas (do 48 godzin) po jego ustaniu (Mossakowski 1974, 1975, Wierzba 1977).

W badaniach nad skutkami niedokrwienia ośrodkowego układu nerwowego, prowadzonych na chomikach mongolskich z jednostronnym okresowym podwiązaniem tętnicy szyjnej wspólnej wykazano występowanie uszkodzeń mózgu, zróżnicowanych w nasileniu i w czasie ujawniania się w zależności od długości trwania niedokrwienia. Przy czym zmiany te występowały nie tylko po stronie podwiązanej tętnicy szyjnej, lecz również, acz w znacznie mniejszym nasileniu w półkuli przeciwległej (Ito i wsp. 1975, Klatzo 1975, Mossakowski, Gadamski 1977). Wobec nieprawidłowości ukształtowania tętniczego pierścienia podstawy mózgu, występującej u około 30% chomików mongolskich (Kahn 1972) należało oczekiwać zmian ograniczonych do półkuli zaopatrywanej w krew przez niedrożną tętnicę.

Spostrzeżenia te skłoniły nas do oceny zachowania się mikrokrążenia mózgowego u chomików mongolskich po jednostronnym niedokrwieniu mózgu.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenie przeprowadzono na 49 dojrzałych chomikach mongolskich obu płci, o ciężarze ciała około 60—80 g. Zwierzętom doświadczalnym w lekkiej narkozie eterowej zaciskano atraumatycznie wyłonioną z pęczka nerwowo-naczyniowego tętnicę szyjną wspólną lewą na okres 5, 10 i 15 min. Po zwolnieniu zacisku ranę zeszywano szwem skórnym. Zwierzęta wszystkich grup dekapitowano bez narkozy, bezpośrednio po zdjęciu zacisku z tętnicy szyjnej, a następnie po 1, 3, 6, 12, 24 i 48 godzinnym przeżyciu. Mózgi utrwalano w 10% formalinie i krojono na bloki cięciami w płaszczyźnie czołowej, prowadzonymi na wysokości przedniego odcinka zwojów podstawy, w pełni rozwiniętych zwojów podstawy z całkowitym przekrojem zawoju hipokampa oraz pogranicza mostu i opuszki. Wolno pływające skrawki z mikrotomu zamrożeniowego barwiono wg benzydynowej metody Pickwortha.

W oparciu o kliniczne kryteria Kahna (1972) zwierzęta doświadczalne podzielono na grupę objawową i bezobjawową. W grupie zwierząt objawowych, bezpośrednio po wyjściu z narkozy obserwowano ruchy rotacyjne dookoła długiej osi ciała lub rzadziej kręcenie się po obwodzie koła o średnicy 15—20 cm w kierunku podwiązanej tętnicy. U zwierząt bezobjawowych nie obserwowano żadnych nieprawidłowości neurologicznych, poza zespołem Hornera. U zwierząt zabijanych bezpośrednio po niedokrwieniu o zaliczeniu do grupy objawowej decydowało zblednięcie powierzchni półkuli mózgu po stronie zaciśniętej tętnicy szyjnej.

Dwa chomiki nie poddane żadnym zabiegom doświadczalnym służyły jako kontrole.

## WYNIKI

U zwierząt kontrolnych bogatą sieć naczyniową kory mózgu charakteryzuje warstwowy układ angioarchitektoniczny odpowiadający warstwowej strukturze kory. Większe naczynia tętnicze i żyłne przebiegają promieniście w stosunku do jej powierzchni. W zawoju hipokampa zwraca uwagę zagęszczenie sieci naczyń włosowatych w warstwie komórek piramidowych. Jądra podstawy i wzgórze charakteryzuje bogata, gęsta sieć naczyniowa, nie wykazująca typowych układów angioarchitektonicznych. Unaczynienie istoty białej jest znacznie uboższe niż formacji szarych półkul mózgu. Wyróżniają się w niej liczne, stosunkowo szerokie naczynia żyłne, układające się równolegle do przebiegu pasm włókien nerwowych. Angioarchitektonikę mózdzku charakteryzuje zagęszczenie sieci naczyń włosowatych w warstwie ziarnistej i komórek



Purkinjego przy słabszym unaczynieniu warstwy drobinowej kory i skąpym blaszek istoty białej. Sieć naczyniową pnia mózgu wyróżnia naprzemienna mozaika zagęszczeń i rozrzedzeń kapilarnych odpowiadających ugrupowaniom istoty szarej i białej.

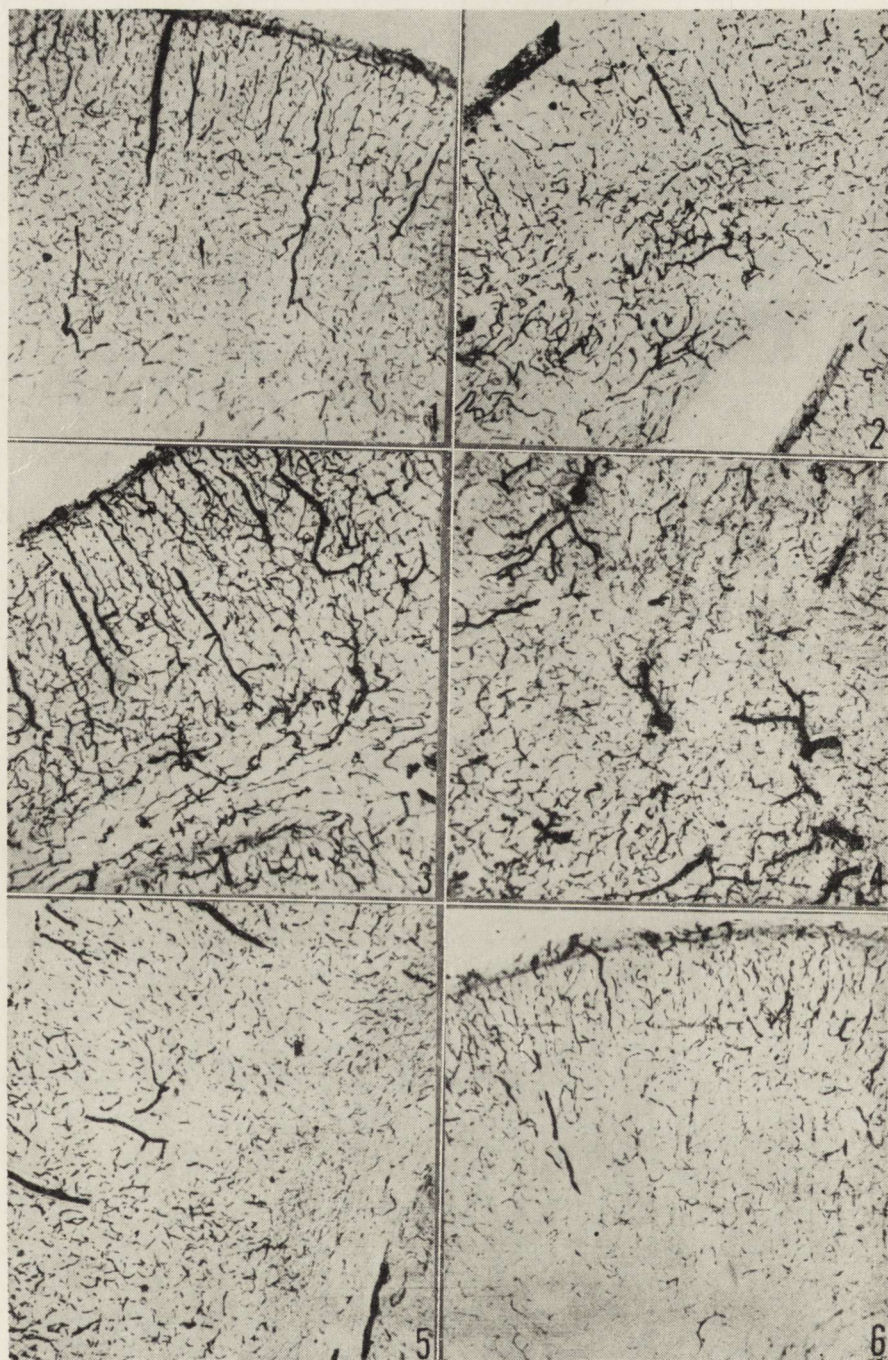
Grupa zwierząt objawowych. Podstawowy wzorec nieprawidłowości obrazu morfologicznego sieci naczyniowej w strukturach półkuli mózgu homolateralnej do podwiązanej tętnicy szyjnej był podobny u wszystkich zwierząt. Jednakowa była topografia zmian i te same obszary najgłębszych nieprawidłowości. Najbardziej nasilone zmiany spostrzegano w korze mózgu na powierzchni wypukłej półkuli w jej przednim odcinku, w jądrach podstawy, wzgórzu i w zawoju hipokampa. Znacznie słabiej wyrażone nieprawidłowości występowały w korze mózgu na podstawowej powierzchni półkuli. Miejscem predykccyjnym często spotykanych, głębokich zaburzeń obrazu morfologicznego sieci naczyniowej były boczne ugrupowania jąder wzgórza.

Wyraźne zróżnicowanie nasilenia i dynamiki zmian w obrazie morfologicznym sieci naczyniowej mózgu w poszczególnych grupach zwierząt uzasadnia ich oddzielne omówienie.

U zwierząt, u których podwiązanie tętnicy szyjnej trwało 5 min. zwolnienie zacisku prowadziło do pojawienia się umiarkowanych cech przekrwienia wszystkich formacji szarych półkuli, nakładających się na skądinąd niezmienny obraz ich sieci naczyniowej (ryc. 1). Cechy przekrwienia wyrażały się bogatszym wypełnieniem elementami krwi promienistych naczyń kory mózgu oraz większych żył jąder podstawy i wzgórza. Po upływie godziny obserwowano zubożenie sieci naczyń włosowatych z równoczesnym nierównomiernym rozłożeniem przepelnionych krwią żył. Zjawisko to było jeszcze wyraźniejsze w 3 godz. po zwolnieniu zacisku (ryc. 2) i prowadziło do zatarcia prawidłowej angioarchitektoniki kory mózgu. W 6 godz. skąpe wypełnienie sieci kapilarnej było wyraźne tylko w tej części kory mózgu, którą można uznać za obszar pogranicza unaczynienia tętnicy mózgu środkowej i przedniej. Towarzyszyły mu plackowate ogniska zubożenia sieci naczyń włosowatych, rozsiane w korze i we wzgórzu. Normalizacja obszaru morfologicznego sieci naczyniowej niedokrwionej półkuli następowała po 12 godz. po zdjęciu zacisku.

U zwierząt, u których niedokrwienie mózgu trwało 10 min. bezpośrednio po zwolnieniu zacisku stwierdzano uogólnione cechy przekrwienia, obejmującego formacje szare i białe półkuli. Wyrażało się ono przepelnieniem wybarwionymi erytrocytami wszystkich elementów sieci naczyniowej (ryc. 3). Przeważało jednak przekrwienie dużych naczyń żylnych, zwłaszcza w korze, istocie białej półkuli i w jądrach podstawy (ryc. 4). Po upływie godziny wypełnienie sieci naczyń włosowa-







tych zmniejszało się, duże żyły były nadal znacznie poszerzone. Uderzającym zjawiskiem było nierównomierne rozłożenie przepelnionych krwią naczyń żylnych (ryc. 5). Te same nieprawidłowości obrazu morfologicznego występowały w 3 godzinie po niedokrwieniu. Zwracało uwagę bogate wypełnienie krwią naczyń położonych w bezpośrednim sąsiedztwie pól ze zubożałą siecią naczyń włosowatych. Zjawisko to było szczególnie nasilone w obszarach pogranicza unaczynienia w korze nowej (ryc. 6) i w polu  $H_1$  rogu Amona. Normalizacja obrazu sieci naczyniowej rozpoczęła się w 12 godzinie po niedokrwieniu, jakkolwiek drobne rozsiane ogniska ubożego ukrwienia utrzymywały się do 24 godziny.

Obraz sieci naczyniowej niedokrwionej półkuli mózgu u zwierząt z 15-minutowym podwiązaniem tętnicy szyjnej bezpośrednio po zwolnieniu zacisku charakteryzował się zatarciem prawidłowych struktur angioarchitektonicznych, związanym z bardzo znacznym przekrwieniem z równoczesnym nierównomiernym rozkładem przepelnionych krwią naczyń żylnych przy słabym uwidocznieniu sieci kapilarnej (ryc. 7). Te same właściwości stwierdzano w kolejnych okresach obserwacji (ryc.

*Ryc. 1.* Zwierzę objawowe z 5 min. niedokrwieniem. Silnie wypełnione naczynia żyłne na tle stosunkowo niezmięnionej sieci naczyniowej bezpośrednio po zdjęciu zacisku z tętnicy szyjnej. Pow. 60 ×

*Fig. 1.* Symptomatic animal, 5 min ischemia. Strongly impleted veins on the background of relatively unchanged vascular network, immediately after removal of the clamp from carotid artery. × 60

*Ryc. 2.* Zwierzę objawowe z 5 min. niedokrwieniem. Nierównomierne wypełnienie naczyń, zagęszczenia poszerzonych żył po 3 godz. od zdjęcia zacisków. Pow. 60 ×

*Fig. 2.* Symptomatic animal, 5 min ischemia. Unequal impletion of vessels, grouping of distended veins 3 h after removal of the clamps. × 60

*Ryc. 3.* Zwierzę objawowe z 10 min. niedokrwieniem. Silne przekrwienie kory, istoty białej i jąder podstawy bezpośrednio po zdjęciu zacisku. Pow. 60 ×

*Fig. 3.* Symptomatic animal, 10 min ischemia. Severe hyperemia of cortex, white matter and basal ganglia immediately after removal of the clamp. × 60

*Ryc. 4.* Zwierzę objawowe z 10 min. niedokrwieniem. Znaczne poszerzenie naczyń żylnych we wzgórzu, bezpośrednio po zdjęciu zacisku. Pow. 100 ×

*Fig. 4.* Symptomatic animal, 10 min ischemia. Marked dilatation of thalamic veins, immediately after removal of the clamp. × 100

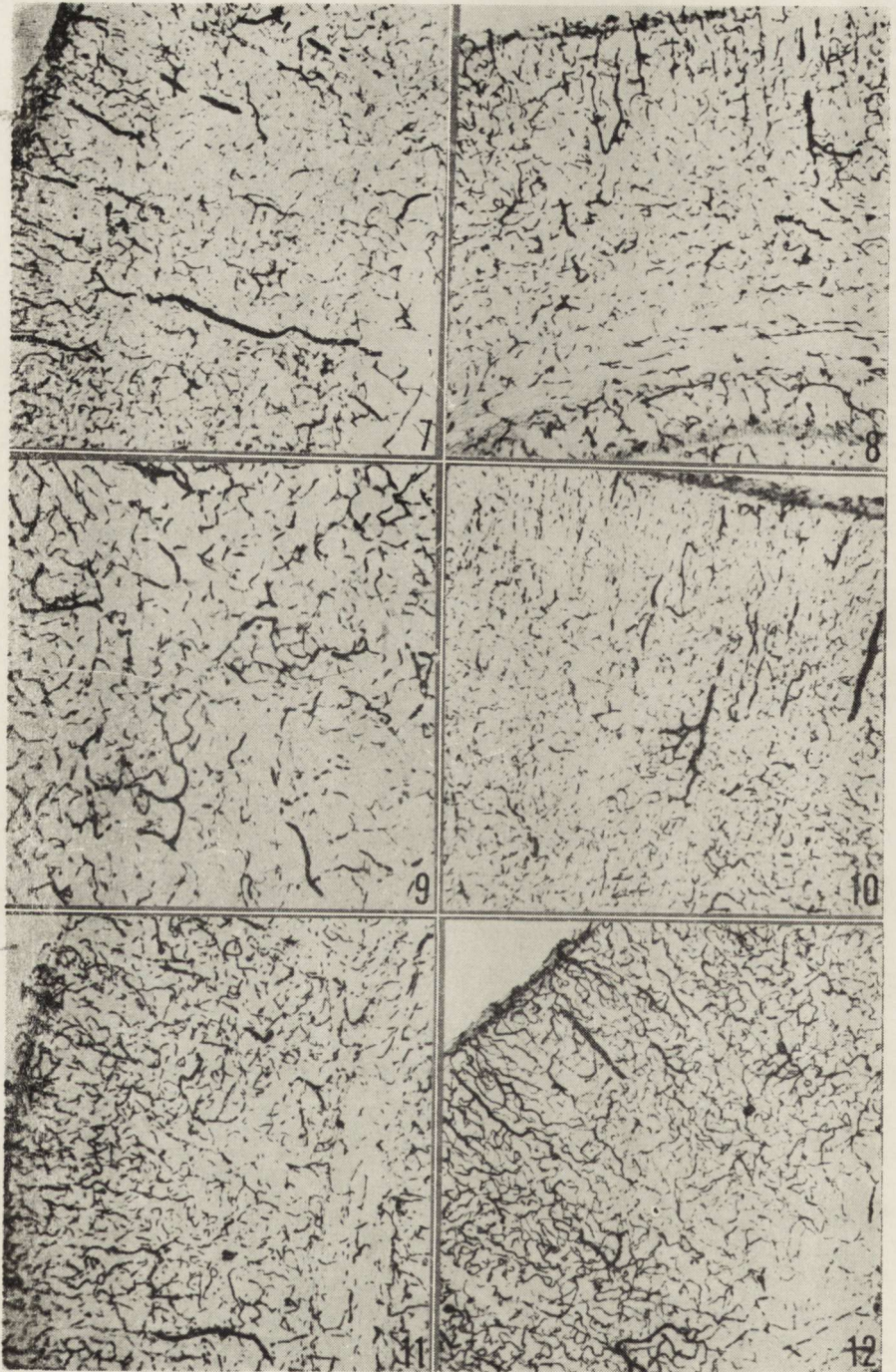
*Ryc. 5.* Zwierzę objawowe z 10 min. niedokrwieniem. Osłabione wypełnienie sieci naczyń włosowatych kory z nierównomiernym układem poszerzonych żył. Pow. 60 ×

*Fig. 5.* Symptomatic animal, 10 min ischemia. Decreased impletion of cortical capillary network, unequal pattern of distended veins × 60

*Ryc. 6.* Zwierzę objawowe z 10 min. niedokrwieniem. Rozległe pole o zatartym rysunku sieci naczyń włosowatych otoczone naczyniami dobrze wypełnionymi krwią w 3 godz. po zdjęciu zacisku. Pow. 60 ×

*Fig. 6.* Symptomatic animal, 10 min ischemia. Vast area displaying blurred pattern of capillary network is surrounded by the fully filled blood vessels 3 h after removal of the clamp. × 60







8), aż do 12 godziny z tym jednak, że cechy przekrwienia żylnego stopniowo zmniejszały się (ryc. 9). Procesy normalizacyjne występowały dopiero w 24 godz., jednakże nawet wówczas obecne były liczne, plackowate ogniska słabego ukrwienia rozsiane w korze mózgu i w jądrach podstawy (ryc. 10). Pełną normalizację stwierdzono dopiero po 48 godzinach.

W półkuli przeciwległej do podwiązanej tętnicy szyjnej stwierdzano również cechy przekrwienia występujące we wczesnych okresach po zwolnieniu zacisku. Spotykano również, stosunkowo nieliczne, drobne ogniska upośledzonego ukrwienia, zarówno w korze mózgu (ryc. 11), jak i we wzgórzu. Występowały one częściej u zwierząt, u których niedrożność tętnicy szyjnej trwała 10 i 15 min. W 12 godzin po zabiegu obraz sieci naczyniowej nie różnił się od stwierdzanego u zwierząt kontrolnych.

*Ryc. 7.* Zwierzę objawowe z 15 min. niedokrwieniem. Silne przekrwienie kory z nierównomiernym wypełnieniem sieci naczyniowej, bezpośrednio po zdjęciu zacisku. Pow. 60 ×

*Fig. 7.* Symptomatic animal, 15 min ischemia. Severe hyperemia of the cortex, unequal impletion of vascular network, immediately after removal of the clamp. × 60

*Ryc. 8.* Zwierzę objawowe z 15 min. niedokrwieniem. Silne przekrwienie kory mózgu z licznymi polami zubożonego ukrwienia w 3 godz. po zdjęciu zacisku. Pow. 60 ×

*Fig. 8.* Symptomatic animal, 15 min ischemia. Severe hyperemia of cerebral cortex with many areas of poor blood supply 3 h after removal of the clamp. × 60

*Ryc. 9.* Zwierzę objawowe z 15 min. niedokrwieniem. Nierównomierne wypełnienie sieci naczyń wzgórza w 6 godz. po zdjęciu zacisku. Pow. 60 ×

*Fig. 9.* Symptomatic animal, 15 min ischemia. Unequal impletion of the thalamic vascular network, 6 h after clamp removal. × 60

*Ryc. 10.* Zwierzę objawowe z 15 min. niedokrwieniem. Drobne pola zubożonego ukrwienia na tle prawidłowego rysunku sieci naczyniowej kory mózgu, w 24 godz. po zdjęciu zacisku. Pow. 60 ×

*Fig. 10.* Symptomatic animal, 15 min ischemia. Small areas of poor blood supply on the background of normal vascular network of cerebral cortex, 24 h after clamp removal. × 60

*Ryc. 11.* Zwierzę objawowe z 15 min. niedokrwieniem. Umiarkowane przekrwienie kory mózgu z małym polem zubożonego ukrwienia w 3 godz. po zdjęciu zacisku. Półkula mózgu przeciwległa do niedrożnej tętnicy. Pow. 60 ×

*Fig. 11.* Symptomatic animal, 15 min ischemia. Moderate hyperemia of cerebral cortex with small area of poor blood supply, 3 h after clamp removal. Hemisphere contralateral to the ligated artery. × 60

*Ryc. 12.* Zwierzę bezobjawowe, 15 min. podwiązanie tętnicy szyjnej lewej. Prawidłowy rysunek sieci naczyniowej kory z niewielkim półkiem uboższego ukrwienia. Pow. 60 ×

*Fig. 12.* Asymptomatic animal, 15 min ligation of the left carotid artery. Normal pattern of the vascular network of the cortex with small field of poor blood supply. × 60

Grupa zwierząt bezobjawowych. W większości przypadków w obu półkulach mózgu nie stwierdzano wyraźnych nieprawidłowości w obrazie sieci naczyniowej. Jednak u pojedynczych zwierząt, u których podwiązanie tętnicy trwało 10 i 15 min. występowały drobne rozsiane ogniska upośledzonego ukrwienia kory mózgu (ryc. 12). Spostrzegano je częściej we wczesnych okresach po zabiegu doświadczalnym i to głównie w półkuli homolateralnej.

#### OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań wskazują, że krótkotrwałe jednostronne podwiązanie tętnicy szyjnej u chomików mongolskich prowadzi do głębokich nieprawidłowości w obrazie morfologicznym sieci naczyniowej mózgu, występujących przede wszystkim, choć nie wyłącznie, w obrębie unaczynienia niedrożnej tętnicy. Czas trwania okresowej niedrożności tętnicy modyfikuje w sposób zasadniczy obraz nieprawidłowości morfologicznych ukrwienia mózgu oraz dynamikę cofania się zmian. Zdjęcie utrzymywanego przez 5 min. zacisku prowadzi do stosunkowo niewielkiego przekrwienia mózgu nakładającego się na skądinąd prawidłowy obraz sieci naczyniowej. Niedrożność 10-minutowa wyzwała po zdjęciu zacisku masywne uogólnione przekrwienie mózgu, a 15-minutowa zatarcie prawidłowych układów angioarchitektonicznych, związane z ciężkim przekrwieniem, nierównomiernym rozkładem przepelnionych krwią żył i zatarciem rysunku sieci kapilarnej. Pełna normalizacja obrazu układu naczyniowego w przypadku 5-minutowej niedrożności tętnicy występowała w 12 godzinie po niedokrwieniu, przy 10-minutowej niedrożności — w 24 godzinie, a przy 15-minutowej nawet po 48 godzinach stwierdzano obrazy nieprawidłowego ukrwienia tkanki.

Mimo wspomnianego zróżnicowania intensywności i dynamiki strukturalnych wykładników zaburzeń ukrwienia mózgu, uwarunkowanego czasem trwania niedrożności tętnicy, charakteryzował je wspólny jakościowy wzorzec. Składały się nań cechy uogólnionego przekrwienia tkanki, z przewagą przekrwienia żylnego, regionalne nasilenie zmian oraz obecność ogniskowego, rozsianego zubożenia sieci naczyniowej, nakładającego się bądź na tło przekrwienia bądź też normalizującej się sieci naczyń. Ta grupa zaburzeń ukrwienia utrzymywała się najdłużej, niekiedy do końca obserwacji. Występowały one nie tylko po stronie podwiązanej tętnicy, lecz również w półkuli przeciwległej, a nawet u zwierząt bezobjawowych.

Cechy uogólnionego przekrwienia mózgu po niedotlenieniu typu hipoksyjnego, histotoksycznego i hipowolemicznego odnoszono do ogólnoustrojowych zaburzeń hemodynamicznych, stanowiących skutek niedo-



statku tlenowego (Brown, Brierley 1968, Kapuściński 1974, Mossakowski 1974, 1975, Wierzba 1977). Ten wysoce prawdopodobny i udowodniony w niektórych typach niedotlenienia mechanizm jest mniej jednoznaczny w przypadku jednostronnego podwiązania tętnicy szyjnej. Na jego ewentualny udział wskazują spostrzeżenia Ito i wsp. (1976), którzy wykazali, że w znacznym odsetku przypadków zdjęciu zacisku z tętnicy szyjnej u chomików mongolskich towarzyszy ostry spadek układowego ciśnienia krwi. Na tę możliwość wskazuje również obustronność przekrwienia mózgu, spostrzegana w naszym materiale we wczesnych okresach po zdjęciu zacisku z tętnicy.

Uogólnione nieprawidłowości ukrwienia mózgu ulegają regionalnej modyfikacji. Cechy zubożenia sieci naczyniowej mózgu, niezależnie od fazy po niedokrwieniu występują powtarzalnie w tych samych okolicach ośrodkowego układu nerwowego. Są to okolice kory mózgu i wzgórza, które przez analogię do unaczynienia OUN u ludzi można uznać za pole graniczne między obszarami ukrwienia dużych tętnic, przede wszystkim przedniej i środkowej mózgu. Jest faktem powszechnie uznanym, że w obszarach pogranicza unaczynień dochodzi do najgłębszych zmian w przypadku układowych zaburzeń hemodynamicznych (Zülch 1955). Głębsze nieprawidłowości ukrwienia dotyczyły również takich struktur, jak odcinek  $H_1$  kory amonalnej oraz przednia część jąder podstawy. Wydaje się uzasadnione wiązać to umiejscowienie zmian z regionalnymi właściwościami angioarchitektonicznymi, pomimo braku opracowań w tym zakresie dotyczących chomików mongolskich.

Najtrudniejsze do wyjaśnienia są ogniskowe zaburzenia ukrwienia mózgu, występujące w postaci plackowatego bądź przekrwienia, bądź częściej niedokrwienia poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego, z wyraźną predylekcją do kory mózgu. Zmiany tego samego typu opisywano w innych rodzajach niedostatku tlenowego (Mossakowski 1974, 1975, Wierzba 1977). W przypadku niedotlenienia hipowolemicznego wiązano je z zaburzeniami mechanizmów autoregulacyjnych krążenia mózgowego, wykazanymi w tym samym modelu doświadczalnym przez Mchedlishvili i Baramidze (1974). Przyjmując ten sam mechanizm w niedokrwieniu mózgu związanym z jednostronnym podwiązaniem tętnicy szyjnej u chomików mongolskich, otwarte pozostaje zagadnienie, czy mechanizmy autoregulacyjne zostają zaburzone przez wpływ niedokrwienia na elementy nerwowe regulujące przepływ mózgowy (Rosendorf 1974), czy też w następstwie nieprawidłowości metabolicznych tkanki, rozwijających się wskutek niedokrwienia. Spostrzeżenia Gadamskiego (1977) dotyczące zmian w unerwieniu adrenergicznym naczyń opony miękkiej w niedokrwieniu mózgu u chomików mongolskich popierają pierwszą możliwość. Za neurogennym mechanizmem

ogniskowych zaburzeń ukrwienia mózgu przemawia również ich obustronność, jak i występowanie u zwierząt bezobjawowych. Na korzyść drugiej możliwości świadczą wyniki badań Mrsulji i wsp. (1976), którzy wykazali związek czasowy między zaburzeniami przepływu mózgowego i zmianami zawartości amin katecholowych w tkankach mózgu po jednostronnym niedokrwieniu u chomików mongolskich. Nie można również odrzucić miejscowego działania prostaglandyn, których wzrost w mózgu w niedokrwieniu i niedotlenieniu wykazał Ruszczewski (1977).

Niezależnie od mechanizmu patogenetycznego tego typu zmian w ukrwieniu ośrodkowego układu nerwowego w następstwie niedokrwienia, mogą one odgrywać ważną rolę w rozwoju poniedokrwiennych uszkodzeń strukturalnych mózgu. Ich bezpośredni związek z ogniskowymi uszkodzeniami tkankowymi został wykazany w doświadczeniach prowadzonych na modelu niedotlenienia hipowolemicznego (Mossakowski, Zelman 1975). Obustronność zmian może tłumaczyć występowanie nieprawidłowości metabolicznych (Mrsulja i wsp. 1976) i uszkodzeń strukturalnych (Mossakowski, Gadamski 1977) spostrzeganych w półkuli mózgu przeciwległej do niedrożnej tętnicy szyjnej.

М. Я. Моссаковски, Р. Гадамски

НАРУШЕНИЯ МОЗГОВОГО МИКРОКРОВООБРАЩЕНИЯ У МОНГОЛЬСКИХ ХОМЯКОВ (*MERIONES UNGUICULATUS*) ПОСЛЕ ОДНОСТОРОННЕЙ ПЕРЕВЯЗКИ ОБЩЕЙ СОННОЙ АРТЕРИИ

Резюме

Проведена оценка морфологии сосудистой сети мозга у монгольских хомяков, которым перевязывали левую общую сонную артерию на 5, 10 и 15 мин. Исследования выполнены на 49 взрослых животных, которых на основании клинических наблюдений разделили на группы животных с симптомами и без симптомов. Животных обеих групп обезглавливали непосредственно после снятия зажима с артерии, а также через 1, 3, 6, 12, 24 и 48 часов переживания. Установлено, что у животных с клиническими симптомами ишемии происходили глубокие нарушения морфологии сосудистой сети мозга, в главной мере в области, васкуляризированной непроходимой артерией. Продолжительность временной непроходимости артерии модифицировала картину нарушений кровоснабжения мозга и их динамику. Они были тем тяжелее и сохранялись тем дольше, чем дольше продолжалась временная ишемия полушария. Они характеризовались обобщенной гиперемией ткани с преобладанием венозной гиперемии, модифицированной в отдельных случаях местными ангиоархитектоническими различиями и наличием очагового рассеянного обеднения сосудистой сети, накладывающегося на гиперемический фон. Обобщенную пассивную гиперемию связывали с гемодинамическими нарушениями системы, а очаговую ишемию — или с местными особенностями формирования сосудистой сети, или с нарушениями механизмов авторегуляции.



У животных без симптомов имели место сходные, но значительно менее сильные нарушения мозгового кровообращения. Сделано предположение, что возникающие после ишемии нарушения мозгового микрокровообращения играют существенную роль в патомеханизме структурных повреждений мозга.

M. J. Mossakowski, R. Gadamski

IMPAIRMENT OF CEREBRAL MICROCIRCULATION IN MONGOLIAN GERBILS (*MERIONES UNGUICULATUS*) AFTER UNILATERAL COMMON CAROTID ARTERY LIGATION

Summary

Evaluation of cerebral vascular network in Mongolian gerbils in which left common carotid artery was ligated for 5, 10 and 15 min has been performed. Investigation was carried out on 49 adult gerbils, which on the ground of clinical observations, have been divided into the group of symptomatic and asymptomatic animals. The animals of both groups were decapitated immediately after removal of the clamp from the artery and after 1, 3, 6, 12, 24 and 48 h survival. It was found that the gerbils with clinical signs of ischemia presented severe morphological changes in cerebral vascular network, predominantly in areas supplied by the ligated artery. Impairment of blood supply and its dynamics was dependent on the duration of temporary arterial occlusion. The changes were more severe and lasted longer the longer lasted temporary ischemia of the hemisphere. They were characterized by generalized hyperemia, mainly venous congestion, modified in particular areas of the brain by the regional differences in angioarchitecture and by the multifocal impoverishment of vascular network imposing upon hyperemic background. Generalized venous congestion was considered to be connected with systemic hemodynamic disturbances, whereas the focal ischemia either with local differences in the structure of vascular network or with disturbances in autoregulatory mechanism.

In asymptomatic animals the disturbances in cerebral blood supply were similar but less intense. It is suggested that disturbances in cerebral microcirculation following ischemia play an essential role in pathomechanism of structural brain damage.

PÍSMIENNICTWO

1. Brown A. W., Brierley J. B.: The nature, distribution and earliest stages of anoxic-ischemic nerve cell damage in the rat brain as defined by the optic microscope. *Brit. J. Exp. Path.* 1968, 49, 87—107.
2. Gadamski R.: Obraz włókien adrenergicznych w oponie miękkiej szczura i chomika mongolskiego w niedotlenieniu hipoksyjnym, niedokrwieniu i odnerwieniu. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 385—398.
3. Ginsberg M. D., Myers R. E.: Experimental carbon monoxide encephalopathy in the primate. I. Physiologic and metabolic aspects. *Arch. Neurol.* 1974, 30, 202—209.

4. Ito U., Spatz M., Walker Jr. J. T., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1975, 32, 209—223.
5. Ito U., Go K. G., Walker Jr. J. T., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. III. Behaviour of the blood-brain barrier. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1976, 34, 1—3.
6. Kahn K.: The natural course of experimental cerebral infarction in the gerbil. *Neurology* 1972, 22, 510—515.
7. Kapuściński A.: Cerebral blood flow under conditions of circulatory hypoxia with particular reference to the retransfusion period. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 563—572.
8. Klatzo I.: Pathophysiologic aspects of cerebral ischemia. In: *The nervous system. Vol. 1. The Basic Neurosciences.* Ed. B. D. Tower, Raven Press, New York 1975, 313—322.
9. Mchedlishvili G. I., Baramidze D. G.: Functional behaviour of microvascular mechanisms controlling blood supply to cerebral cortex during ischemia and early postischemic periods. *Neuropat. Pol.* 1974, 537—550.
10. Mossakowski M. J.: Cerebral microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 573—581.
11. Mossakowski M. J.: Zaburzenia ukrwienia mózgu w ostrym zatruciu tlenkiem węgla u szczurów. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 241—250.
12. Mossakowski M. J., Zelman I. B.: Dynamics of microcirculation disorders in experimental circulatory hypoxia (ischemia). In: *VII Intern. Congr. Neuropath.* Ed. S. Kornyei, S. Tariska, G. Gosztanyi: *Excerpta Med.*, Amsterdam, Akademiai Kiado, Budapest 1975, 573—576.
13. Mossakowski M. J., Gadamski R.: Wczesne zmiany niedokrwienne w mózgu chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 501—513.
14. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Ito U., Walker Jr. J. T., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. II. Changes in carbohydrates. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1975, 33, 91—103.
15. Mrsulja B. B., Mrsulja B. J., Ito U., Spatz M., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. IV. Behaviour of biogenic amines. *Acta Neuropath. (Berl.)* 1976, 36, 1—8.
16. Rosendorff C.: The neural control of cerebral blood vessels — a brief review and a new hypothesis. In: *Pathology of Cerebral Microcirculation.* Ed. J. Cervos-Navarro, W. de Gruyter, Berlin, New York 1974, 174—183.
17. Ruszczewski P.: Ocena poziomu endogennych prostaglandyn we krwi żyłnej mózgowej psa w warunkach hipokapni, hyperkapni, hipoksji i ostrego niedokrwienia mózgu. *Praca doktorska*, 1977.
18. Wierzba T.: Wpływ niedotlenienia na mikrokrążenie w mózgu szczura. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 183—191.
19. Zelman I. B., Mossakowski M. J.: Some aspects of the pathomechanism of nerve tissue lesions in acute carbon monoxide intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 375—380.
20. Zülch J.: On circulatory disturbances in borderline zones of cerebrum and spinal cord. *Proc. III. Intern. Congr. Neurol. Excerpta Med.* 1955, 894—895.

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



ANNA KOELICHEN-SUDZIŁOWSKA, JOLANTA KWIATKOWSKA,  
MIROŚLAW BESKID

HISTOCHEMICZNA OCENA MÓZGU SZCZURA  
W TOKU SKOJARZONEGO STOSOWANIA ETANOLU  
Z PIRAZOLEM \*)

Pracownia Histochemiczna Zakładu Patofizjologii Komórki  
Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa  
Kierownik Pracowni: prof. dr med. M. Beskid

W prawidłowych warunkach utlenianie alkoholu w komórce odbywa się trzema torami, a mianowicie: poprzez działanie alkoholowej dehydrogenazy (ADH) obecnej w cytosolu, następnie przez enzymy układu mikrosomalnego utleniającego etanol (MEOS — microsomal ethanol oxidizing system), a także za pośrednictwem katalazy. Etanol w komórce pod wpływem NAD-zależnej alkoholowej dehydrogenazy i pod wpływem NADPH-zależnego mikrosomalnego układu utleniającego ulega przekształceniu w aldehyd octowy. Ten z kolei pod wpływem NAD-zależnej aldehydowej dehydrogenazy utleniany jest do octanu. Istnieje wiele substancji, które zmieniają metabolizm etanolu. Substancje te mogą wpływać z jednej strony na procesy przemiany etanolu w aldehyd octowy, z drugiej zaś powodują zaburzenia przekształcania aldehydu octowego w octan (Kissin, 1974).

Wśród substancji wpływających na przemianę etanolu znajduje się również pirazol i jego pochodne. Theorell i Yonetani (1963) dowiedli, że pirazol hamuje w wątrobie czynność dehydrogenazy alkoholowej. Spostrzeżenia te zostały potwierdzone przez Lestera i wsp. (1968), Goldberga i Rydberga (1969) oraz Składzińskiego (1976). Badania Liebera i wsp. (1970 a) ujawniły, że pirazol prowadzi w wątrobie do spadku aktywności alkoholowej dehydrogenazy jak i mikrosomalnego układu utleniającego etanol, a także katalazy.

W piśmiennictwie nie znaleziono opracowań morfologicznych i histochemicznych mózgu zwierząt w toku skojarzonego stosowania etanolu

\*) Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4 koordynowanego przez Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

z pirazolem. Wydało się dlatego celowe podjęcie takich doświadczeń, tym bardziej, że w wątrobie stwierdzono w tych warunkach uszkodzenie mięszu do martwicy włącznie (Składziński, 1976).

#### MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na szczurach, samcach szczepu Wistar o wadze 200—220 g. Przez cały czas doświadczenia zwierzęta otrzymywały standardowe granulowane pożywienie i wodę do picia *ad libitum*. Pirazol i etanol podawano zgłębnikiem do żołądka. Zwierzęta doświadczalne podzielono na 5 grup, po 15 zwierząt w grupie, grupę kontrolną stanowiło 10 zwierząt. Pirazol stosowano w dawce 37 mg/kg ciężaru ciała, etanol w dawce 8,0 g/kg ciężaru ciała w postaci 40% alkoholu. Grupa I zwierząt otrzymywała raz dziennie sam etanol, II grupie zwierząt podawano raz dziennie sam pirazol, grupie III podawano raz dziennie oddzielnie pirazol i etanol, IV grupie podawano dwa razy dziennie oddzielnie pirazol i etanol, grupę V stanowiły zwierzęta kontrolne. Czas podawania pirazolu i etanolu wynosił 30 dni, ostatniego dnia doświadczenia szczury dekapitowano i pobierano do badań wycinki z kory mózgowej. W zależności od wymagań metodycznych badano tkankę nieutrwaloną lub utrwaloną w płynie Bakera w temperaturze 4° C. W materiale nie utrwalonym oznaczano obecność dehydrogenaz: alkoholowej, bursztynianowej, mleczanowej i alfa fosfoglicerolu wg Pearse'a (1961). W skrawkach utrwalonych badano esterazy nieswoiste. Skrawki z bloków parafinowych barwiono hematoksyliną — eozyną.

#### WYNIKI

##### *Dehydrogenaza alkoholowa*

Badany enzym ujawniono w elementach komórkowych kory oraz w pojedynczych, rozproszonych komórkach istoty białej mózgu. Produkt reakcji z reguły miał postać drobnych ziaren i pyłu. Tego typu odczyn spostrzegano w mózgu zwierząt kontrolnych (ryc. 1). Wzrost nasilenia reakcji enzymatycznej w porównaniu do kontroli obserwowano w komórkach nerwowych kory mózgowej zwierząt otrzymujących sam etanol. Produkt reakcji miał również wygląd drobnych ziaren, pyłu i drobnych grudek (ryc. 2). Nie ujawniono natomiast reakcji enzymatycznej w komórkach nerwowych kory mózgowej zwierząt traktowanych samym pirazolem oraz zwierząt otrzymujących pirazol z etanolem. W tych przypadkach jedynie w nielicznych, rozproszonych komórkach spostrzegano reakcję śladową pod postacią pyłu lub pojedynczych ziaren.



*Dehydrogenaza bursztynianowa*

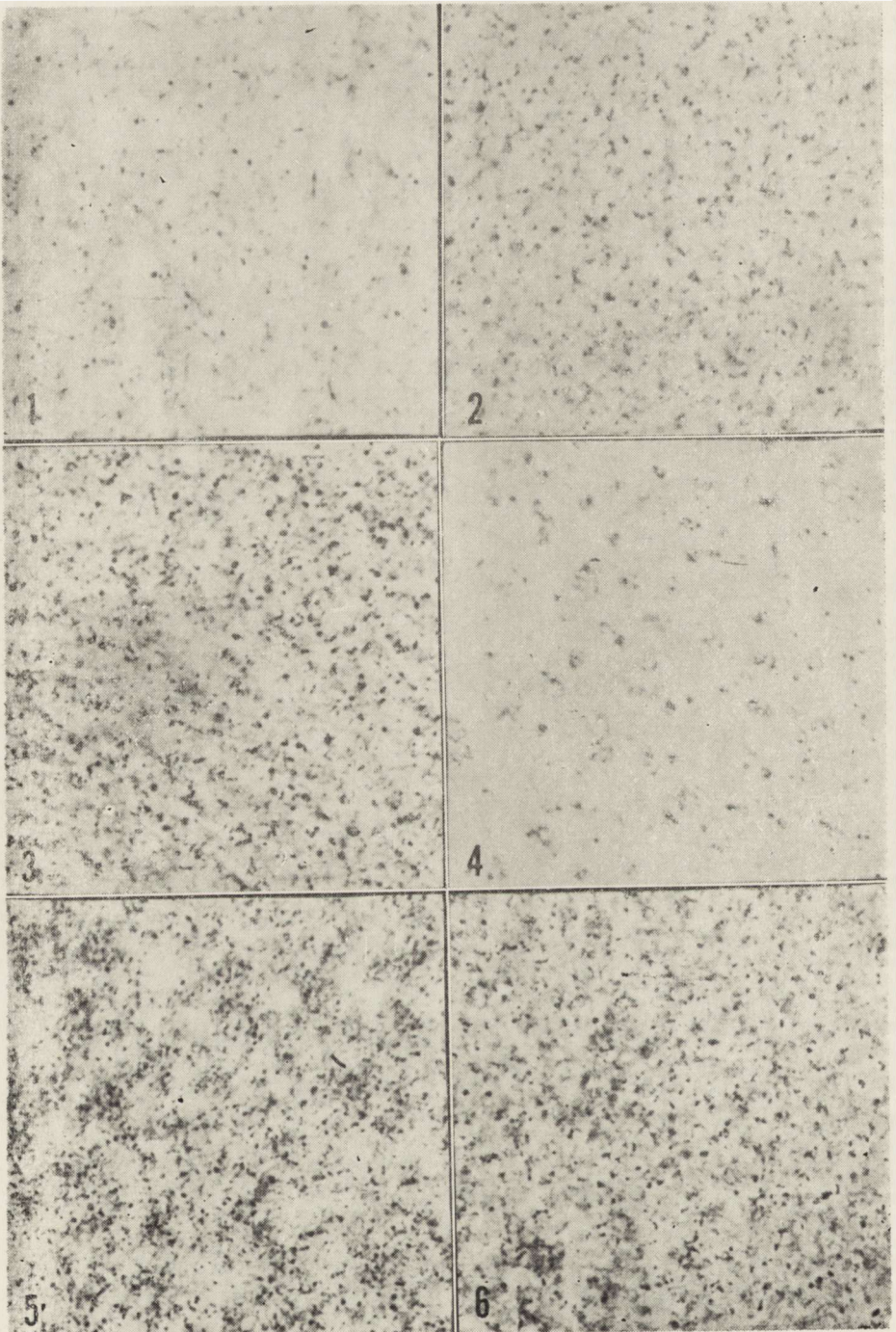
Komórki kory mózgowej zwierząt kontrolnych cechowały się silnym odczynem enzymatycznym. Słabszą reakcją odznaczały się komórki istoty białej (ryc. 3). Nie spostrzegano wyraźnych różnic nasilenia reakcji komórek kory w różnych obszarach mózgu. W toku stosowania samego etanolu obserwowano wyraźne obniżenie odczynu enzymatycznego, głównie komórek kory, w mniejszym stopniu komórek istoty białej mózgu. Wzmoczoną reakcją enzymatyczną odznaczały się natomiast komórki kory mózgowej zwierząt otrzymujących sam pirazol. Nasilenie reakcji w komórkach istoty białej było słabsze w porównaniu do komórek kory. W komórkach kory oraz w komórkach istoty białej mózgu zwierząt traktowanych etanolem i pirazolem stwierdzono silne obniżenie lub ślad reakcji enzymatycznej (ryc. 4).

*Dehydrogenaza mleczanowa*

W warunkach prawidłowych komórki kory mózgu odznaczały się silnym odczynem enzymatycznym. Nikłą reakcję wykazały komórki istoty białej mózgu. Ocena nasilenia reakcji histochemicznej komórek istoty białej z różnych obszarów mózgu nie ujawniła wyraźnych różnic w nasileniu odczynu. Odczyn enzymatyczny komórek kory mózgowej zwierząt otrzymujących sam etanol był obniżony. Obniżenie reakcji spostrzegano również w komórkach rozmieszczonych w obrębie istoty białej mózgu. Odczyn w mózgu zwierząt traktowanych samym pirazolem był wyraźnie obniżony w komórkach kory, nie stwierdzono natomiast różnic w nasileniu reakcji w komórkach istoty białej w porównaniu do kontroli. Skojarzone stosowanie etanolu z pirazolem z reguły prowadziło do znacznego obniżenia reakcji enzymatycznej (odczyn słaby lub śladowy) i to zarówno komórek kory jak i komórek istoty białej.

*Dehydrogenaza alfa fosfoglicerolu*

Komórki kory mózgowej zwierząt kontrolnych odznaczały się silnym odczynem enzymatycznym. Słabszą reakcją spostrzegano w komórkach istoty białej. Tego typu obrazy spostrzegano w komórkach niezależnie od badanego obszaru (ryc. 5). Ocena nasilenia reakcji enzymatycznej mózgu zwierząt traktowanych samym pirazolem lub etanolem wskazuje na niewielkie różnice. Odczyn zazwyczaj był obniżony w porównaniu do kontroli i to niejednokrotnie ogniskowo. Podobne obrazy spostrzegano również w mózgu zwierząt otrzymujących etanol z pirazolem. U





tych zwierząt spadek odczynu był niewielki w porównaniu do kontroli (ryc. 6).

#### *Esteraza nieswoista*

W grupie zwierząt kontrolnych komórki nerwowe kory mózgowej odznaczały się silnym odczynem enzymatycznym (ryc. 7), a słabszą reakcją cechowały się komórki istoty białej. Wyraźne obniżenie reakcji enzymatycznej stwierdzano zarówno w komórkach kory, jak i komórkach istoty białej, gdy zwierzętom podawano sam etanol. Nieznaczne obniżenie reakcji spostrzegano u szczurów traktowanych tylko pirazolem, przy czym spadek nasilenia reakcji był większy w komórkach kory niż istoty białej. Silny spadek odczynu (odczyn słaby lub śladowy) był widoczny w obrębie komórek kory mózgu zwierząt otrzymujących etanol z pirazolem. Wyraźnie silnym odczynem, jednak słabszym w porównaniu do kontroli (ryc. 8), odznaczały się komórki istoty białej.

#### *Badania histologiczne*

W barwieniu przeglądowym mózgu zwierząt doświadczalnych ujawniono morfologiczne zmiany ilościowe i jakościowe w obrębie kory. Ilościową oznaką uszkodzenia kory były opustoszenia komórkowe o roz-

*Ryc. 1.* Szczur kontrolny. Aktywność dehydrogenazy alkoholowej w komórkach kory mózgu. Pow. 250 ×

*Fig. 1.* Control rat. Alcohol dehydrogenase activity in cerebral cortex cells. × 250

*Ryc. 2.* Grupa doświadczalna I. Aktywność dehydrogenazy alkoholowej w komórkach kory mózgowej. Wzrost odczynu w porównaniu do kontroli. Pow. 250 ×

*Fig. 2.* Experimental group I. Alcohol dehydrogenase activity in cerebral cortex cells. Increased reaction in comparison with control × 250

*Ryc. 3.* Szczur kontrolny. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach kory mózgu. Pow. 250 ×

*Fig. 3.* Control rat. Succinic dehydrogenase activity in cerebral cortex cells. × 250

*Ryc. 4.* Grupa doświadczalna III. Aktywność dehydrogenazy bursztynianowej w komórkach kory mózgowej. Silne osłabienie odczynu w porównaniu do kontroli. Pow. 250 ×

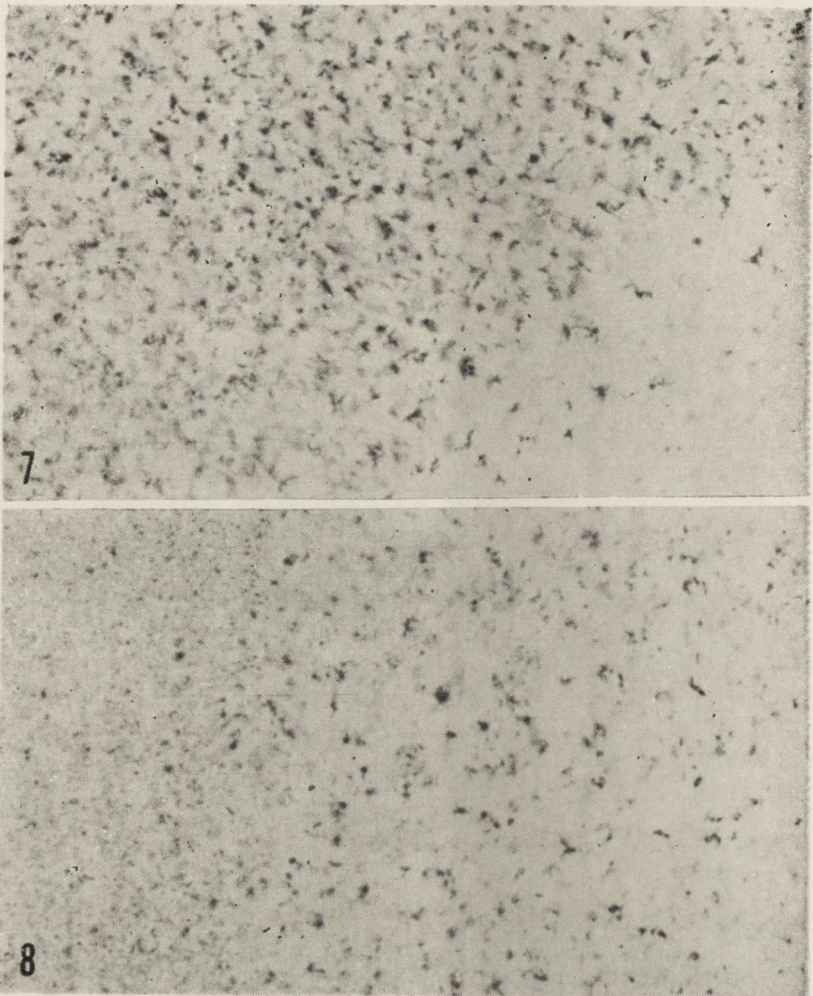
*Fig. 4.* Experimental group III. Succinic dehydrogenase activity in cerebral cortex cells. A marked decrease of reaction in comparison with control. × 250

*Ryc. 5.* Szczur kontrolny. Aktywność dehydrogenazy alfa-fosfoglicerolu w komórkach kory mózgu. Pow. 250 ×

*Fig. 5.* Control rat. Alpha-glycerophosphate dehydrogenase activity in cerebral cortex cells. × 250

*Ryc. 6.* Grupa doświadczalna III. Aktywność dehydrogenazy alfa-fosfoglicerolu w komórkach kory mózgu. Pow. 250 ×

*Fig. 6.* Experimental group III. Alpha-glycerophosphate dehydrogenase activity in cerebral cortex cells. × 250



*Ryc. 7.* Szczur kontrolny. Aktywność esterazy nieswoistej w komórkach kory mózgu. Pow. 250 ×

*Fig. 7.* Control rat. Nonspecific esterase activity in cerebral cortex cells. × 250

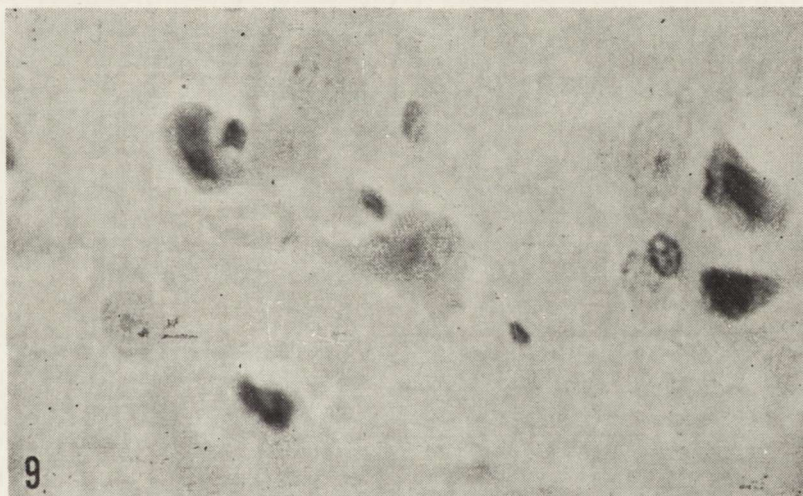
*Ryc. 8.* Grupa doświadczalna III. Aktywność esterazy nieswoistej w komórkach kory mózgowej. Pow. 250 ×

*Fig. 8.* Experimental grup III. Nonspecific esterase activity in cerebral cortex cells. × 250

maitym nasileniu w poszczególnych grupach doświadczalnych. Cechą jakościowych zmian komórek kory były tigróliza i słaba barwliwość cytoplazmy. W obrębie kory mózgowej zwierząt otrzymujących sam etanol stwierdzano niewielkie ogniskowe ubytki komórkowe. U niektórych zwierząt były one bardziej nasilone w zawoju hipokampa a szczególnie w rogu Amona, w innych natomiast występowały w korze mózdzku i



dotyczyły komórek Purkinjego. Zmiany komórkowe w obrębie kory polegały głównie na tigrolie. Cytoplazma takich komórek była homogenna i błado barwiła się eozyną a ich jądra słabo chłoneły barwnik. Jedynie nieliczne komórki miały wydłużone i silnie barwiące się jądra. Opisanym zmianom komórek nerwowych nie towarzyszyły odczyny komórek glejowych. W korze mózgu zwierząt traktowanych samym pirazolem spostrzegano nieliczne, rozsiane drobne ogniska ubytków komórek nerwowych. Uszkodzenie komórek nerwowych polegało na tigrolie. Podobnie jak w grupie poprzedniej, nie obserwowano odczynu glejowego. Skojarzonemu stosowaniu pirazolu z etanolem z reguły towarzyszyły wyraźnie zaznaczone opustoszenia komórek nerwowych kory, zwłaszcza gdy obie te substancje podawano dwa razy na dobę. Ubytki komórkowe miały postać ogniskową. Tego typu ogniska były dość liczne. Opustoszeniu komórkowemu towarzyszyło miejscami zatarcie warstwowej budowy kory (ryc. 9). Zmiany komórkowe miały podobny obraz i nasilenie, jak w korze mózgowej zwierząt traktowanych samym etanolem.



Ryc. 9. Kora mózgowa szczura otrzymującego etanol z pirazolem. H. E. Pow. 750  $\times$   
Fig. 9. Cerebral cortex of rat treated with ethanol and pyrazole. H.E.  $\times$  750

Ocena składu komórkowego kory mózgowej w toku skojarzonego stosowania etanolu z pirazolem, zwłaszcza gdy obie te substancje stosowano dwa razy na dobę, ujawniła obecność dużej liczby komórek satelitarnych. Często tworzyły one małe skupienia, widoczne zazwyczaj w bliskim sąsiedztwie naczyń krwionośnych, a niejednokrotnie ściśle przylegały do uszkodzonych komórek nerwowych.

## OMÓWIENIE

Wyniki histochemiczne przedstawione w pracy wskazują na obecność dehydrogenazy alkoholowej w komórkach mózgu szczura. Enzymatyczny odczyn był wyraźny i w warunkach prawidłowych obecność produktu reakcji ujawniono głównie w elementach komórkowych kory mózgowej oraz w nielicznych komórkach istoty białej. Fakt ten może dowodzić obecności enzymu utleniającego etanol w komórkach zarówno kory, jak i istoty białej i wskazywać, że komórki mózgu biorą bezpośredni udział w przemianie etanolu. W ten sposób mózg należy do pozawątrobowej puli narządów, w których etanol jest utleniany. Własne spostrzeżenia histochemiczne znajdują potwierdzenie w biochemicznych badaniach aktywności dehydrogenazy alkoholowej. Wykazano, że 80—90% dehydrogenazy alkoholowej znajduje się w wątrobie, a pozostała aktywność tego enzymu rozmieszczona jest głównie w tkankach przewodu pokarmowego (Wartburg, 1971). Badania przy użyciu metody biochemicznej ujawniły obecność dehydrogenazy alkoholowej w tkance mózgowej (Wartburg, 1971), a Dewan (1943) stwierdził, że istnieje w mózgu swoista dehydrogenaza alkoholowa (różna od dehydrogenazy alkoholowej wątroby), która bierze udział przy obecności NAD w procesie utleniania etanolu do aldehydu octowego. W mózgu wykryto również obecność aldehydowej dehydrogenazy (Wartburg, 1971).

Badania biochemiczne Liebera i DeCarli (1968) ujawniły w komórkach mózgu obecność drugiego układu przemiany etanolu a mianowicie mikrosomalnego układu utleniającego etanol (MEOS). Własne badania mikroskopowo-elektronowe przemawiają za obecnością tego układu w komórkach nerwowych (Beskid i wsp., 1978).

Obecność zarówno dehydrogenazy alkoholowej i aldehydowej, jak i mikrosomalnego układu utleniającego etanol (MEOS) warunkuje zdolność komórki nerwowej kory mózgu do utleniania etanolu.

Zarówno u zwierząt jak i u człowieka (Mendelson, 1971) nasila się metabolizm etanolu w przypadku jego przewlekłego stosowania. Wzrostowi przemiany etanolu w tych warunkach towarzyszy wzrost aktywności dehydrogenazy alkoholowej w wątrobie (Mendelson, 1971; Wartburg, 1971) oraz mikrosomalnego układu utleniającego etanol (Lieber i wsp., 1970b).

Fakt, że komórka nerwowa kory mózgowej szczura aktywnie uczestniczy w procesie utleniania etanolu ma istotne znaczenie w rozważaniach nad działaniem etanolu na te komórki. Można przyjąć, iż zarówno zaburzenie czynności, jak i uszkodzenie struktury komórki nerwowej mogą łączyć się z bezpośrednim, ujemnym działaniem etanolu oraz mogą być spowodowane metabolicznymi skutkami jego utleniania.



Etanol jako związek drobnocząsteczkowy i łatwo rozpuszczalny zarówno w wodzie jak i w tłuszczach, szybko wnika do wnętrza komórki. Jego przenikania nie hamuje ani bariera krew—mózg, ani też bariera łożyskowa (Mann i wsp., 1975a, b). Przyjmuje się, że etanol bezpośrednio działa na elementy błonowe komórki modyfikując ich czynność. Dowiedziono, że etanol hamuje działanie pompy sodowej w różnych narządach, między innymi w mózgu (Israel i wsp., 1970). Spostrzeżenie to nabiera szczególnego znaczenia, gdy uwzględni się fizjologiczną rolę jonów  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  w czynności komórki nerwowej. Izrael i wsp. (1970) w zaburzeniu działania pompy sodowej dopatrują się głównej przyczyny zmian czynności i struktury mózgu w toku przewlekłego stosowania etanolu.

Histochemicznym wykładnikiem niekorzystnego działania etanolu na mitochondria w przedstawionych doświadczeniach było hamowanie reakcji dehydrogenazy bursztynianowej, znajdujące potwierdzenie również w badaniach biochemicznych aktywności tego enzymu (Oudea i wsp., 1970; Rubin i wsp., 1970).

Ujawniono ponadto, że podawaniu etanolu towarzyszy także obniżenie zawartości cytochromu a i b w komórce (Rubin i wsp., 1970) oraz zaburzenie przebiegu procesów tlenowej fosforylacji (Cederbaum i wsp., 1974). Mitochondria pod wpływem etanolu tracą zdolność do utleniania innych substratów, podczas gdy utlenianie alfa glicerofosforanu nie jest zaburzone (Pilstrom i Kiessling, 1972) albo zwiększone (Kiessling, 1968). W przedstawionych wynikach badań stwierdzono nieznaczne różnice w nasileniu odczynu alfa glicerofosforanowej reduktazy menadionu w komórkach kory mózgowej zwierząt otrzymujących etanol. Podobne wyniki uzyskał Składziński w wątrobie (1976).

Przyjęto, że niekorzystne działanie na komórki przejawia nie tylko sam etanol, ale także aldehyd octowy, metabolit jego utleniania. Aczkolwiek jest on szybko utleniany przez dehydrogenazę, to jednak jego obecność w komórce łączy się z niekorzystnym wpływem na czynność komórki nerwowej. Davis i Walsh (1970) sugerują, iż aldehyd octowy ulega kondensacji z dopaminą i tworzy silnie narkotycznie działającą substancję, której obecność ujawniono zarówno w wątrobie, jak i w mózgu. W mózgu zachodzi ponadto reakcja kondensacji dopaminy z jej produktem utleniania (dihydroxyphenylacetaldehyde) do silnie narkotycznie działającego produktu. Udowodniono przy tym, że obecność aldehydu octowego wzmacnia wymienione reakcje.

Należy dodać ponadto, iż niekorzystne działanie na przemianę komórki wywiera nie tylko sam etanol i jego metabolity ale również zmniejszenie zawartości NAD i NADPH zarówno cytosolu jak i mitochondriów, prowadzące do wielokierunkowych zaburzeń metabolizmu

śródkomórkowego. Wzrostowi poziomowi NADH w komórce towarzyszy wzrost lipogenezy (Lieber i Schmid, 1961), obniżenie utleniania lipidów (Lieber i wsp., 1967), wzrost poziomu kwasu mlekowego (Lieber i Davidson, 1962), zaburzenia glukoneogenezy (Krebs, 1971).

Uzyskane wyniki wykonanych doświadczeń ujawniły, iż sam pirazol prowadzi do różnokierunkowych zaburzeń metabolicznych w komórce. Jest faktem dowiedzionym, iż pirazol, podobnie jak i jego pochodne, jest inhibitorem czynności dehydrogenazy alkoholowej (Theorell i Yonetani, 1963; Lester i wsp., 1968; Goldberg i Rydberg, 1969; Składziński, 1976), drugiego układu przemiany etanolu (MEOS) oraz katalazy (Lieber i wsp., 1970a). Stwierdzono, że pirazol, przy hamowaniu reakcji dehydrogenazy alkoholowej jest stymulatorem odczynu dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej (Składziński, 1976). Podobne wyniki podali Cederbaum i Rubin (1974) na podstawie biochemicznej oceny aktywności enzymatycznej. Jednocześnie stwierdzono, że pirazol, podobnie jak i sam etanol, zaburza procesy tlenowej fosforylacji (Cederbaum i wsp., 1974).

Porównanie nasilenia reakcji histochemicznych w przedstawionych doświadczeniach wyraźnie wskazuje, iż etanol w połączeniu z pirazolem silniej zaburza czynność enzymatyczną komórki niż sam etanol czy też sam pirazol. Skojarzone stosowanie etanolu z pirazolem z reguły prowadziło do silnego hamowania reakcji badanych dehydrogenaz, w tym dehydrogenazy alkoholowej. Jednocześnie ujawniono, że podawaniu tych substancji towarzyszy osłabienie reakcji esteraz nieswoistych. Wymaga to podkreślenia z uwagi na fakt, iż esterazy nieswoiste są w pewnym zakresie również wykładnikiem aktywności cholinesterazy. Spadek aktywności cholinesteraz w mózgu w toku stosowania etanolu opisali Kinard i Hay (1960) oraz Martin i wsp. (1966).

Liczne prace biochemiczne, a między innymi i Składzińskiego (1976) udowodniły, że pirazol hamuje eliminację etanolu z krwi. Można przeto przyjąć, iż pirazol hamuje w komórce utlenianie etanolu i w ten sposób przedłuża niekorzystne, ujemne działanie samego etanolu. Z drugiej strony na zaburzenie śródkomórkowej przemiany wywołanej etanolem nakłada się działanie samego pirazolu.

W obrazie mikroskopowym przejawem uszkodzenia kory mózgowej było wyrodnienie komórek nerwowych i niewielkie ubytki komórkowe. Zastanawia przeto dysproporcja między różnorodnością zaburzeń metabolicznych a nasileniem uszkodzenia struktury komórek nerwowych kory mózgowej. Można wysunąć przypuszczenie, iż komórki nerwowe odznaczają się zdolnością adaptacji, gdyż zaburzenia metaboliczne komórek nerwowych były różnokierunkowe i znaczne, natomiast uszkodzenie struktury kory mózgowej niewielkie.



Za obecnością procesów adaptacyjnych w komórce nerwowej w toku skojarzonego stosowania etanolu z pirazolem mogą przemawiać również badania mikroskopowo elektronowe (Beskid i wsp., 1978). Wykazały one, że poza oznakami uszkodzenia komórek nerwowych występuje w cytoplazmie wyraźnie zaznaczony wzrost struktur złożonych z błon gładkich, które wg Liebera i wsp. (1970b) są siedliskiem nieswoistych, mikrosomalnych enzymów przemiany leku (microsomal drug-metabolizing enzymes system). Substancje metabolizowane przez enzymy mikrosomalne niejednokrotnie zwiększają ich syntezę. Tego typu reakcja jest określana mianem indukcji metabolicznej (Conney, 1967) i jest wrazem enzymatycznej adaptacji komórki. W obrazach mikroskopowo-elektronowych wyznacznikiem indukcji enzymatycznej jest wzrost struktur złożonych z błon gładkich (Iseri i wsp., 1966; Rubin i wsp., 1970; Składziński 1976; Beskid i wsp., 1978).

A. Коелихен-Судзиловска, И. Квятковска, М. Бескид

ГИСТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МОЗГА КРЫСЫ В ХОДЕ СОВМЕСТНОГО  
ПРИМЕНЕНИЯ ЭТАНОЛА И ПИРАЗОЛА

Резюме

Целью работы было исследование совместного действия этанола и пиразола на мозг крысы, особенно на клетки коры. Этанол и пиразол вводили зондом в желудок ежедневно в течение 30 дней. Этанол использовали в дозе 8,0 г/кг веса тела, пиразол в дозе 37 мг/кг веса тела крысы. Проведены гистохимические реакции на сукцинат-, лактат- и альфа-глицерофосфатдегидрогеназу и, кроме того, на неспецифические эстеразы. Полученные результаты показывают, что этанол и пиразол в отдельности, с одной стороны, проявляют сходные свойства, а, с другой стороны, антагонистические свойства. Совместное действие этанола и пиразола отличалось сильным подавлением исследованных дегидрогеназ и неспецифических эстераз. Использование этих веществ приводит к разнородным и резко выраженным метаболическим нарушениям, которые сопровождаются небольшими гистологическими изменениями, что позволяет авторам предположить, что нервные клетки мозговой коры характеризуются способностью к адаптации.

A. Koelichen-Sudzilowska, J. Kwiatkowska, M. Beskid

HISTOCHEMICAL EVALUATION OF RAT BRAIN IN THE COURSE  
OF COUPLED ETHANOL-PYRAZOLE ADMINISTRATION

Summary

The aim of the investigation was the study of the coupled effect of ethanol and pyrazole on rat nerve tissue, especially cerebral cortex cells. Ethanol and pyrazole was administered by gastric tube in daily doses for 30 days; ethanol in

doses 8,0 g/kg body weight, pyrazole in doses 37 mg/kg body weight. Histochemical reactions for following enzymes have been performed: alcohol, succinic, lactic and alpha-glycerophosphate dehydrogenases and nonspecific esterase.

The results indicate that ethanol alone as pyrazole alone reveals similar properties, though they show also some antagonistic ones. A coupled administration of ethanol and pyrazole resulted in a strong inhibition of the studied dehydrogenases and nonspecific esterase. The application of these substances leads to various and strongly marked metabolic disturbances with accompanying slight morphological changes. The results suggest that cells of cerebral cortex possess an ability for adaptation.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Beskid M., Koelichen A., Kwiatkowska J.: Ultrastrukturalna ocena komórek kory mózgowej szczura w toku skojarzonego stosowania etanolu z pirazolem. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 361—363.
2. Cederbaum A. J., Lieber C. S., Rubin E.: Effect of chronic ethanol treatment on mitochondrial functions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1974, 165, 560—569.
3. Cederbaum A. J., Rubin E.: Effects of pyrazole, 4-bromopyrazole and 4-methylpyrazole on mitochondrial function. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 203—213.
4. Conney A. H.: Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Reviews*, 1967, 19, 317—366.
5. Davis V. E., Walsh M. J.: Alcohol amines and alkaloids, a possible biochemical basis for alcohol addiction. *Science*, 1970, 167, 1005—1007.
6. Dewan J. G.: Chemical steps in the metabolism of alcohol by brain in vitro. *Quart. J. Stud. Alc.*, 1943, 4, 357—361.
7. Goldberg L., Rydberg U.: Inhibition of ethanol metabolism in vivo by administration pyrazole. *Biochem. Pharmacol.*, 1969, 18, 1749—1762.
8. Iseri O. A., Lieber C. S., Gottlieb L. S.: The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion. *Am. J. Path.*, 1966, 48, 535—555.
9. Israel Y., Kalant H., Leblanc E., Bernstein J. C., Salazar I.: Changes in cation transport and (Na + K)-activated adenosine triphosphatase produced by chronic administration of ethanol. *J. Pharm. Exp. Therap.*, 1970, 174, 330—336.
10. Kiessling K. H.: Effect of ethanol on rat liver. VI. A possible correlation between alpha-glycerophosphate oxidase activity and mitochondrial size in male and female rats fed ethanol. *Acta Pharmacol.*, 1968, 26, 245—252.
11. Kinard F. W., Hay M. G.: Effect of ethanol administration on brain and liver enzyme activities. *Am. J. Physiol.*, 1960, 198, 657—667.
12. Kissin B.: Interaction of ethyl alcohol and other drugs. W: *The Biology of Alcoholism*, vol. 3, Clinical Pathology, 1974, 109—161.
13. Krebs H. A.: Effects of ethanol gluconeogenesis. W: *Metabolic Changes Induced by Alcohol*, Springer, 1971, 152—156.
14. Lester D., Keokosky W. Z., Falsenberg F.: Effect of pyrazoles and other compounds on alcohol metabolism. *Quart. J. Stud. Alc.*, 1968, 29, 449—454.
15. Lieber C. S., Davidson C.: Some metabolic effects of ethyl alcohol. *Am. J. Med.*, 1962, 33, 319—327.
16. Lieber C. S., DeCarli L. M.: Ethanol oxidation by hepatic microsomes. Adaptive increase after ethanol feeding. *Science*, 1968, 162, 917—918.



17. Lieber C. S., Lefevre A., Spritz N., Feinman L., DeCarli L. M.: Difference in hepatic metabolism of long and medium chain fatty acids. The role of fatty acid chain lenght in the production of the alcoholic fatty liver. *J. Clin. Invest.*, 1967, 46, 1451—1460.
18. Lieber C. S., Rubin E., DeCarli L. M., Misra P., Gang H.: Effects of pyrazole on hepatic function and structure. *Lab. Invest.*, 1970a, 6, 615—621.
19. Lieber C. S., Rubin E., DeCarli L. M.: Hepatic microsomal ethanol oxidizing system (MEOS): Differentiation from alcohol dehydrogenase and NADPH oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1970b, 40, 858—865.
20. Lieber C. S., Schmid R.: The effect of ethanol on fatty acid metabolism; stimulation of hepatic fatty acid synthesis in vitro. *J. Clin. Invest.*, 1961, 40, 394—399.
21. Mann L. J., Bhathavathsalam A., Manda Liu B. S., Makowski P.: Placental transport of alcohol and its effect on maternal and fetal acid-base balance. *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, 1975a, 1, 837—844.
22. Mann L. J., Bhathavathsalam A., Manda Liu B. S., Makowski P.: Effect of alcohol on fetal cerebral function and metabolism. *Am. J. Obstetr. Gynecol.*, 1975b, 845—851.
23. Martin G. J., Moss J. N., Smyth R. D., Beck H.: The effect of cystein in modifying the action of ethanol given chronically in rats. *Life Sci.*, 1966, 5, 2357—2362.
24. Mendelson J. H.: Biochemical mechanisms of alcohol addiction. W: *The Biology of Alcoholism*, vol. 1, Biochemistry, B. Kissin, 1971, 513—544.
25. Oudea M. C., Launay A. N., Queneherve S., Oudea P.: The hepatic lesions produced in the rat by chronic alcoholic intoxication. Histological, ultrastructural and biochemical observations. *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.*, 1970, 15, 748—764.
26. Pearse A. G. E.: *Histochemistry*. London, 1961.
27. Pilstrom L., Kiessling K. H.: A possible localisation of alpha-glycerophosphate dehydrogenase to the inner boundry membrane of mitochondria in livers from rats fed with ethanol. *Histochemie*, 1972, 32, 329—334.
28. Rubin E., Beattie D. S., Lieber C. S.: Effects of ethanol on the biogenesis of mitochondrial membranes and associated mitochondrial functions. *Lab. Invest.*, 1970, 23, 620—627.
29. Składziński J.: Combined action of pyrazole and ethanol on rat liver: Morphological, histochemical and ultrastructural study. *Zeszyty Naukowe ASW, Suppl.*, 1976, 14, 1—52.
30. Theorell H., Yonetani T.: Liver alcohol dehydrogenase-DPN-pyrazole complex. A model of ternary intermediate in the enzyme reaction. *Biochem. Zeitschr.*, 1963, 338, 537—553.
31. von Wartburg J. P.: The metabolism of alcohol in normals and alcoholics: *Enzymes*. W: *The Biology of Alcoholism*, vol. 1. Biochemistry, B. Kissin, 1971, 63—102.

Adres autorów: Pracownia Histochemiczna Zakładu Patofizjologii Komórki, Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego, 01-813 Warszawa, ul. Marymoncka 99.

## RECENZJA

dzieła pt.: ANGIOGRAPHY OF THE HUMAN BRAIN CORTEX  
Autorzy: G. Szikla, G. Bouvier, T. Hori, V. Petrov  
Wydawnictwo: Springer Verlag. Berlin—Heidelberg—New York, 1977

Recenzowana książka-atlas jest dziełem unikalnym. Jest to pierwsza w piśmiennictwie praca określająca w sposób tak precyzyjny stosunek topograficzny tętnic mózgowych i ich rozgałęzień do zawojów i rowków oraz szczelin. Celem autorów było stworzenie takiego układu rozpoznawczego, który umożliwiłaby bezpośrednie określenie umiejscowienia poszczególnych zawojów poprzez wyodrębnienie w badaniach jednostki morfologicznej: tętnica—zawój.

W swoich dociekaniach autorzy nie ograniczyli się do wykorzystania stereotaktycznej telearteriografii w dwupłaszczyznowym układzie, umożliwiającym zestawienie obrazów bocznych i czołowych. Pragnęli wykroczyć poza statystyczne określenie samego przebiegu naczyń i uzyskać możliwość każdorazowego odniesienia ich do struktur tkankowych. Było to niezmiernie rozległe zamierzone i mozolne studium.

Po wstrzyknięciu środka kontrastowego do naczyń krwionośnych preparatu anatomicznego, wykonywano teleradiogramy, aby wykazać w dwóch płaszczyznach układ poszczególnych naczyń. Następnie na tym samym preparacie wyosobniano poszczególne terytoria naczyniowe i wykonywano zdjęcia fotograficzne przed i po przecięciu tych naczyń oraz usunięciu ich. Wykonywane na tym etapie dwupłaszczyznowe arteriogramy w identycznych warunkach stereotaktycznych wykazywały wówczas dzięki eliminacji kolejnych naczyń, które z nich związane są z odpowiednimi zawojami i ich rowkami. Zastosowanie uzyskanych danych do interpretacji klinicznych angiogramów ujawniło całe bogactwo szczegółów, dotychczas ukrytych.

Nieprzypadkowo badania te zostały wykonane w ośrodku kierowanym przez Talairacha, dla którego problemy stwarzane przez stosowanie stereotaksji dotyczyły zawsze nie tylko aspektów leczniczych, ale i poznawczych, mogących mieć znaczenie praktyczne dla ścisłej wczesnej diagnostyki rozmaitych procesów chorobowych, toczących się w czaszce. Możliwość uzyskania, dzięki wnioskowi płynącemu z zastosowania metody Szikli i wsp., właściwej identyfikacji zawojów i ich unaczynienia ma szczególne znaczenie dla neurochirurga, zwłaszcza jeśli będzie on wsparty o pomoc wytrawnego neuroradiologa, obeznanego z praktycznymi wynikami badań autorów.

Dzieło, poprzedzone interesującym wstępem Talairacha, składa się z rozdziału wstępnego i 6 rozdziałów zasadniczych. W rozdziale wstępnym autorzy poruszają problemy stereotaktycznego umiejscawiania struktur korowych, kładąc nacisk na rolę trójwymiarowej angiografii w tym względzie. Zwracają uwagę na potrzebę uzyskania niezniekształconych danych o przebiegu tętnic i ich rozgałęzień na ukrytych ścianach zawojów niewidocznych przecież poza powierzchnią. Dane te chcą odnieść do przebiegu naczyń na widocznej części zawoju.

W rozdziale pierwszym przedstawione są zasady i metody stereotaktycznej anatomii i radiologii w zastosowaniu do lokalizowania struktur korowych. Rozdział drugi poświęcony jest studium zawojów i rowków na powierzchni. Rozdział trzeci rozwija to zagadnienie odnośnie korowych gałęzi tętnicy mózgowej środkowej.

Rozdział czwarty prowadzi nas już w problematykę ujawniania przebiegu tętnic i ich rozgałęzień w głębi, ukrytych pod rowkami. Jest to najobszerniejszy rozdział dzieła, podejmuje bowiem analizę poszczególnych głównych rowków i szczelin mózgu. Porusza więc anatomiczne i angiograficzne aspekty związane

cd. na str. 546



ZBIGNIEW S. HERMAN, ZBIGNIEW SZCZUREK, CZESŁAWA WAŻNA-  
-BOGUŃSKA, HENRYK I. TRZECIAK

ZMIANY NEUROPATHOLOGICZNE W MÓZGACH SZCZURÓW  
PO DŁUGOTRWAŁYM PODAWANIU NEUROLEPTYKÓW,  
OKSAZEPAMU i PROTRYPTYLINY

Zakład Farmakologii Instytutu Biologiczno-Fizjologicznego Śląskiej AM, Katowice

Kierownik: prof. dr hab. Z. S. Herman

Zakład Patomorfologii Instytutu Patologii Śląskiej AM, Katowice

Kierownik: prof. dr hab. W. Niepołomski

Zakład Cytodiagnostyki Instytutu Patologii Śląskiej AM, Katowice

Kierownik: prof. dr hab. M. Luciak

Leki psychotropowe, stosowane od ćwierćwiecza w leczeniu schorzeń psychicznych, często są podawane przez wiele lat, a czasem do śmierci chorego. Zmiany toksyczne wywoływane przez te leki są dobrze znane psychiatrom. Natomiast nie znamy w pełni istoty uszkadzającego działania leków psychotropowych na oun. Przeprowadzone badania doświadczalne polegały najczęściej na stosowaniu tych leków u zwierząt przez kilka, kilkanaście tygodni oraz na poszukiwaniu polekowych zmian patologicznych po tym krótkim okresie czasu.

Celem poniżej przedstawionej pracy było zbadanie zmian morfologicznych w mózgach szczurów, którym podawano jeden z trzech neuroleptyków (flufenazyne, benperidol lub pimozyd), stosowanych głównie w leczeniu schizofrenii, oksazepam, lek ataraktyczny, stosowany w leczeniu nerwic z objawami lękowymi oraz protryptylinę, jeden z leków przeciwdepresyjnych. Wymienione leki stosowano przez okres kilku miesięcy do ponad roku. Naszym założeniem było wykazanie po jakim okresie wymienione leki są bezwzględnie szkodliwe dla oun, oraz które z nich są względnie bezpieczne w czasie ich długotrwałego stosowania.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia wykonano na szczurach, samcach i samicach szczepu Wistar, pochodzących z Centralnej Zwierzętarni Doświadczalnej Śląskiej Akademii Medycznej. Stosowano następujące leki: flufenazyne

(Fluphenazine: 2HCl, Dott. Bonnapace, Milano lub Mirenil, Polfa, Jelenia Góra), benperidol (Janssen Pharm., Beerse), pimozyd (Janssen Pharm., Beerse), oksazepam (Polfa, Tarchomin), chlorowoderek protryptyliny (Merck, Sharp, Dohme Ltd., Hoddesdon, Herts). Flufenazynę (FL), benperidol (BP) oraz protryptylinę (PT) podawano w 0,9% roztworze chlorku sodowego, pimozyd (PI) w 0,9% roztworze NaCl z dodatkiem 0,5% gumy arabskiej zaś oksazepam (OZ) w postaci zawiesiny w 0,9% NaCl w objętości 1 ml/kg ciężaru ciała. Dawki stosowanych związków przeliczano na wolną zasadę.

FL podawano szczurom samcom o początkowym ciężarze ciała  $160 \pm 10$  g dootrzewnowo (ip) w dawce 1 mg/kg przez 14, 52 lub 60 tygodni albo w dawce 5 mg/kg przez 36, 52 lub 72 tygodnie.

BP podawano w dawce 0,1 mg/kg ip samcom o ciężarze początkowym  $175 \pm 10$  g przez 27 lub 67 tygodni lub samicom w okresie ciąży i laktacji i urodzonym przez nie szczurom obu płci od 8 dnia życia przez 23 lub 64 tygodnie.

PI wstrzykiwano w dawce 0,5 mg/kg ip samicom w czasie ciąży i laktacji i urodzonym przez nie szczurom obu płci od 8 dnia życia przez 53 tygodnie.

OZ podawano ip szczurom samcom o ciężarze początkowym  $160 \pm 15$  g w dawce 5 mg/kg przez 38 lub 62 tygodnie lub razem ze standardową dietą laboratoryjną w dawce 50 mg/kg przez 28 tygodni.

PT stosowano w dawce 10 mg/kg ip szczurom samcom o ciężarze początkowym 150–155 g/kg przez 2 lub 13 tygodni.

Wszystkie leki oprócz PI stosowano codziennie z wyjątkiem niedziel. Pimozyd jako lek o przedłużonym działaniu stosowano w odstępach czterodniowych. Każdej z wymienionych grup doświadczalnych towarzyszyła odpowiednia grupa kontrolna obejmująca szczury, którym podawano wyłącznie stosowany dla leku rozpuszczalnik lub standardową dietę, w takim samym czasie, w jakim podawano badane leki w grupach doświadczalnych. W 24 godz po zakończeniu zaplanowanego okresu podawania leku zwierzęta dekapitowano przy pomocy gilotyny, wyjmowano mózg wraz z mózdzkiem i sporządzano z nich wycinki. Skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną-eozyną, sudanem czarnym B oraz wg metody Nissla, Spielmeyera, Holzera i Cajala.

#### WYNIKI

W mózgach i/lub w oponach szczurów kontrolnych wszystkich grup obserwowano krwinkotoki. W mózgach zwierząt doświadczalnych stwierdzano również drobne krwinkotoki o lokalizacji i nasileniu odpowiadającym zmianom w kontroli. Jedynie po zastosowaniu protryptyliny



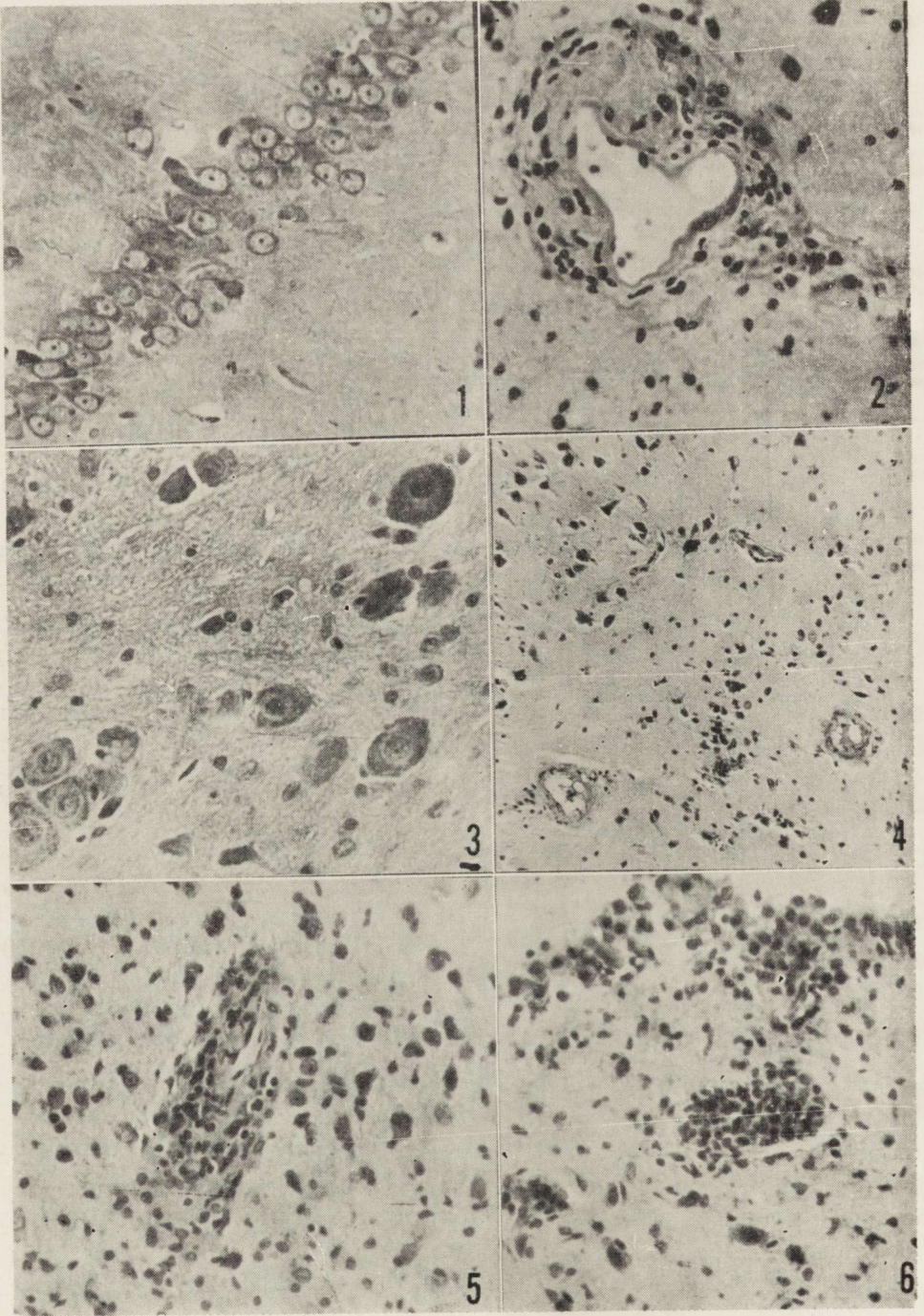
krwinkotoki w mózgach szczurów były bardziej nasilone niż w kontroli.

**Flufenazyna.** Po zastosowaniu FL w dawce 1 mg/kg już po 13 tygodniach zaobserwowano w mózgach wszystkich zwierząt schorzenie homogenizacyjne komórek Purkinjego, ubytki tych komórek i rozplem gleju. Po 52 tygodniach stosowania FL w neuronach mózgu 50% szczurów wystąpiła tigroliza, a po 60 tygodniach stosowania leku tigrolizę obserwowano w mózgach wszystkich badanych zwierząt. Po zastosowaniu FL w dawce 5 mg/kg tigrolizę komórek nerwowych stwierdzono u wszystkich szczurów już po 36 tygodniach podawania leku. Ponadto oprócz opustoszeń neuronów i rozplemu gleju komórkowego występujących u wszystkich zwierząt, od 52 tygodnia obserwacji stwierdzano schorzenie przewlekłe komórek nerwowych, a po 72 tygodniach rozpad komórek nerwowych i nacieki zapalne. Ogniskowe opustoszenia komórkowe występowały w korze mózgu, korze amonalnej (ryc. 1), korze mózdzku, a w pojedynczych przypadkach w jądrach mostu i jądrze zębatym mózdzku. Ubytkom komórek nerwowych towarzyszył rozplem gleju. Rozpad komórek nerwowych stwierdzono w korze mózgu, ośrodkach podkorowych, jądrach mostu i jądrze zębatym mózdzku, przy czym był on najbardziej nasilony w korze mózgu i jądrach mostu. W ośrodkach podkorowych drobne naczynia krwionośne otaczały nacieki zapalne (ryc. 2). Szczegółowe zestawienie zmian neuropatologicznych po podaniu FL zawiera tabela 1.

**Benperidol.** W mózgach wszystkich zwierząt, którym podawano lek, a szczególnie w pniu mózgu obserwowano centralną tigrolizę komórek nerwowych (ryc. 3). Ponadto w korze mózgu obserwowano ogniskowe opustoszenia komórkowe, a w korze mózdzku schorzenie homogenizacyjne komórek Purkinjego. Zwracał również uwagę nieznaczny rozplem gleju komórkowego w pobliżu drobnych naczyń krwionośnych w podkorowej istocie białej (ryc. 4). U jednego szczura, któremu podawano BP przez 67 tygodni stwierdzono nacieki zapalne wokół naczyń oraz rozsiany rozplem komórek glejowych w ośrodkach podkorowych (ryc. 5).

**Pimozyd.** W mózgach szczurów, które otrzymywały PI stwierdzono tigrolizę komórek nerwowych, schorzenie homogenizacyjne komórek Purkinjego mózdzku, nieznaczne opustoszenia neuronów oraz rozplem gleju komórkowego. Tigroliza występowała głównie w neurocytach kory mózgu i ośrodków podkorowych, w mniejszym stopniu jąder mostu i jąder zębatych mózdzku. Niewielkie ogniskowe opustoszenia komórkowe obserwowano w korze mózgu i w korze amonalnej. Rozplem komórek glejowych towarzyszył zwykle opustoszeniom komórek nerwowych.







Zestawienie zmian neuropatologicznych po podaniu BP i PI przedstawiono w tabeli 2.

**Oksazepam.** U zwierząt, którym podawano dootrzewnowo OZ niezależnie od dawki stwierdzano tigrilizę komórek nerwowych, opustoszenia komórkowe i rozplem gleju. W mózdku tych zwierząt obserwowano schorzenie homogenizacyjne komórek Purkinjego. W mózgach szczurów, którym podawano OZ w dawce 50 mg/kg obserwowano często (66% zwierząt) schorzenie przewlekłe oraz rozpad komórek nerwowych. Tigriliza miała charakter bądź częściowej, środkowej, bądź całkowitej i dotyczyła neuronów kory mózgu, ośrodków podkorowych, jąder mostu i jąder zębatego mózdku. Schorzenie przewlekłe neurocytów i opustoszenia komórkowe spostrzegano przede wszystkim w korze mózgu i w korze amonalnej. Rozplem gleju towarzyszył zwykle ogniskom opustoszeń komórkowych. U jednego zwierzęcia tej grupy znaleziono nacieki zapalne umiejscowione podwyściółkowo i w wyściółce komory bocznej. Komórki wyściółki wykazywały w tych miejscach oznaki rozplemu (ryc. 6).

**Protryptylina.** W mózgach zwierząt, które otrzymywały PT obserwowano tigrilizę komórek nerwowych, opustoszenia komórkowe oraz schorzenie homogenizacyjne komórek Purkinjego. Ponadto u szczurów otrzymujących PT przez 2 tygodnie wystąpiło schorzenie ischemiczne komórek nerwowych. Tego rodzaju zmian nie obserwowano w mózgach zwierząt, którym podawano PT przez 13 tygodni. Natomiast u kilku szczurów tej grupy obserwowano schorzenie przewlekłe i rozpad komórek nerwowych. Zmiany komórkowe o charakterze tigrilizy, rozpad komórek nerwowych oraz schorzenie przewlekłe neurocytów (ryc. 7)

---

*Ryc. 1.* Opustoszenia komórkowe w korze amonalnej. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×  
*Fig. 1.* Nerve cells loss in Ammonal cortex. Cresyl violet. × 400

*Ryc. 2.* Nacieki drobnokomórkowe wokół naczyń krwionośnych w ośrodkach podkorowych. H. E. Pow. 400 ×

*Fig. 2.* Perivascular small cell infiltrations in subcortical centres. H. E. × 400

*Ryc. 3.* Centralna tigriliza komórek nerwowych pnia mózgu. H. E. Pow. 400 ×  
*Fig. 3.* Central tigrilysis of nerve cells in the brain stem. H. E. × 400

*Ryc. 4.* Nieznaczny rozplem gleju komórkowego w pobliżu drobnych naczyń krwionośnych w istocie białej podkorowej. H. E. Pow. 160 ×

*Fig. 4.* Mild glial cells proliferation in the vicinity of small blood vessels in subcortical white matter. H. E. × 160

*Ryc. 5.* Nacieki zapalne wokół naczyń i rozplem komórek glejowych w ośrodkach podkorowych. H. E. Pow. 400 ×

*Fig. 5.* Perivascular inflammatory infiltration and glia proliferation in subcortical centres. H. E. × 400

*Ryc. 6.* Ogniskowe nacieki zapalne pod wyściółką i rozplem komórek wyściółki  
H. E. Pow. 400 ×

*Fig. 6.* Focal subependymal inflammatory infiltrations and proliferation of ependymal cells. H. E. × 400

Tabela 1. Zmiany neuropatologiczne w mózgach szczurów po dootrzewnowym podawaniu flufenazyny

Table 1. Neuropathological changes in rats brain after intraperitoneal fluphenazine administration

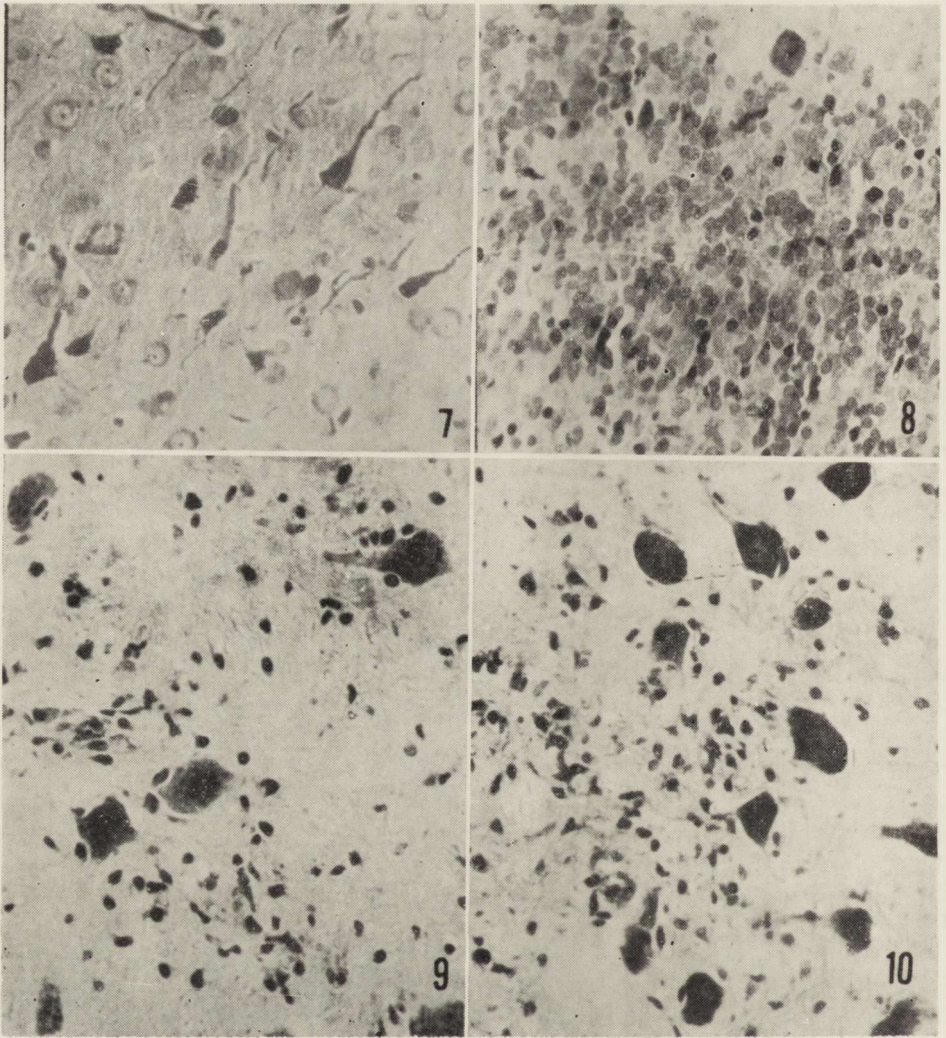
Zmiany neuropatologiczne Neuropathological changes	1 mg/kg			5 mg/kg		
	14 tygodni weeks	52 tygodnie weeks	60 tygodni weeks	36 tygodni weeks	52 tygodnie weeks	72 tygodnie weeks
Liczba zwierząt Number of animals	5	22	6	10	3	6
Krwinkotoki Erythrorrhages	4	6	2	2	3	3
Tigroliza komórek nerwowych Tigrolysis of nerve cells	—	10	6	10	3	6
Rozpad komórek nerwowych Disintegration of nerve cells	—	—	—	—	—	6
Schorzenie przewlekłe komórek nerwowych Chronic nerve cells disease	—	—	—	—	3	6
Schorzenie homogenizacyjne kom. Purkinjego Homogenization of Purkinje cells	5	22	6	10	3	6
Opustoszenia komórkowe Nerve cells loss	5	22	6	10	3	6
Rozplem gleju komórkowego Proliferation of glial cells	5	22	6	10	3	6
Nacieki zapalne Inflammatory infiltrations	—	—	—	—	—	1



Tabela 2. Zmiany neuropatologiczne w mózgach szczurów po dootrzewnowym podawaniu benperidolu i pimozydu

Table 2. Neuropathological changes in rats brain after intraperitoneal benperidol and pimozid administration

Zmiany neuropatologiczne Neuropathological changes	Benperidol 0.1 mg/kg				Pimozid 0.5 mg/kg
	Od urodzenia From birth		W wieku dojrzałym In adult		Od urodzenia From birth
	23 tygodnie weeks	64 tygodnie weeks	27 tygodni weeks	67 tygodni weeks	53 tygodnie weeks
Liczba zwierząt Number of animals	6	11	20	9	9
Krwinkotoki Erythrorrhages	4	6	4	6	5
Tigroliza komórek nerwowych Tigrolysis of nerve cells	6	11	10	9	9
Zmiany homogenizacyjne komórek Purkinjego Homogenizing Purkinje cells changes	6	11	10	9	9
Opustoszenia komórkowe Nerve cells loss	6	11	10	9	9
Rozplem gleju komórkowego Proliferation of glial cells	6	11	10	9	9
Nacieki zapalne Inflammatory infiltrations	—	—	1	—	—



*Ryc. 7.* Schorzenie przewlekłe komórek nerwowych kory mózgu. Fiolet krezyłu.  
Pow. 400 ×

*Fig. 7.* Chronic nerve cell disease in the cerebral cortex. Čresyl violet. × 400

*Ryc. 8.* Zmiany homogenizacyjne komórek Purkinjego. H. E. Pow. 400 ×

*Fig. 8.* Homogenising changes in Purkinje cells. H. E. × 400

*Ryc. 9.* Ogniskowe opustoszenia komórek nerwowych oraz nieznaczny rozplem komórek gleju w pniu mózgu. H. E. Pow. 400 ×

*Fig. 9.* Focal nerve cell loss and moderate glial cells proliferation in the brain stem. H. E. × 400

*Ryc. 10.* Naciek drobnokomórkowy i rozplem komórek glejowych w pniu mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. 400 ×

*Fig. 10.* Small cell infiltrations and proliferation of glial cells in the brain stem. Čresyl violet. × 400



dotyczyło głównie kory mózgu. W korze mózdzku obserwowano schorzenie homogenizacyjne i ubytki komórek Purkiniego (ryc. 8). W jądrach pnia mózgu spostrzegano opustoszenia komórkowe z nieznacznym rozplemem gleju (ryc. 9), a miejscami znaczniejszy rozplem tych komórek (ryc. 10). U jednego szczura, któremu podawano PT przez 13 tygodni stwierdzono rozsiiane nacieki zapalne w oponach i w korze mózgu. Naciekom zapalnym towarzyszył rozplem komórek glejowych w istocie białej podkorowej. W jądrach podkorowych zauważono pojedynczą grudkę, w której były przemieszane komórki zapalne i glejowe. Zmiany patomorfologiczne po podaniu oksazepamu i protryptyliny ilustruje tabela 3.

#### OMÓWIENIE

Spośród trzech zbadanych leków neuroleptycznych najbardziej toksyczna dla tkanki nerwowej okazała się flufenazyna. Zastosowana w dawce 1 mg/kg przez 60 tygodni powodowała niewielkie i odwracalne zmiany. Podawana w dawce pięciokrotnie wyższej przez 36 tygodni powodowała również odwracalne zmiany. Stawały się one nieodwracalne po stosowaniu leku przez okres jednego roku, a po 72 tygodniach podawania leku w wyższej dawce występował rozpad komórek nerwowych. Flufenazyna jest stosowana u ludzi w dawkach dobowych kilkakrotnie mniejszych w porównaniu z dawkami użytymi w naszych doświadczeniach. Wysokie dawki zastosowano celowo ze względu na możliwość prowadzenia doświadczenia u szczurów nie dłużej niż przez półtora roku, podczas gdy u ludzi ten lek, szczególnie przy stosowaniu preparatów o przedłużonym działaniu, jest podawany przez kilka, a nawet kilkanaście lat. Po długim stosowaniu flufenazyny oraz innych pochodnych fenotiazynowych, oprócz typowego dla tych leków powikłania w postaci parkinsonizmu, często występuje ataksja, ostre reakcje dystoniczne i późne dyskinezje (Lehmann, Ban 1974). Po krótkotrwałym stosowaniu promazyny, chlorpromazyny, lub triflupromazyny u szczurów, zaobserwowano już po miesiącu ich podawania gromadzenie się tych leków w mózgu oraz wyraźne zaburzenia pozapiramidowe w postaci zespołu katalepsji (Maickel i wsp. 1974).

Benperidol, pochodna butyrofenonu oraz pimozyd, pochodna dwufenylobutylopiperydydy, zastosowane podobnie jak flufenazyna w dawkach kilkakrotnie wyższych w porównaniu ze stosowanymi w klinice, spowodowały niewielkie i odwracalne zmiany neuropatologiczne. Można stąd sugerować ostrożnie (pamiętając o ogromnych różnicach morfologicznych i funkcjonalnych mózgu człowieka i szczura), że benperidol i pimozyd mogą być bezpieczniejsze przy długotrwałym stosowaniu niż

Tabela 3. Zmiany neuropatologiczne w mózgu szczurów po długotrwałym podawaniu oksazepamu i protryptyliny  
 Table 3. Neuropathological changes in rats brain after oxazepam and protryptiline long-term administration

Zmiany neuropatologiczne Neuropathological changes	Oksazepam				Protryptylina			
	5 mg/kg		50 mg/kg		10 mg/kg			
	38 tygodni weeks	62 tygodnie weeks	28 tygodni weeks	2 tygodnie weeks	13 tygodni weeks			
Liczba zwierząt Number of animals	10	11	12	11	18			
Krwinkotoki Erythrorrhages	5	6	5	3	12			
Tigroliza komórek nerwowych Tigrolysis of nerve cells	10	11	12	3	18			
Rozpad komórek nerwowych Disintegration of nerve cells	—	—	8	2	4			
Schorzenie przewlekłe komórek nerwowych Chronic nerve cells disease	—	—	8	11	4			
Schorzenie homogenizacyjne komórek Purkiniego Homogenization of Purkinje cells	10	11	12	3	18			
Opustoszenia komórkowe Nerve cells loss	10	11	12	3	18			
Rozplem gleju komórkowego Proliferation of glial cells	10	11	12	3	18			
Nacieki zapalne Inflammatory infiltrations	—	—	1	—	1			



flufenazyna. Sugestię tę popierają dane kliniczne (Longo 1966, Lehmann, Ban 1974, Maickel i wsp. 1974).

Oksazepam jest obecnie bardzo często stosowany w leczeniu zmian psychicznych, w których dominują objawy lękowe oraz dużego napięcia emocjonalnego. Istnieje tendencja do nadużywania i nie kontrolowanego zażywania tego leku przez chorych. Z objawów toksycznych po stosowaniu tego leku najczęściej występują zaburzenia pochodzenia mózdkowego (Aivazian 1964). W naszych doświadczeniach po stosowaniu oksazepamu w dawce 5 mg/kg (czyli trzykrotnie większej od dobowej dawki maksymalnej dla człowieka) przez okres dłuższy niż rok, stwierdziliśmy odwracalne i słabo nasilone zmiany neuropatologiczne. Po zastosowaniu dawki dziesięciokrotnie większej już po 28 tygodniach stwierdziliśmy nieodwracalne zmiany w mózgu. Spostrzeżenie to może tłumaczyć dużą śmiertelność w zatruciach benzodwiazepinami, których przedstawicielem jest oksazepam.

Protryptylina jest często stosowanym lekiem przeciwdepresyjnym o działaniu poprawiającym nastrój oraz zwiększającym napęd psychoruchowy. Częstym objawem toksycznym występującym u ludzi są zaburzenia mózdkowe, spowodowane antycholinergicznym działaniem leku (Longo 1966). Wyniki naszych doświadczeń, w których podawano protryptylinę w dawkach zbliżonych do maksymalnych dawek stosowanych u człowieka, wskazują, że u szczurów lek ten stosowany przez 3 miesiące powoduje wyraźne, a u pojedynczych zwierząt ciężkie i nieodwracalne zmiany w korze mózgu i mózdku.

#### WNIOSKI

1. Spośród trzech zbadanych leków neuroleptycznych najbardziej toksyczna dla *oun* szczura okazała się flufenazyna, piperazynowa pochodna fenotiazyn.
2. Benperidol i pimozyd, neuroleptyki o innej budowie chemicznej są mało toksyczne dla komórek nerwowych *oun* szczura.
3. Długotrwałe stosowanie mniejszej dawki oksazepamu powoduje u szczurów mierne działanie toksyczne, podczas gdy podawanie tego leku w dużej dawce działa silnie toksycznie.
4. Protryptylina jest lekiem bardzo toksycznym dla *oun* szczura.

З. С. Герман, З. Щурек, Ц. Важна-Богуньска, Х. И. Тшечак

#### НЕЙРОПАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГУ КРЫСЫ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ НЕЙРОЛЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ, ОКСАЗЕПАМА И ПРОТРИПТИЛИНА

#### Резюме

Исследовано влияние длительного введения флюфеназина (FL), бенперидола (BP), пимозиды (PI), оксазепамы (OZ) и протриптилина (PT) на центральную

нервную систему крысы. FL, вводимый зрелым самцам в дозе 1 мг/кг внутривнутрибрюшинно (i.p.) в течение 14, 52 или 60 недель, вызвал нарастающие обратимые патоморфологические изменения. После введения FL в дозе 5 мг/кг в течение 36 недель наблюдались также обратимые изменения, а применение лекарства в той же самой дозе в течение 52 и 72 недель приводило к распаду нервных клеток. BP вводили зрелым самцам i.p. в дозе 0,1 мг/кг в течение 27 или 67 недель или самкам во время беременности и лактации, а также новорожденным с 8-го дня жизни в течение 23 и 64 недель. PI вводили i.p. в дозе 0,5 мг/кг самкам и новорожденным в течение 53 недель. После введения BP и PI наблюдали клеточные разрушения, а также гиперплазию глиозных клеток. После введения зрелым самцам OZ в дозе 5 мг/кг i.p. в течение 38 или 64 недель наблюдали тигролиз нейронов, клеточные разрушения и гиперплазию глиозных клеток. OZ, применявшийся в дозе 50 мг/кг через рот в течение 28 недель, вызывал распад нервных клеток и хроническое заболевание. PT, вводимый i.p. зрелым самцам в дозе 10 мг/кг, вызывал через 2 недели ишемическое повреждение нейронов. У крыс, которые получали лекарство в течение 13 недель, обнаружен тигролиз, гомогенизационные изменения клеток Пуркинье и клеточные разрушения.

Из исследованных нейролептических средств наиболее токсичным для центральной нервной системы оказался FL. Очень токсичным является также OZ, применяемый в дозе 50 мг/кг, а также PT.

Z. S. Herman, Z. Szczurek, C. Ważna-Boguńska, H. I. Trzeciak

#### NEUROPATHOLOGICAL CHANGES IN RATS BRAIN AFTER LONG-TERM TREATMENT WITH NEUROLEPTICS, OXAZEPAM AND PROTRYPTYLINE

##### Summary

The aim of the study was to examine the effect of chronic treatment with fluphenazine (FL), benperidol (BP), pimozide (PI), oxazepam (OZ) and protryptiline (PT) on the CNS of the rat. FL administered i.p. to adult male rats in a dose of 1 mg/kg during 14, 52 or 60 weeks caused increasing reversible pathomorphological changes. After treatment with FL in a dose of 5 mg/kg during 36 weeks the changes were still reversible, whereas such treatment for 52 or 72 weeks effected in destruction of the nerve cells. BP was given i.p. to adult male rats in a dose of 0.1 mg/kg for 27 or 67 weeks, to the females during pregnancy and lactation and to their offspring beginning from the 8th day till 23 and 64 weeks of life. PI was injected i.p. in a dose of 0.5 mg/kg to the females and newborn rats for 53 weeks. After BP and PI administration there was found cellular loss and glia proliferation. OZ given i.p. to adult male rats in a dose of 5 mg/kg caused neuronal tigrolysis, nerve cell loss and cellular glial proliferation, whereas in a dose of 50 mg/kg for 28 weeks — dominated disintegration of nerve cells and chronic neuronal disease. PT injected i.p. into the adult males in a dose of 10 mg/kg caused after 2 weeks ischemic neuronal disease. In rats injected with this drug for 13 weeks it was found tigrolysis, homogenizing changes in Purkinje cells and in some cases — disintegration of nerve cells.

From the examined neuroleptics the FL was the most toxic for the central nervous system. High toxic effect was produced by OZ if the drug was administered in a dose of 50 mg/kg; the action of PT was also considered highly toxic.



## PIŚMIENNICTWO

1. Aivazian G. H.: Clinical evaluation of diazepam. *Dis. Nerv. System* 1964, 25, 491—496.
2. Bobon D. P., Plomteux G., Heusghem C., Bobon J.: Clinical toxicology and efficacy of pimozide. *Int. Pharmacopsychiat.* 1970, 4, 194—203.
3. Cecarec Z., Eberhard G., Nordgren L.: A controlled study of the antipsychotic and sedative effects of neuroleptic drugs and amphetamine in chronic schizophrenics. *Acta Psychiat. Scand.* 1974, Suppl. 249, 65—77.
4. Efron D. H., Cole J. O.: *Psychopharmacology. A review of progress 1957—1967*, Public Health Service Publication No 1836, Washington, 1968, 1342.
5. Gaultier M., Fahti D.: Les intoxications par les butyrophenones. *J. Eur. Toxicol.* (Paris), 1971, 4, 395—402.
6. Gréenblatt D. I., Shader R. J.: *Benzodiazepines in clinical practice*. Raven Press, New York, 1974.
7. Lehmann H. E., Ban T. A.: Sex differences in long-term adverse effects of phenothiazines. W: *Phenothiazines and structurally related drugs*. Eds.: J. S. Forest, C. J. Carr, E. Usdin, Raven Press, New York 1974, 249—254.
8. Longo V. G.: Behavioral and electroencephalographic effects of atropine and related compounds. *Pharm. Rev.* 1966, 18, 965—978.
9. Maickel R. P., Braunstein M. C., Mc Glynn M., Snodgrass W. R., Webb R. W.: Behavioral, biochemical and pharmacological effects of chronic dosage of phenothiazine tranquilizers in rats. W: *Phenothiazines and structurally related drugs*. Eds. J. S. Forest, C. J. Carr, E. Usdin, Raven Press, New York 1974, 593—602.

Adres autorów: Instytut Biologiczno-Fizjologiczny Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Marksa 38, 41-808 Zabrze-8.

z terytoriami, unaczynionymi przez tętnice mózgowe przednie, środkowe i tylne. Za autorami śledzimy poszczególne etapy badań, prowadzące do dokładnego poznania „losu” tętnic i tętniczek korowych określonego odcinka tkanki na ich przebiegu od powierzchni — w głąb.

Rozdział piąty przedstawia poszczególne wzorce przebiegu naczyń w trójwymiarowej angiografii. W zestawieniu z danymi z poprzedniego rozdziału czytelnik uzyskuje wgląd w korelacje anatomiczno-angiograficzne. Do rozdziału tego dołączone są również korowe angiogramy zawierające zmiany patologiczne. Wykazują one regionalne przemieszczenia, wskazujące, że rowki są przemieszczane przez nowotwory niewielkich rozmiarów. Znaczenie tego faktu nie wymaga komentarzy z punktu widzenia perspektyw dla wczesnego rozpoznawania.

Rozdział szósty wykazuje znaczenie tomografii, a właściwie angiotomografii dla ukazania i dokładniejszego rozpoznania poszczególnych układów: tętnica—zawód, czy też tętnica—rowek zawoju. Autorzy kończą ten rozdział wyrażeniem przekonania, że dane w nim zamieszczone potwierdzają fakt, iż odpowiednie przedstawienie rzeczywistej sytuacji przestrzennej w mózgu jest podstawowym warunkiem osiągnięcia na podstawie zestawienia dwuwymiarowych morfologicznych danych — poglądu o charakterze trójwymiarowej syntezy. Rozdział kończy się słowami: „anatomia jest zarazem przestrzenią i objętością”.

Do dzieła dołączonych jest kilka stron dotyczących nomenklatury, przy czym obok angielskiej — w języku tym pisana jest cała książka — podane są terminy wg Nomina Anatomica 1972; wyjaśnione są również skróty zawarte w tekście i przy ilustracjach. Obszerne, ale nie nadmiernie, piśmiennictwo jest znakomicie dobrane. Wreszcie dołączony jest również wykaz pozwalający odnieść ilustracje do poszczególnych preparatów anatomicznych i angiogramów, dla każdego przypadku. Indeks jest krótki, ale wystarczający dla tego typu specjalistycznego atlasu.

Dzieło wydane jest w formie albumowej, na znakomitym papierze. Liczy około 270 stron, z czego tekst, wyróżniający się bardzo dodatnio układem zarówno pod względem treściowym, jak i estetyki graficznej, stanowi niewielką tylko część. Dominują bowiem, jak przystało w atlasie, bardzo wysokiej jakości ilustracje, fotografie i schematy, często dwukolorowe. Ilustracje te, aczkolwiek tak liczne, nie sprawiają wrażenia zatłoczenia.

Dzieło Szikli i wsp. jest pozycją wybitną. Waler poznawczy tej pracy, niesłychanie mozolnej, a zarazem odkrywczej, jest bardzo znaczny, a perspektywy ukazane przez płynące z tego studium wnioski — nader obiecujące. Dzieło to powinno się znaleźć w każdej pracowni neuroradiologicznej i w każdym ośrodku neurochirurgicznym. Powinny mieć je w swoich bibliotekach ośrodki neurologiczne i zakłady anatomo-patologiczne, zwłaszcza pracownie neuropatologiczne. Jest to atlas, do którego dobrze jest zaglądać.

Prof. dr med. *Jerzy Szapiro*  
Łódź, ul. Kopcińskiego 22  
Klinika Neurochirurgii AM



IRMINA B. ZELMAN, DANUTA SEROKOWA

## ZMIANY PATOMORFOLOGICZNE W OŚRODKOWYM UKŁADZIE NERWOWYM JAKO KRYTERIUM ATENUACJI WIRUSA WŚCIEKLIZNY PASAŻOWANEGO NA HODOWLI TKANKOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN  
Kierownik: prof. dr med. M. J. Mossakowski  
Zakład Epidemiologii Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa  
Kierownik: prof. dr med. J. Kostrzewski

W podsumowaniu dyskusji na II Międzynarodowym Sympozjum do spraw wścieklizny w 1972 r. na temat szczepionki przeciwko wściekliznie stwierdzono, że „brakuje testów *in vitro* i *in vivo*, które byłyby miarą atenuacji szczepu szczepionkowego, a cechą najbardziej charakterystyczną jest patogenność szczepu dla ośrodkowego układu nerwowego” (Perkins 1974). Z tego względu w ramach naukowego planu współpracy Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie z Instytutem Poliomyelitis i Wirusowych Zapaleń Mózgu Akademii Nauk Medycznych ZSRR w Moskwie w zakresie badań nad oceną szczepu szczepionkowego wirusa wścieklizny Wnukowo 32, atenuowanego na pierwotnej hodowli komórek nerki chomika, podjęto próbę przebadania niektórych cech biologicznych, które można by przyjąć jako podstawę dla charakterystyki wirusa atenuowanego na określonym etapie pasażu na hodowli tkankowej, odróżniającej go od ustalonego wirusa wścieklizny.

Do badań nad szczepem Wnukowo 32 przyjęto następujące kryteria dla oceny neurowirulencji szczepu: zdolność do namnażania w oun i powodowania zmian patomorfologicznych, charakterystycznych dla zakażenia wirusem wścieklizny, zdolność wywoływania klinicznych objawów wścieklizny zależnie od drogi wprowadzenia wirusa i użytych do badań zwierząt laboratoryjnych oraz zdolność do obwodowego rozprzestrzeniania się wirusa po namnożeniu w oun (Serokowa 1976, Serokowa i wsp. 1977).

Pierwsze wyniki porównawczych badań morfologicznych mózgow różnorodnych zwierząt laboratoryjnych zakażonych podskórną i domózgowo klasycznym szczepem fixe i wirusem Wnukowo 32 wykazały różnice

odczynów tkankowych zależnie od rodzaju użytych zwierząt, szczepu wirusa i drogi zakażenia (Zelman, Serokowa 1976). Wyniki tych badań stanowiły równocześnie podstawę dla określenia przydatności poszczególnych rodzajów zwierząt dla badań morfologicznych przy ocenie atenuowanego szczepu szczepionkowego. Celem przedstawionej pracy jest porównanie zmian patomorfologicznych w ośrodkowym układzie nerwowym chomików i myszy zakażonych wirusem Wnukowo 32 o różnej liczbie pasaży na hodowli tkankowej oraz próba zastosowania zmian histopatologicznych w oun jako kryterium atenuacji szczepu szczepionkowego wirusa wścieklizny na kolejnych etapach jego pasażu na hodowli tkankowej.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto szczep wirusa wścieklizny Wnukowo 32, który otrzymano z Instytutu Poliomyelitis i Wirusowych Zapaleń Mózgu w Moskwie. Szczep ten, pasażowany 30—39 razy w temperaturze 32°C na pierwotnej hodowli komórek nerki chomika został zaakceptowany w ZSRR jako szczep szczepionkowy do produkcji inaktywowanej szczepionki dla ludzi i atenuowanej szczepionki dla zwierząt (Aksjonova, Selimov 1969). Niezależnie od uzyskania wariantu produkcyjnego szczep był nadal systematycznie pasażowany z zachowaniem identycznych warunków pasażu, a wirusy na poszczególnych etapach pasażu były badane na zwierzętach laboratoryjnych pod względem ich biologicznej charakterystyki (Gribencha i wsp. 1975).

Do badań patomorfologicznych użyto trzy warianty szczepu Wnukowo 32: pasaż 33—34 (Wnukowo 3)\*, pasaż 74—75 (Wnukowo 4)\* i pasaż 118—119 (Wnukowo 5)\*. Szczepy te są swoiste i wysoce immunogenne w rutynowych testach seroneutralizacji i NIH (Serokowa 1976, Serokowa i wsp. 1977). Przy zakażeniu domózgowym użyte szczepy zachowały zdolność chorobotwórczą dla młodych dorosłych myszy i chomików, ale zależnie od liczby pasaży ulegał wydłużeniu okres inkubacji choroby i czas jej trwania oraz zmieniał się obraz kliniczny.

Badania przeprowadzono na młodych dorosłych myszach i chomikach. Zwierzęta te wybrano na podstawie wstępnej oceny zmian patomorfologicznych w mózgach zwierząt laboratoryjnych zakażonych szczepem fixe i szczepem Wnukowo 32 atenuowanym na hodowli tkankowej po 32—34 pasażach. Spośród uprzednio przebadanych 5 gatunków zwierząt laboratoryjnych chomiki okazały się najbardziej wrażliwe na zakażenie, podczas gdy u myszy stwierdzono umiarkowaną wrażliwość

\* Własne oznaczenie robocze.



(Zelman, Serokowa 1976). Ewentualne osłabienie zmian lub ich brak można by traktować jako korzystny wskaźnik atenuacji.

Myszy i chomiki zakażano domózgowo wirusem rozcieńczonym 1:100 i podskórnie wirusem nie rozcieńczonym. Ocena patogenności szczepu szczepionkowego wirusa wścieklizny przy podskórnym zakażeniu zwierząt laboratoryjnych ma praktyczne znaczenie, gdyż warunkuje użycie go do produkcji szczepionki. Zakażenie domózgowe, pomimo że powoduje dodatkowy uraz tkanki, który wpływa modyfikująco na rozwój odczynów tkankowych, umożliwia bezpośrednią ocenę zmian wywołanych przez wirus wykazujący bezwzględne powinowactwo neurotrope.

Materiał do badania od zwierząt zakażonych domózgowo pobierano w okresie wylegania choroby, po wystąpieniu pierwszych objawów klinicznych oraz w okresie rozwiniętego zespołu objawowego, rokującego zejście śmiertelne. Od zwierząt zakażonych podskórnie, które nie zachorowały, pobierano materiał do badania po 20—23 dniach po zakażeniu. Zwierzęta chore po zakażeniu podskórnym usypiano w okresie wyraźnie rozwiniętych objawów klinicznych. W momencie kończenia obserwacji zwierzętom w płytkiej narkozie eterowej wykonywano przezsercową perfuzję roztworem formaliny w soli fizjologicznej. Po utrwaleniu wyjmowano mózg wraz z pniem i mózdzkiem oraz rdzeń kręgowy. Mózgi dzielono w płaszczyźnie czołowej na bloczki grubości około 3 mm a z rdzenia pobierano wycinki z części szyjnej, lędźwiowej, piersiowej i krzyżowej. Bloczki tkankowe przeprowadzano w sposób standardowy do parafiny. Skrawki grubości 6—8  $\mu$  barwiono hematoksyliną-eozyną i fioletem krezyłu.

## WYNIKI

### *Obserwacje kliniczne*

U myszy i chomików zakażonych domózgowo szczepem Wnukowo 3 czas trwania choroby wynosi 50—60 godzin. Objawy narastają szybko. Początkowo zwierzęta są nastroszone i senne, pojawiają się niedowładny, które narastają do pełnych porażań. Przy domózgowym zakażeniu szczepem Wnukowo 4 czas trwania choroby przedłuża się u myszy o 1 dzień a u chomików o 2—4 dni. Objawy kliniczne rozwijają się wolniej ale są typowe dla wścieklizny. Domózgowe zakażenie szczepem pasażowanym 118—119 razy powoduje zróżnicowanie odpowiedzi klinicznej i czasu wylegania choroby u obu rodzajów zwierząt. U niektórych myszy zakażenie domózgowe wirusem nie rozcieńczonym lub niskimi rozcieńczeniami wirusa przebiega klinicznie bezobjawowo. Niektóre myszy po 10—12 dniowym okresie wylegania choroby giną nagle w ciągu 10—

15 minut z objawami gwałtownego podniecenia i niezborności ruchowej. U innych zwierząt występują tylko objawy prodromalne: nastroszenie i senność, które utrzymują się do 10 dni i doprowadzają do wyniszczenia zwierząt, które giną bez wyraźnego zespołu porażień. Okres trwania choroby u chomików po zakażeniu domózkowym wydłuża się do 5—6 dni. Zwierzęta są nastroszone, skulone, śpiące, nie reagują na bodźce zewnętrzne. Tylko niektóre chomiki mają porażone tylne kończyny.

Na zakażenie podskórne badanymi szczepami wrażliwe są chomiki. Myszy są częściowo wrażliwe tylko na zakażenie szczepem Wnukowo 3 (chorują 1—3 zwierzęta na 10 zakażonych) i całkowicie niewrażliwe na zakażenie szczepami Wnukowo 4 i 5. Chomiki w pojedynczych przypadkach chorują po zakażeniu szczepem Wnukowo 4 i 5. Mała liczba zwierząt chorych po zakażeniu podskórnym nie daje podstawy do wyciągania wniosków odnośnie obrazu klinicznego i czasu trwania choroby. U chorych zwierząt obserwowano niedowłady i porażenia, czas trwania choroby był u nich wydłużony do 5—6 dni.

#### *Badanie neuropatologiczne*

##### *Chomiki zakażone domózkowo i podskórnie*

Chomiki zakażone domózkowo. U wszystkich badanych chomików stwierdzono zapalenie oun z towarzyszącym zajęciem opon mózgowo-rdzeniowych, przy czym nasilenie odczynów tkankowych oraz zasięg zmian zapalnych wykazywały znaczne różnice u poszczególnych zwierząt zakażonych szczepem wirusa na tym samym etapie pasażu tkankowego. To zróżnicowanie nasilenia odczynów obserwowano również w grupach zwierząt usypianych w tym samym czasie po zakażeniu, a przede wszystkim w okresie inkubacji choroby. U chomików usypianych przed ujawnieniem się zmian klinicznych w obrazie mikroskopowym dominowało zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, z obecnością rozlanych i okołonaczyniowych nacieków zlokalizowanych głównie na podstawie mózgu i w rowku hipokampa. Nacieki te były utworzone głównie przez komórki jednojądrzaste szeregu limfocytarnego. U niektórych chomików poza zapaleniem opon, obserwowano zmiany śródmiąższowe w postaci nacieków okołonaczyniowych o takim samym składzie jak w oponach, zwykle występujące w pobliżu ogniska pourazowej martwicy a niekiedy również w bardziej odległych strukturach oun. Czasami towarzyszył im odczyn gleju tworzącego luźne zagęszczenia w zewnętrznych warstwach kory lub wokół nacieczonych naczyń.

U chomików usypianych w okresie wczesnych objawów klinicznych zapalenie oun jest już w pełni wykształcone i ma uogólniony charakter.



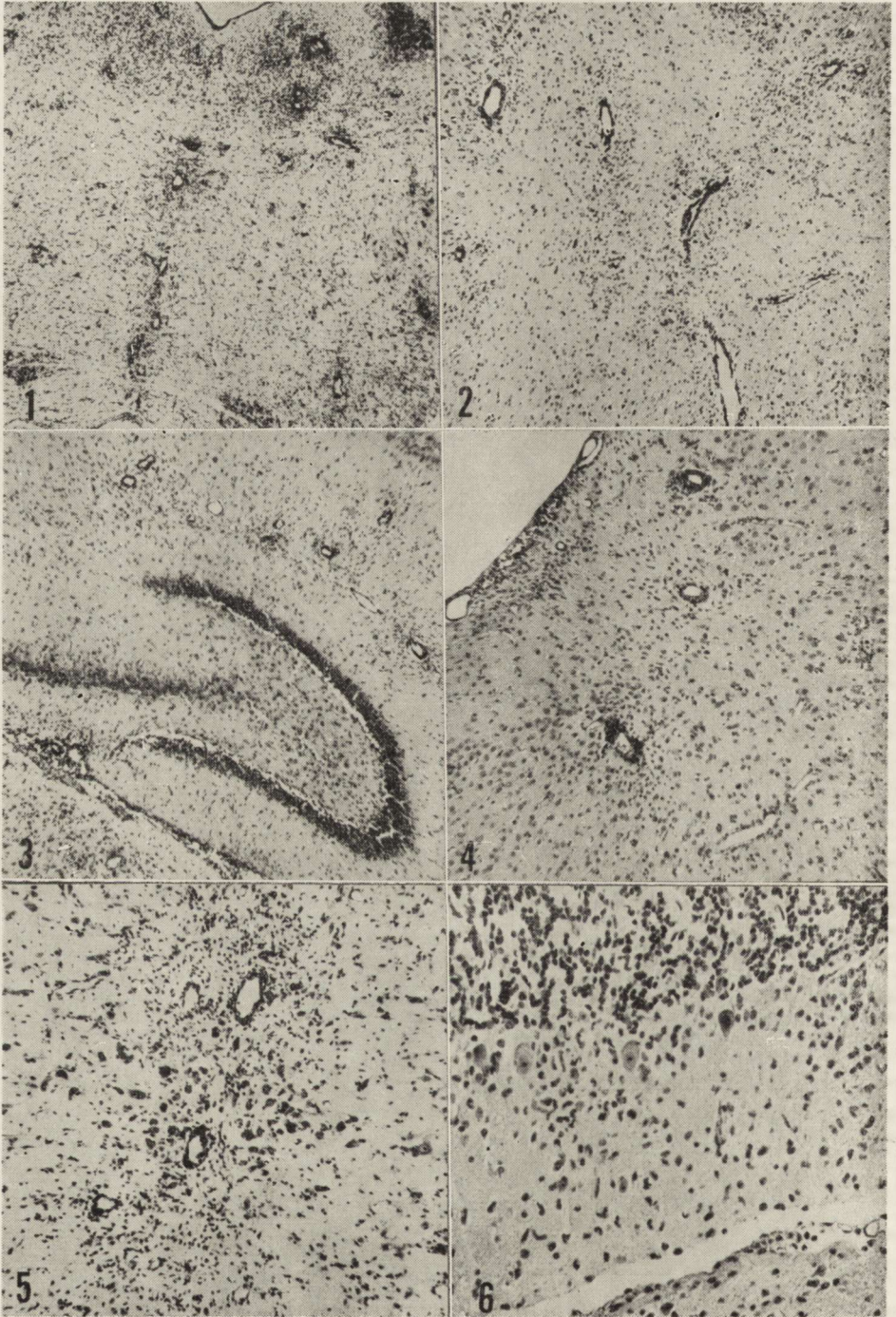
W porównaniu do poprzedniego okresu obserwuje się przewagę zmian w mózgu nad zmianami w oponach z pojawieniem się śródkankowych nacieków glejowych lub glejowo-mezodermalnych, z rozpadem neuronów i obecnością grudek neuronofagicznych. W tym okresie zwiększa się również obrzęk okołonaczyniowy i śródkankowy oraz narastają zmiany w naczyniach zarówno o typie obrzęku i pobudzenia śródbłonek jak i nacieków przynaczyniowych. W końcowym okresie choroby przede wszystkim ulegają nasileniu zmiany śródkankowe z narastaniem uszkodzenia komórek nerwowych i nacieków glejowych.

Zapalenie obejmuje oun w sposób nieciągły, „plamisty”, wykazując wyraźne powinowactwo do struktur szarych i wybiórczo do niektórych ugrupowań jądrowych (ryc. 1—6), jak np. dno komory IV, jądra szwu, jądra głębokie mózdzku, podwzgórze, wzgórze. Nasilenie odczynów zapalnych w zawojach hipokampa, jądrach przegrody i korze półkul mózgowych wiąże się z bezpośrednim działaniem wprowadzonego wirusa i dodatkowym wpływem mechanicznego urazu tkanki.

Zmiany zapalne w mózgach chomików zakażonych domózkowo mają taki sam charakter, niezależnie od użytego wariantu szczepu Wnukowo 32. Przy zakażeniu szczepami wirusa na coraz wyższym poziomie atenuacji, postępującej w miarę liczby pasaży na hodowli tkankowej, nasilenie procesu zapalnego zmniejsza się (ryc. 1—8), przy czym dotyczy to przede wszystkim uszkodzenia neuronów i śródkankowych odczynów glejowych, a w mniejszym stopniu okołonaczyniowych nacieków mezodermalnych. Największe uszkodzenia parenchymalne z obecnością rozległych martwic śródkankowych, głównie w półkulach mózgu stwierdzono u zwierząt zakażonych szczepem Wnukowo 3, najmniejsze zmiany w populacji neuronalnej powodował szczep Wnukowo 5. Ciałek Negriego nie znaleziono w badanym materiale.

Zakażenie o b w o d o w e chomików, powodujące zróżnicowaną odpowiedź kliniczną, znajduje równie zróżnicowany wykładnik patomorfologiczny. U zwierząt, które zachorowały obserwowano zapalenie mózgu o takiej samej strukturze procesu jak po zakażeniu domózkowym, ale o odmiennym rozkładzie zmian w oun. Największe nasilenie odczynów zapalnych obserwowano w obrębie struktur pnia mózgu (ryc. 7 i 8), jąder mózdzku, wzgórza i podwzgórza przy wyraźnie mniejszym zajęciu lub nawet całkowitym oszczędzeniu zawojów hipokampa i kory półkul mózgowych. Wśród chomików, które nie zachorowały po zakażeniu podskórnym obserwowano zwierzęta, u których nie stwierdzono również w oun żadnych patomorfologicznych wykładników procesu chorobowego oraz chomiki, u których rozwinęło się subkliniczne zapalenie mózgu, przeważnie z zajęciem tylko niektórych ugrupowań jądrowych (ryc. 9—12), najczęściej jąder mózdzku, pnia mózgu, opuszki i wzgórza.







Przy zakażeniu obwodowym chomików szczepami wirusa na coraz wyższym poziomie atenuacji obserwowano zmniejszanie się liczby zwierząt zarówno z klinicznym jak i klinicznie bezobjawowym zapaleniem mózgu oraz osłabienie odczynów zapalnych w grupach zwierząt zakażonych poszczególnymi szczepami wirusa.

*Myszy zakażone domózkowo i podskórnice*

U myszy zakażonych domózkowo zapalenie mózgu ujawnia się już w okresie inkubacji choroby, przy czym w tej wczesnej fazie zakażenia ogranicza się do otoczenia pourazowej martwicy. W obrazie morfologicznym dominują nacieki w oponach rozlane i okołonaczyniowe. W okresie rozwiniętego zespołu objawowego zmiany są uogólnione. Oprócz opon, zwłaszcza podstawy mózgu, zajmują także struktury oun i są najbardziej nasilone w zakrętach hipokampa, jądrach przegrody i korze półkul mózgowych (ryc. 13 i 14). Nacieki utworzone głównie przez limfocyty i pojedyncze komórki plazmatyczne z opon szerzą się wzdłuż naczyń lub bezpośrednio penetrują do tkanki. Nacieki o takim samym składzie występują również wokół naczyń śródmiąższowych. Pomnożenie gleju z obecnością pałeczkowatych postaci mikrogleju wystę-

*Ryc. 1.* Sad 4. Chomik zakażony domózkowo. Zmiany zapalne w opuszce, szczególnie nasilone pod dnem komory IV i w okolicy szwu. Fiolet krezyłu. Pow. 30 ×  
*Fig. 1.* Sad 4. Hamster inoculated intracerebrally. Inflammatory changes in medulla, especially pronounced near fourth ventricle and in raphe. Cresyl violet. × 30

*Ryc. 2.* Sad 5. Chomik zakażony domózkowo. Zagęszczenie gleju wokół nacieczonych naczyń w opuszce. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×

*Fig. 2.* Sad 5. Hamster inoculated intracerebrally. Concentration of glial cells around infiltrated vessels. Cresyl violet. × 60

*Ryc. 3.* Sad 4. Chomik zakażony domózkowo. Rozproszone nacieki mikroglejowe wokół nacieczonych naczyń w okolicy zawoju hipokampa. Fiolet krezyłu. Pow. 60 ×

*Fig. 3.* Sad 4. Hamster inoculated intracerebrally. Disperse microglia infiltrates around blood vessels with inflammatory changes. Cresyl violet. × 60

*Ryc. 4.* Sad 5. Chomik zakażony domózkowo. Zmiany zapalne w górnych warstwach kory na poziomie wkłucia. H. E. Pow. 100 ×

*Fig. 4.* Sad 5. Hamster inoculated intracerebrally. Inflammatory reaction in the upper cortical layers on the level of injection. H. E. × 100

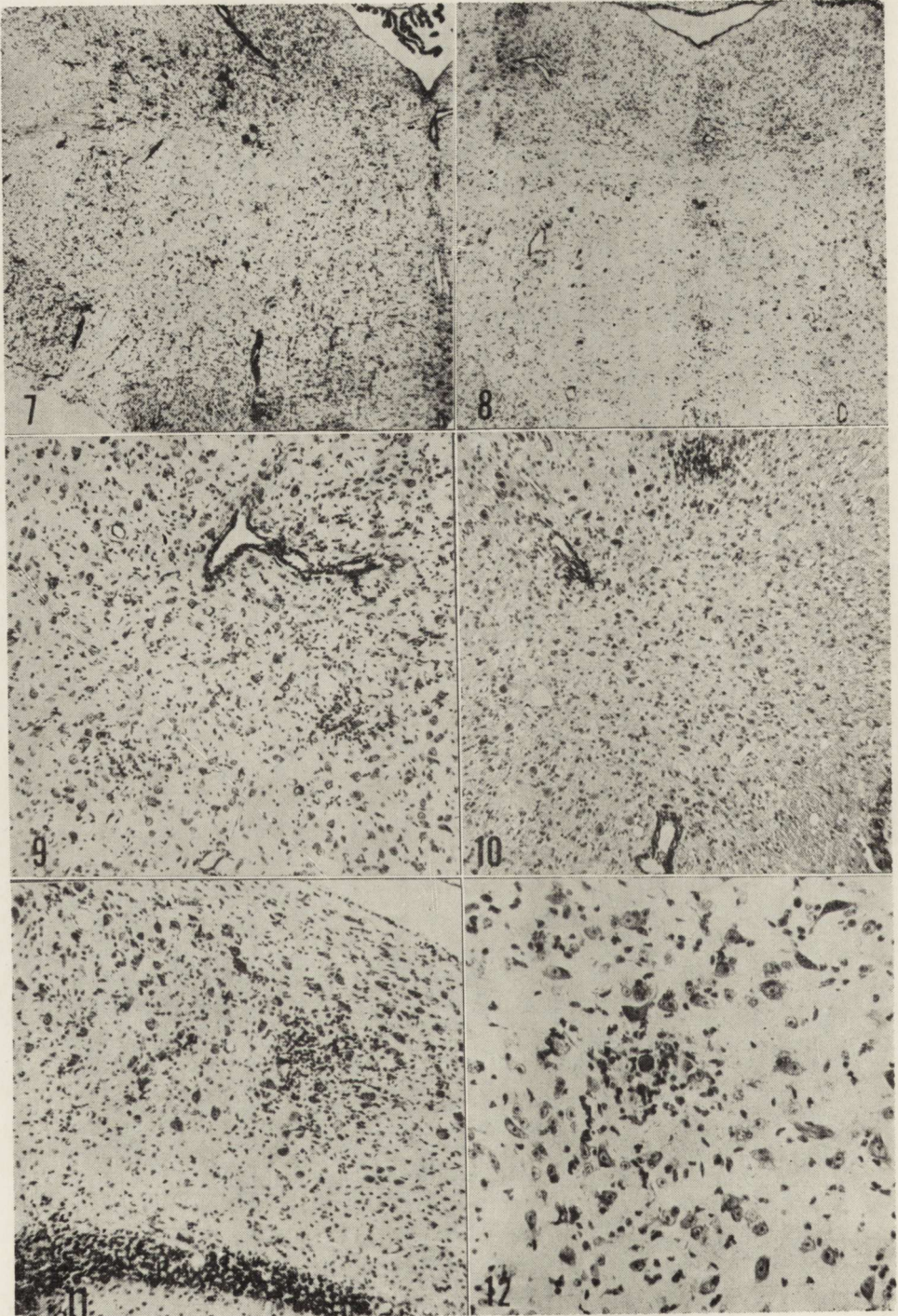
*Ryc. 5.* Sad 4. Chomik zakażony domózkowo. Nacieki zapalne i ławicowy rozplem gleju w okolicy szwu w opuszce. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 5.* Sad 4. Hamster inoculated intracerebrally. Perivascular and glial infiltrations in area of raphe in medulla. Cresyl violet. × 100

*Ryc. 6.* Sad 5. Chomik zakażony domózkowo. Uszkodzenie komórek Purkinjego i nacieki śródtkankowe w korze mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

*Fig. 6.* Sad 5. Hamster inoculated intracerebrally. Impairment of Purkinje cells and parenchymal infiltrations in cerebellar cortex. Cresyl violet. × 200







puje przeważnie w sposób rozsiany podoponowo i w głębszych warstwach kory półkul mózgowych, we wzgórzu, w warstwie drobinowej kory mózdzku, a szczególnie w zawojach hipokampa (ryc. 14), w którym czasami tworzy bardziej zbity naciek. Rozplem mikrogleju spotyka się również wokół nacieczonych naczyń, a także, chociaż mniej licznie w ugrupowaniach jądrowych pnia mózgu i rdzenia.

U myszy zakażonych domózgowo zapalenie mózgu jest znacznie mniej nasilone niż u chomików zakażonych tymi samymi wariantami szczepu. Nie wykazują one tendencji do tworzenia tak wyraźnych grudek neuronofagicznych oraz do tworzenia śródtkankowych pól rozplemu glejowego. U myszy zakażonych domózgowo największe uszkodzenia parenchymalne obserwuje się w zakrętach hipokampa, chociaż sporadycznie uszkodzenie neuronów i grudki neuronofagiczne spotyka się również w odległych strukturach oun (ryc. 16). Przy zakażeniu wyżej atenuowanymi wariantami szczepu Wnukowo 32 zmniejsza się nasilenie odczynów glejowych i mezodermalnych w niższych strukturach mózgu, wzrasta natomiast koncentracja odczynów wokół pourazowej martwicy i w zawojach hipokampa. Słabo wyrażona u myszy tendencja do tworzenia przez proliferujący mikroglej pałeczkowaty zagęszczeń i grudek neuronofagicznych (ryc. 17 i 18), w ogóle nie występuje przy zakażeniu szczepem Wnukowo 5.

*Ryc. 7.* Sad 4. Chomik zakażony obwodowo, objawowy. Zmiany zapalne w opuszce. Fiolet krezyłu. Pow. 30 ×

*Fig. 7.* Sad. 4. Hamster inoculated subcutan., symptomatic. Inflammatory changes in medulla. Cresyl violet. × 30

*Ryc. 8.* Sad 5. Chomik zakażony obwodowo, objawowy. Skąpe nacieki wokół naczyń i odczyn glejowy w opuszce. Fiolet krezyłu. Pow. 30 ×

*Fig. 8.* Sad 5. Hamster inoculated subcutan., symptomatic. Scanty perivascular infiltrates and glial proliferation in medulla. Cresyl violet. × 30

*Ryc. 9.* Sad 4. Chomik zakażony obwodowo, klinicznie bezobjawowy. Zmiany zapalne we wzgórzu. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 9.* Sad 4. Hamster inoculated subcutan., asymptomatic. Inflammatory changes in thalamus opticus. Cresyl violet. × 100

*Ryc. 10.* Sad 4. Chomik zakażony podskórnio, bezobjawowy. Nacieki okołonaczyniowe i grudka glejowa w jądrze mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 10.* Sad 4. Hamster inoculated subcutan., asymptomatic. Perivascular infiltrates and glial nodule in cerebellar nucleus. Cresyl violet. × 100

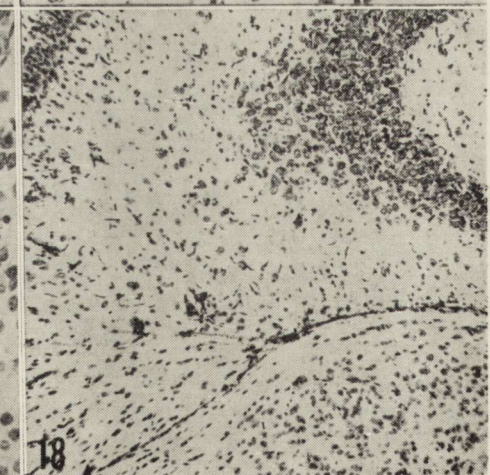
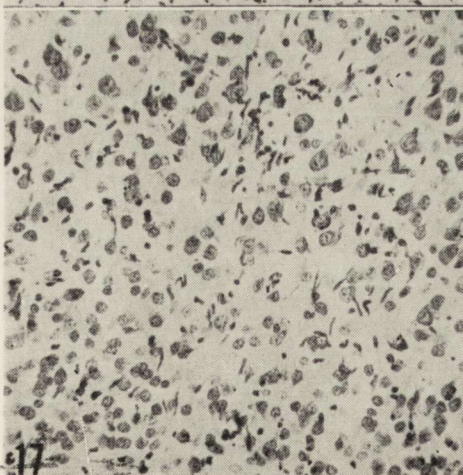
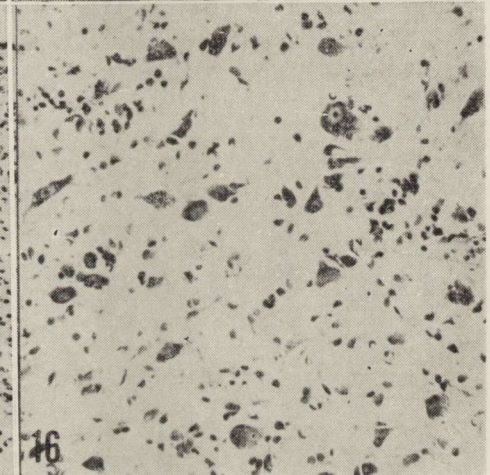
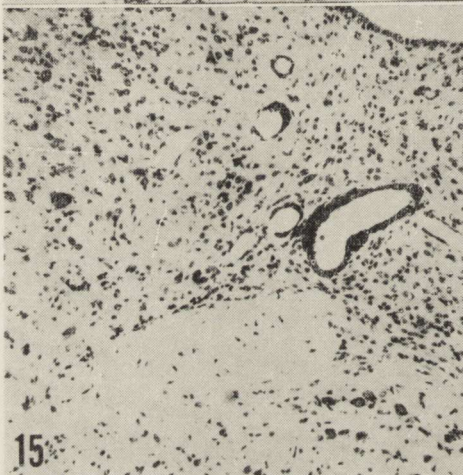
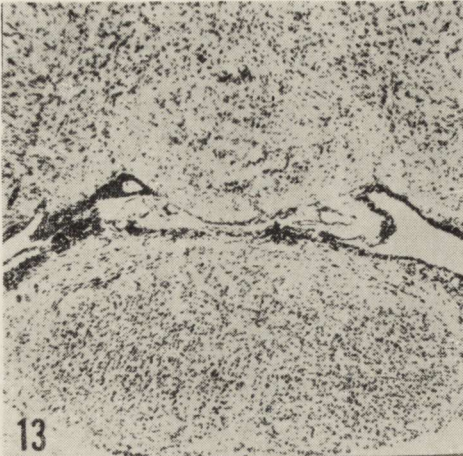
*Ryc. 11.* Sad 5. Chomik zakażony podskórnio, bezobjawowy. Uszkodzenie neuronów i naciek glejowy w mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 11.* Sad 5. Hamster inoculated subcutan., asymptomatic. Neuronal damage and glial infiltration in cerebellum. Cresyl violet. × 100

*Ryc. 12.* Sad 5. Chomik zakażony podskórnio, bezobjawowy. Uszkodzenie neuronów i grudka glejowa w opuszce. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

*Fig. 12.* Sad. 5. Hamster inoculated subcutan., asymptomatic. Neuronal damage and glial nodule in medulla. Cresyl violet. × 200







U myszy chorych po zakażeniu podskórnym szczepem Wnukowo 3, struktura procesu była podobna jak po zakażeniu domózgowym, ale największe zmiany obserwowano w obrębie pnia mózgu. U myszy, które nie zachorowały po podskórnym zakażeniu zarówno szczepem Wnukowo 3, jak i pozostałymi wariantami, nie stwierdzono żadnych wykładników patomorfologicznych zapalenia oun.

#### OMÓWIENIE

Jednym z wykładników osłabienia neurowirulencji poszczególnych wariantów szczepu Wnukowo było zmniejszenie się nasilenia odczynów zapalnych w oun po domózgowym i obwodowym zakażeniu chomików i myszy. Proces ten przebiegał równolegle ze zmianą właściwości chorobotwórczych badanych szczepów i klinicznego obrazu choroby. Modyfikacja obrazu klinicznego u zwierząt doświadczalnych wiąże się między innymi ze zmniejszaniem się w miarę liczby pasaży nasilenia i rozległości zapalenia oun, przede wszystkim w mniejszym nasileniu obrzęku i wyraźnym zmniejszaniu się uszkodzeń parenchymalnych. Przy zakażeniu obwodowym badany szczep zachowywał się niejednakowo w stosunku do chomików i myszy, wykazując większą potogЕННОść w stosunku do chomików na wszystkich etapach pasażu tkankowego. Różna

---

*Ryc. 13.* Sad 4. Mysz zakażona domózgowo. Obfity naciek limfocytarny w oponach podstawy mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 13.* Sad. 4. Mouse inoculated intracerebrally. Abundant lymphocyte infiltration of the brain base meninges. Cresyl violet. × 100

*Ryc. 14.* Sad 4. Mysz zakażona domózgowo. Przynaczyniowe nacieki w oponach i śródmiaższowe w zawoju hipokampa oraz pobudzenie gleju komórkowego. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 14.* Sad 4. Mouse inoculated intracerebrally. Perivascular infiltrates in Ammon's horn with activation of glial cells. Cresyl violet. × 100

*Ryc. 15.* Sad 4. Mysz zakażona domózgowo. Przynaczyniowe nacieki zapalne w opuszcze. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

*Fig. 15.* Sad 4. Mouse inoculated intracerebrally. Perivascular infiltrates in medulla. Cresyl violet. × 100

*Ryc. 16.* Sad 4. Mysz zakażona domózgowo. Uszkodzenie neuronów i neuronofagia w rdzeniu szyjnym. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

*Fig. 16.* Sad. 4. Mouse inoculated intracerebrally. Damage of neurons and neuronophagic nodule in cervical spinal cord. Cresyl violet. × 200

*Ryc. 17.* Sad 4. Mysz zakażona domózgowo. Rozplem gleju pałeczkowatego w korze mózgu. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

*Fig. 17.* Sad 4. Mouse inoculated intracerebrally. Proliferation of rod cells in cerebral cortex. Cresyl violet. × 200

*Ryc. 18.* Sad 5. Mysz zakażona domózgowo. Rozplem mikrogleju pałeczkowatego w zawoju hipokampa. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

*Fig. 18.* Sad 5. Mouse inoculated intracerebrally. Microglia proliferation in Ammon's horn. Cresyl violet. × 200

wrażliwość myszy i chomików na zakażenie wirusem wścieklizny znajduje również wykładnik w niejednakowym nasileniu procesu zapalnego u obu gatunków zwierząt z występowaniem większych i bardziej rozległych odczynów zapalnych i uszkodzeń parenchymalnych u chomików. Uszkodzenie neuronów u chomików zakażonych domózgowo występuje w strukturach oun odległych od miejsca wprowadzenia wirusa (pień mózgu, rdzeń kręgowy) a grudka neuronofagiczna i ławicowy naciek mikroglejowy należą do stałych elementów obrazu patomorfologicznego. U myszy natomiast tendencja do tworzenia grudek neuronofagicznych i zagęszczeń glejowych jest bardzo słabo wyrażona. Podobnie słabo nasilone odczyny zapalne u myszy zakażonych wirusem CVS obserwował Johnson (1965) uzyskując miano wirusa równe  $10^8$  LD<sub>50</sub>/g.

Ewolucję rozwoju zmian w przebiegu zapalenia mózgu u zwierząt zakażonych wirusem wścieklizny oraz zmniejszanie się nasilenia poszczególnych odczynów w miarę atenuacji szczepu szczepionkowego można tłumaczyć przyjmując podwójny charakter odczynu zapalnego na obecność wirusa wścieklizny, podobnie jak uczynił Simon (1966) i Simon i wsp. (1970) w doświadczalnym zakażeniu małp wirusem *Poliomyelitis*. W pierwszej fazie wirus dostaje się lub zostaje wprowadzony do mózgu. Z miejsca wprowadzenia rozprzestrzenia się po całym układzie nerwowym, m.in. prawdopodobnie drogą płynu mózgowo-rdzeniowego. Johnson (1965, 1971) po obwodowym zakażeniu zwierząt wirusem fixe wykazał jego obecność w układzie nerwowym po 24 godzinach od zakażenia. Pierwsza i wczesna reakcja limfocytarna opon i układu naczyniowego może stanowić odpowiedź immunologiczną na antygen wirusowy. Nie udało się jednak przy pomocy metody immunofluorescencji wykazać obecności wirusa zarówno w oponach mózgu, jak i śródbłonkach i innych elementach strukturalnych układu naczyniowego (Johnson 1971). Po przedostaniu się do mózgu wirus powoduje uszkodzenie i rozpad neuronów, a produkty tego rozpadu, zawierające również antygen wirusowy, powodują wtórny odczyn zapalny z udziałem mikrogleju i elementów krwiopochodnych — leukocytów i limfocytów (Simon 1966, Simon i wsp. 1970).

Przy takim ujęciu rozwoju odczynów zapalnych przy zakażeniu szczepem szczepionkowym wirusa wścieklizny należałoby przyjąć jako korzystne kryterium atenuacji zmniejszanie się uszkodzeń neuronalnych, wskazujących na obniżanie się właściwości cytopatycznych wirusa. Postulat ten spełniają wyraźniej chomiki, u których w miarę liczby pasaży występuje po zakażeniu domózgowym przesunięcie akcentu w strukturze zmian zapalnych w kierunku okołonaczyniowego nacieku.

Przy standardowej kontroli neurowirulencji atenuowanej szczepionki przeciwko *poliomyelitis* przyjęto 4-stopniową ocenę zmian histopatolo-



gicznych, przy czym wykładnikiem największych uszkodzeń (określonych liczbami 3 i 4) jest rozpad lub nieodwracalne uszkodzenie komórek nerwowych. Atenuowany wirus szczepionkowy musi zachować właściwość wywoływania zapalenia mózgu o typie *poliomyelitis*, przy czym określone parametry liczbowe zabezpieczają przed możliwością użycia szczepu o zwiększonej neurowirulencji (Boulger 1973). Nasze badania, prowadzone na niewielkim materiale i przy użyciu tylko jednego rozcieńczenia wirusa nie mogą stanowić podstawy dla ilościowej oceny zmian, zobiektywizowanej przez zastosowanie statystycznych obliczeń, jak to ma miejsce w teście bezpieczeństwa przy kontroli szczepionki przeciwko *poliomyelitis*. Z przeprowadzonych przez nas obserwacji wynikają jednak pewne przesłanki praktyczne w aspekcie wyboru zwierzęcia doświadczalnego dla oceny neurowirulencji szczepu szczepionkowego wirusa wścieklizny. Do badań tego typu bardziej przydatne są zwierzęta, u których w przebiegu zapalenia można wyraźnie rozgraniczyć dwa typy odczynów tkankowych i u których zmiany strukturalne są najbardziej zbliżone do zmian występujących w przebiegu spontanicznego zakażenia u człowieka i zwierząt domowych. Z tego względu znacznie wygodniejszym modelem do badań jest chomik, u którego można prześledzić wspomnianą uprzednio sekwencję rozwoju zakażenia, podobnie jak przy zakażeniu wirusem *poliomyelitis*.

Po zakażeniu podskórnym chomików występowało u niektórych zwierząt zapalenie mózgu bez ujawnienia się klinicznych objawów choroby. Fischman i Strandberg (1973) zwrócili uwagę na podkliniczny przebieg zakażenia u myszy zakażonych szczepem HEP, przy czym obserwowane przez nich zmiany cofały się całkowicie w ciągu dwóch miesięcy.

W przeciwieństwie do chomików, u myszy zakażonych domózkowo, pomimo wyraźnego zespołu objawów klinicznych występowały stosunkowo niewielkie zmiany histopatologiczne, zwłaszcza przy zakażeniu szczepem na 75 lub 118 etapie pasażu przez hodowle tkankowe.

Wg Johnsona (1971) objawy kliniczne po zakażeniu wirusem wścieklizny są raczej wynikiem dysfunkcji neuronów niż efektem cytopatycznego działania wirusa. Miyamoto i Matsumoto (1967) badając zmiany w mózgu wywołane przez atenuowany szczep Flury HEP wykazali w mikroskopie elektronowym ciężkie uszkodzenie cytoplazmy i jąder komórkowych, chociaż szczep ten jest niepatogenny przy zakażeniu domózkowym dla większości zwierząt. Ocena zmian w neuronach, które we wczesnej fazie zapalenia mają charakter nieswoistych uszkodzeń jest bardzo trudna, zwłaszcza po zakażeniu domózkowym, ze względu na możliwość występowania u chorych zwierząt podobnych zmian w następstwie zaburzeń krążenia lub zaburzeń metabolicznych.

## WNIOSKI

1. Jako wskaźnik atenuacji szczepu szczepionkowego wirusa wścieklizny należy przyjąć zmniejszenie się uszkodzeń parenchymalnych oraz towarzyszących im odczynów glejowo-mezodermalnych. Zmniejszenie nasilenia odczynów tkankowych może stanowić jeden z czynników warunkujących zmianę klinicznego przebiegu zakażenia.

2. Zespół zmian patomorfologicznych jest niejednakowy u zakażonych myszy i chomików. Większe nasilenie i zróżnicowanie odczynów tkankowych u chomika, będące wykładnikiem jego większej wrażliwości na zakażenie wirusem wścieklizny pozwala na dokładniejszą ocenę zmian strukturalnych w przebiegu zakażenia.

3. Brak klinicznych objawów choroby u zakażonych chomików nie wyklucza u tych zwierząt rozwoju zapalenia mózgu, wykrywalnego w badaniu mikroskopowym.

4. Patomorfologiczna ocena zmian w ośniku może być traktowana jako kryterium neurowirulencji szczepu szczepionkowego wirusa wścieklizny. Praktyczne jej zastosowanie wymagałoby opracowania standardów, podobnie jak w teście neurowirulencji dla szczepu szczepionkowego wirusa *poliomyelitis*.

И. Б. Зельман, Д. Серокова

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ КАК КРИТЕРИЙ АТТЕНУИРОВАНИЯ ВИРУСА БЕШЕНСТВА, ПАССАЖИРОВАННОГО НА ТКАНЕВОЙ КУЛЬТУРЕ

Резюме

Были исследованы патоморфологические изменения в головном и спинном мозге взрослых хомяков и мышей, зараженных интрацеребрально и подкожно аттенуированным вирусом бешенства. Для исследований был использован штамм Внуково-32 (получен из Института Полимиелита и Вирусных Воспалений Мозга в Москве) после пассажей 32—33, 74—75 и 118—119 на тканевой культуре.

Интрацеребральное заражение вызывает у обоих видов животных развитие воспаления мозга с характерной структурой и топографией, причем более сильная и дифференцированная реакция у хомяков указывает на их большую чувствительность к заражению. Обнаруженное ослабление воспалительных реакций по мере усиления аттенуирования, и особенно, уменьшение интенсивности нейрональных повреждений можно расценивать как показатель ослабления нейровирулентности штамма вируса и благоприятный показатель аттенуации.

К подкожному заражению исследуемым штаммом чувствительны хомяки, причем у некоторых животных развивается субклинический вид воспаления мозга.



I. B. Zelman, D. Serokowa

PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM  
AS A CRITERION OF ATTENUATION OF RABIES VIRUS STRAIN  
FOLLOWING TISSUE CULTURE PASSAGE

Summary

Pathomorphological changes in the brain and spinal cord of adult hamsters and mouse inoculated intracerebrally and subcutaneously with attenuated rabies virus strain were studied. Virus strain Vnukovo 32 (obtained from the Institute of Poliomyelitis and Virus Encephalitides in Moscow) after 32—33, 74—75 and 118—119 tissue culture passages was used.

Intracerebral inoculation caused in both kinds of animals the development of encephalitis with characteristic structure and topography of inflammatory changes. The more pronounced encephalitic process in hamsters with greater tissue (neuronal) destruction suggests greater susceptibility of these animals to the rabies virus infection.

The decrease of inflammatory changes with the increased number of passages, before all the neuronal damage could be an exponent of the decreasing neurovirulence of virus strain as well as a good index of attenuation process.

It was discovered that hamsters are more vulnerable also on peripheral inoculation and may develop at the peripheral route of infection subclinical form of encephalitis.

PIŚMIENNICTWO

1. Aksjonova T. A., Selimov M. A.: Experimentalnoje proizvodstvo i kontrol kulturalnoj antirabiczskoj wakkiny. Materiały XVI Sesji Naukowej Instytutu Poliomyelitis, Moskwa 1969, 3.
2. Boulger L. R.: The neurovirulence test for live poliomyelitis vaccine. *J. Biol. Stand.* 1973, 1, 119—138.
3. Fischman H. R., Stranberg J. D.: Inapparent rabies virus infection of the central nervous system. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 1973, 163, 1050—1055.
4. Gribencha L. F.: Biologiczeskaja i serologiczeskaja charakteristika atenuirowannogo wariantu sztamma Wnukowo 32. Materiały XVIII Sesji Naukowej Instytutu Poliomyelitis, Moskwa 1973, 483.
5. Johnson R. T.: Experimental rabies. Studies of cellular vulnerability and pathogenesis using fluorescent antibody staining. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1965, 24, 662—674.
6. Johnson R. T.: The pathogenesis of experimental rabies. W: Rabies. Eds.: Y. Nagano, F. M. Davenport. University of Tokyo Press. Tokyo 1971.
7. Miyamoto K., Matsumoto S.: Comparative studies between pathogenesis of street and fixed rabies infection. *J. exp. Med.* 1967, 125, 447—456.
8. Perkins P. T.: Criteria for the acceptability of the virus strain and production methods for the newer rabies vaccine and immune serum. *Symp. Series Immunobiol. Stand. Karger S.*, 1974, 21, 60.
9. Serokowa D.: Współczesne kryteria biologicznej oceny szczepów szczepionkowych wirusa wścieklizny. *Przegl. Epid.* 1976, 30, 309.

10. Serokowa D., Gribencha L. F., Aksjonova T. A., Selimov M. A.: Biological criteria of attenuation of tissue culture vaccine rabies strain Vnukovo 32 tested in vivo. Referat wygłoszony w Poznaniu na konferencji poświęconej wściekliczynie. 24—28.X.1977.
11. Simon J.: Pathology of poliomyelitis in monkeys. Internat. Symp. on Neurovirulence, Munich 1965. Symp. Series Immunobiol. Stand. Karger, Basel, 1974.
12. Simon J., Peters G., Blinzinger K., Boulger L., Margrath D.: Neue Gesichtspunkte zur Frage der Entstehung und der pathogenetischen Bedeutung der entzündlichen Reaktion bei Virusinfektionen der Z.N.S. Arch. Psychiat. Nervenkrankh. 1970, 213, 301—326.
13. Zelman I. B., Serokowa D.: Porównawcze badanie zmian morfologicznych w mózgu zwierząt laboratoryjnych zakażonych szczepem ustalonego i atenuowanego wirusa wściekliczyny. Neuropat. Pol. 1976, 14, 67—80.

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



MARIA DAŃBSKA, BOGNA SCHMIDT-SIDOR

## FAMILIAL INFANTILE SPONGY GLIO-NEURONAL DYSTROPHY

(Progressive cerebral poliodystrophy)

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

Head: Ass. Prof. M. Dańska

Department of Neuropathology of the Psychoneurological Institute, Warsaw

Head: Prof. J. Dymecki

The first report concerning diffuse degeneration of the cerebral cortex in a child was given by Alpers (1931). Since then several infantile cases have been reported, in which neuropathological examination revealed diffuse damage of the grey matter, mainly of the cerebral cortex. Morphological appearance suggested its progressive degeneration with the secondary changes in other structures of the central nervous system. The first symptoms usually occur in childhood, frequently in early infancy. They consist of mental deterioration, progressive spastic paresis, focal or generalized seizures, occasionally myoclonic, in several cases involuntary movements, blindness and disorders of hearing. Death is usually preceded by the state of decerebration.

Many of the reported cases were discussed from the point of view, whether the changes were due to egzogenic injury or they were the manifestation of the so-called idiopathic degeneration of the hereditary-familial character. The possibility of coexistence of both these factors was also considered (Bailey, Woodart, 1956; Courville, 1960; Gross, Kaltenbäck, 1960; Christensen, Hojgaard, 1964). A clinical and morphological analysis of the following case may demonstrate the encountered problems.

*Case 1.* M. W., a girl, the first child of healthy parents. Family history without significance. The child was born in asphyxia. The psycho-motoric development was retarded since birth, she neither walked, nor talked. Muscular tension was lowered. Since early infancy the girl had generalized epileptic seizures. She died at the age of 5 years in the state of cachexia.

Macroscopic examination of the brain showed diffuse atrophy of cerebral cortex and marked enlargement of ventricular system (Fig. 1). Microscopic examination revealed widespread depletion and damage of neurons, most pronounced in cerebral cortex. Basal ganglia showed also severe lesions. Injuries were diffuse but not uniform. Some segments of cortical layers were almost totally deprived of cells with abundant proliferation of the fibrous glia (Fig. 2). In other areas relatively more neurons were preserved (Fig. 3) and glial reaction was characterized by the presence of gemistocytic astrocytes (Fig. 4). Even in the best preserved convolutions, among other in Ammon's horn, cell loss led to the impairment of the cortical structure. In several areas spongy degeneration was observed. The microcystic degeneration was noted in the putamen (Fig. 5). Myelin pallor and mild spongy degeneration was observed in the white matter, the latter mainly in the subcortical area. The brain stem and cerebellum were less damaged showing several neurons with normal tigroid.

In the presented case such factors as perinatal asphyxia and epileptic seizures could cause brain injury. They could also develop in connection with the already existing lesion of the nervous tissue. The presence of older and more recent lesions suggests the existence of progressive process leading to the changes of rather systemic than focal character. Thus it does not resemble the lesions usually encountered in perinatal asphyxia. The topography of brain changes is also not characteristic for postepileptic lesions. Moreover, the brain damage was much more severe than it could be expected from clinically described

---

*Fig. 1.* Cross section of the brain hemispheres. Case 1.  $\times 2,5$

*Ryc. 1.* Przekrój przez półkule mózgu. Przyp. 1. Pow. 2,5  $\times$

*Fig. 2.* Lack of neurons, spongy degeneration, fibrillary gliosis in the cortex. Case 1. Kanzler-Arendt,  $\times 200$

*Ryc. 2.* Brak neuronów, zgębczenie, glejoza włóknista w korze. Przyp. 1. Kanzler-Arendt. Pow. 200  $\times$

*Fig. 3.* Marked neuronal loss in cerebral cortex. Case 1. Cresyl violet,  $\times 200$

*Ryc. 3.* Nieliczne zachowane neurony w korze mózgu. Przyp. 1. Fiolet krezyłu. Pow. 200  $\times$

*Fig. 4.* Proliferation of gemistocytes in cortical area totally deprived of neurons. Case 1. Cresyl violet,  $\times 200$

*Ryc. 4.* Rozplam gemistocytów w korze całkowicie pozbawionej neuronów. Przyp. 1. Fiolet krezyłu. Pow. 200  $\times$

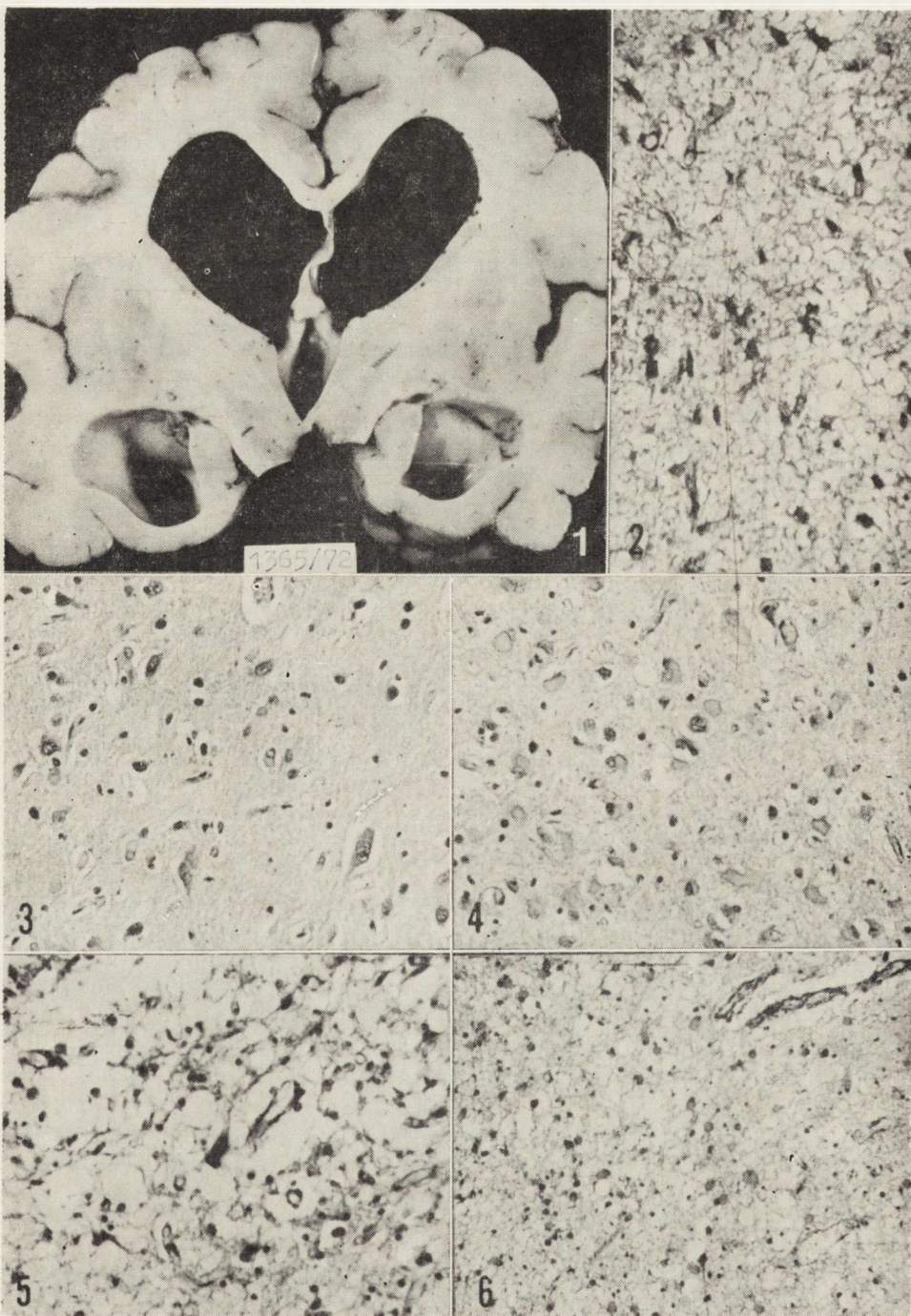
*Fig. 5.* Cystic degeneration in the putamen. Case 1. H-E,  $\times 200$

*Ryc. 5.* Zwyródnienie jamiste w skorupie. Przyp. 1. H.E. Pow. 200  $\times$

*Fig. 6.* Subcortical spongy degeneration. Case 1. Cresyl violet,  $\times 180$

*Ryc. 6.* Zwyródnienie gąbczaste w okolicy podkorowej. Przyp. 1. Fiolet krezyłu. Pow. 180  $\times$







incidents of hypoxia. This differentiation favours rather the diagnosis of progressive degeneration of the grey structures in which the lesions could be only intensified by the influence of egzogenic factors.

Similar lesions were often observed in more than one of siblings. Laurence and Cavanagh (1968) on the ground of their personal cases and the entire literature excluded a group with the distinctly hereditary-familial character. We had the opportunity to observe in Poland the first family in which three of five children died in early infancy, and post mortem examinations performed in two of them enabled to diagnose progressive cerebral poliodystrophy (Table 1).

Table 1. Data of siblings from observed family

Sex	Life span	Circumference of head	Seizures
F	died 6 weeks, not verified	31 cm (normal 36)	?
F	died 3 months (case 2)	29,5 cm (normal 39)	—
M	alive 13 years	—	—
F	died 1 month (case 3)	33 cm (normal 36)	+
F	alive 8 years	—	—

Case 2\*. *D. C.*, the second child of the family was born from normal pregnancy, with microcephaly. Since the third week of life respiratory disturbances were observed. Neurological examination showed increased muscular tension, tremor of hands, nystagmus, the presence of Gamper's symptom. The child died of cachexia at the age of 3 months. Brain examination revealed narrow and small cortical gyri, reduced white matter and enlarged ventricular system (Fig. 7). Atrophy of cortical pathways was also noted. The most intensive microscopic lesions were observed in the cerebral cortex in which diffuse, almost total neuronal loss was accompanied by prominent astrocytic gliosis (Figs. 8 and 9) and focal spongy degeneration. These changes were most pronounced at the level corresponding to the third and fifth cortical layers (Fig. 10) and at the border-line of the cortex and the white matter. Several nests of germinal cells in the Ammon's horn (Fig. 11) indicated some disorders of differentiation of this structure. In the reduced white matter marked, mainly fibrous gliosis was evident. Basal ganglia and brain stem were less damaged. Several neurons were quite normal here. In the cerebellum atrophy of single lobules with neuronal loss and gliosis was observed (Fig. 12).

Case 3. *D. M.*, the fourth child of the family, was born in the 38th week of pregnancy in cyanotic asphyxia. After birth and in the 4th

\* This case was published by Zelman et al. (1966).





Fig. 7. Atrophy of convolutions, sclerosis of white matter, hydrocephalus. Case 2. Kanzler-Arendt,  $\times 2,5$

Ryc. 7. Zanik zawojów, stwardnienie istoty białej, wodogłowie. Przyp. 2. Kanzler-Arendt. Pow.  $2,5 \times$

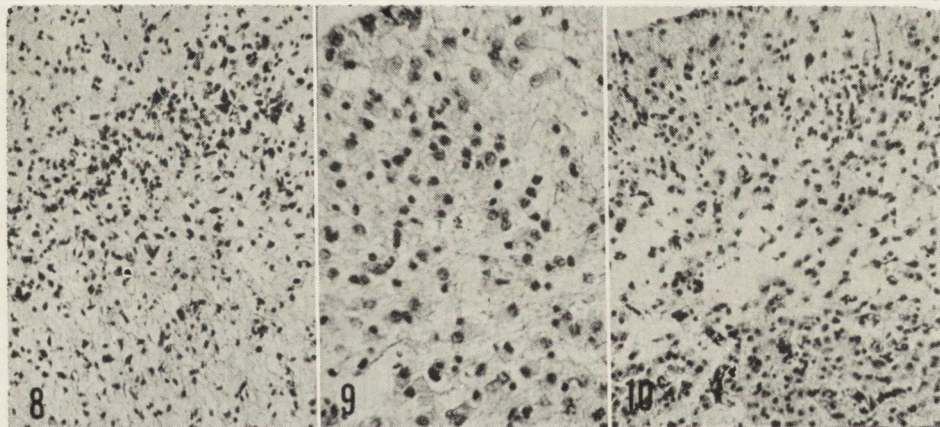


Fig. 8. Damage and loss of neurons in cerebral cortex. Case 2. Cresyl violet,  $\times 150$

Ryc. 8. Uszkodzenie i ubytki neuronów w korze mózgu. Przyp. 2. Fiolet krezyłu. Pow.  $150 \times$

Fig. 9. Astrocytes proliferation in cerebral cortex. Case 2. Cresyl violet  $\times 200$

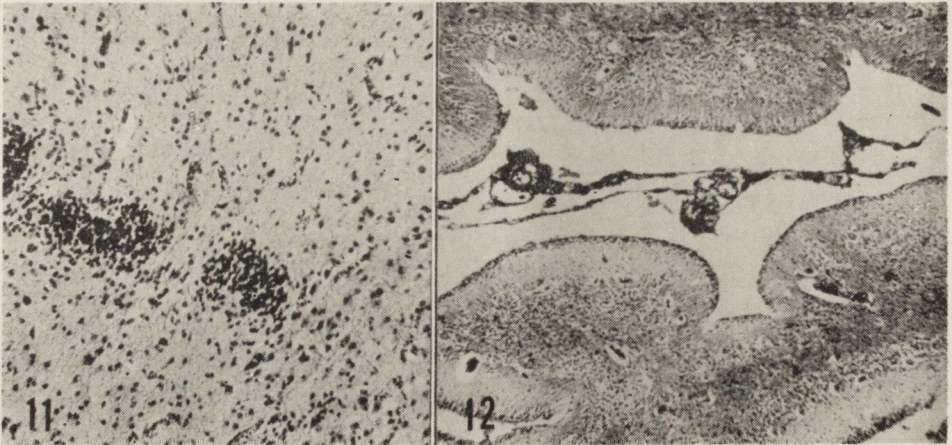
Ryc. 9. Rozplem gleju astrocytarnego w korze. Przyp. 2. Fiolet krezyłu. Pow.  $200 \times$

Fig. 10. Spongy degeneration in III cortical layer. Case 2. HE,  $\times 180$ .

Ryc. 10. Zgąbczenie w III warstwie kory. Przyp. 2. HE. Pow.  $180 \times$

week of life epileptic seizures appeared. Neurological examination revealed generalized excitability. In EEG record only seldom short series of low voltage theta waves appeared over the temporal regions.





*Fig. 11.* Nests of germinal cells in temporal cortex. Case 2. Cresyl violet.  $\times 150$   
*Ryc. 11.* Ogniska komórek macierzy w korze skroniowej. Przyp. 2. Fiolet kryzylu. Pow.  $150 \times$

*Fig 12.* Atrophic cerebellar lobuli. Case 2. Kanzler-Arendt.  $\times 15$   
*Ryc. 12.* Zanik płacików mózdzku. Przyp. 2. Kanzler-Arendt. Pow.  $15 \times$

The results of routine laboratory tests were normal. The X-rays examination of the skull showed microcephaly with roof-like overlapping of the skull bones at the sutures. The child died at the age of 1 month and 4 days. At autopsy partial pulmonary atelectasis and hyperemia were found. The brain weighed 240 g (normal 380 g), convolutions were small, uneven, some very narrow, particularly in the frontal region. Temporal lobes seemed quite normal. The ventricular system was dilated.

On microscopic examination diffuse changes were observed in the cerebral cortex and partially in the cerebellum. The secondary lesions concerned hemispheric white matter and brain stem pathways. The outline of the cortical ribbon, pattern of the convolutions and cellular appearance were distorted. In some areas the appearance of the cortex corresponded to micropolygyria (Fig. 1)). In other areas small convolutions were closely adjacent with „bridges” connecting their external layers (Fig. 14). Polygyria was also found, with rows of small blood vessels preserved at the level of potential division. The structure of cerebral cortex was distorted by prominent lesions (Fig. 15). In some convolutions neurons were substituted by proliferating glia (Fig. 16). In the better preserved areas the most advanced changes were visible in the third cortical layer. In this area spongy degeneration was observed. In narrow and shrunken white matter prevailed hypertrophy of cellular and fibrous glia (Fig. 17). The less damaged basal ganglia



exhibited neuronal loss and spongy tissue degeneration (Fig. 18). In the cerebellum focal microgyria and secondary lesions of Purkinje cells were found. Moreover, the striking underdevelopment of the peduncles and the pyramids was stated.

A comparison of case 2 and 3 permits to point out the following observations: Encephaloclastic process with spongy degeneration and secondary scarring mainly in the cerebral cortex prevail in case 2. In the case 3 the various types of disorders of the terminal fetal period concerning differentiation of the external cortical layers are visible. There also exists less advanced than in case 2, but leading to the same effect, the process of neuronal deterioration with secondary gliosis. In both cases we are dealing with a similar pathological process concerning mainly the cerebral cortex. In case 3 the process began earlier, intensively progressed during development, lasted short and caused lesser destruction of the neurons. In case 2 the process developed a little later but lasted longer and caused almost total destruction of the cortex. Though the first child in the family was not examined neuropathologically, we can assume that the disease is of familial character. Clinical disorders as respiratory disorders and epileptic seizures, observed in both examined children induced to perform chromosome studies in the remaining members of the family, the results of which were reported by Gniazdowska et al. (1969). It was established, that the mother and the third child (a healthy boy) had a normal karyotype. In the father deletion of short branches of chromosomes from group B with translocation from group C was detected. Lack of short branch of 4—5 pair of chromosomes with the possibly coexisting translocation of genetic material was stated in children with the cri du chat syndrome, described in 1964 by Lejeune et al. The children among other clinical symptoms have microcephaly. In relation to our cases it should be stressed that the radiological changes in the skull of case 3 indicate that microcephaly was secondary due to brain atrophy. On the other hand, the children with Lejeune's syndrome do not manifest the changes described in the reported cases (Solitare, 1967). Therefore, even if they had chromosomal disorders similar to those observed in the father of the reported family, these should be regarded as a coincidence of two pathological entities.

A detailed analysis of the published cases of familial infantile polydystrophy was done by Jellinger and Seitelberger (1970). In the literature our children belong to the youngest. So far, there was no case described, in which the process would begin so early in fetal life causing such profound disorders of the last phase of the cerebral cortex differentiation.



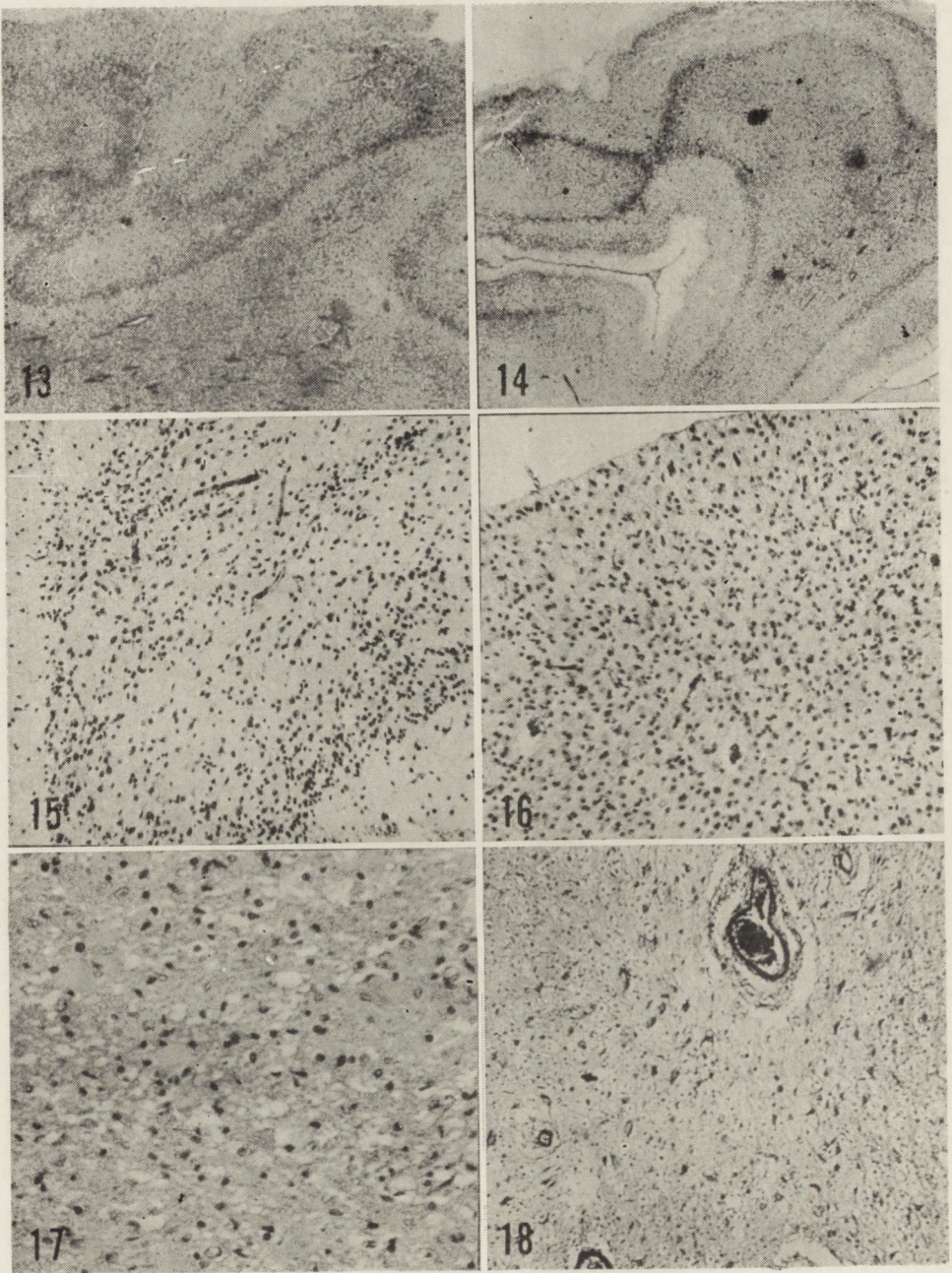


Fig. 13. Disturbances of cortical structure corresponding to microgyria. Case 3. Cresyl violet,  $\times 10$

Ryc. 13. Nieprawidłowa budowa kory o typie mikrogyrii. Przyp. 3. Fiolet kryzylu. Pow.  $10 \times$



Jellinger and Seitelberger divided cases described as progressive poliodystrophy into 3 groups: a symptomatic group, a group of atypic and unclassified cases and idiopathic group, usually familial. On the basis of morphological analysis they concluded that this chronic process occupying grey structures, especially cerebral cortex, consists of spongy degeneration of the neuropil due to vacuolation of neuronal processes and swelling of astroglia. According to their opinion this entity differs from spongy degeneration of van Bogaert type in predilection to the grey structures due to the damage of the glio-neuronal unit. Jellinger and Seitelberger propose for this entity the term of „spongy glio-neuronal dystrophy in infancy and childhood”. Therefore, it would belong to the same group as Jakob-Creutzfeldt's disease. In the paper published by Bohnert and Noetzel (1974) one brother of the two children previously described by Klein and Dichgans (1969) died at the age 20 years. Therefore, it seems that the age limit, as the border-line between various forms of spongy glio-neuronal dystrophy becomes indistinct.

Clinical and morphological picture of here presented cases (siblings) enables to include them to the spongy glio-neuronal dystrophy. In case 1 without family history the neuropathological examination suggests the possibility of similar disease.

Etiology of the above discussed entity, similarly as of other subacute and chronic spongy degenerations has not yet been finally clarified. The role of latent viruses in their development is considered (Gibbs, Gajdusek, 1970; Osetowska, 1971). The studies are also performed aiming at finding of the possible metabolic defect. Stefanko et al. (1975)

*Fig. 14.* Cerebral gyri linked by „bridges”. Case 3. Cresyl violet,  $\times 10$

*Ryc. 14.* Zakręty kory połączone „mostkami”. Przyp. 3. Fiolet krezyłu. Pow.  $10 \times$

*Fig. 15.* Almost total lack of neurons in the cortex. Case 3. Cresyl violet,  $\times 150$

*Ryc. 15.* Kora prawie całkowicie pozbawiona neuronów. Przyp. 3. Fiolet krezyłu. Pow.  $150 \times$

*Fig. 16.* Proliferation of astrocytes in the cortex deprived of neurons. Case 3. Cresyl violet,  $\times 150$

*Ryc. 16.* Glejoza astrocytarna w odcinku kory pozbawionym neuronów. Fiolet krezyłu. Pow.  $150 \times$

*Fig. 17.* Spongy changes and astrocytic gliosis in subcortical white matter. Case 3. Cresyl violet,  $\times 180$

*Ryc. 17.* Zmiany gąbczaste i glejoza astrocytarna w podkorowej istocie białej. Przyp. 3. Fiolet krezyłu. Pow.  $180 \times$

*Fig. 18.* Spongy changes in basal ganglia. Case 3. HE,  $\times 150$

*Ryc. 18.* Zmiany gąbczaste w zwojach podstawy. Przyp. 3. HE. Pow.  $150 \times$

found in two cases abnormalities in the fructose-L-6-phosphatase activity, one of the enzymes responsible for glycogenesis in the liver. This sporadic defects is often familial. Perhaps such factors as enzymatic defect or the presence of chromosomal disorders in the investigated by us family created background for the development of the disease of hereditary-familial character.

M. Dąbska, B. Schmidt-Sidor

## RODZINNA DZIECIĘCA GLIONEURONALNA DYSTROFIA GĄBCZASTA

### Streszczenie

Omówiono zagadnienie postępującego zwyrodnienia istoty szarej mózgu dzieci w oparciu o trzy przypadki obserwowane przez autorów. W pierwszym przypadku bez obciążenia rodzinnego analiza kliniczno-neuropatologiczna sugeruje, że uszkodzenia układu nerwowego nie są następstwem egzogennych czynników, lecz postępującego procesu chorobowego obejmującego głównie korę mózgu. Polega on na zaniku neuronów, rozroście gleju i zgnębzeniu tkanki. Dwa przypadki, w których stwierdziliśmy podobny zespół patomorfologiczny mają wyraźnie rodzinny charakter. Wśród pięciorga rodzeństwa troje z małopłowiec zmarło w niemowlęctwie, u dwojga z nich przeprowadzono badanie neuropatologiczne.

Całokształt badań pozwala w tych przypadkach rozpoznać dziecięcą glejowo-neuronalną dystrofię gąbczastą. Spośród dotychczas opisanych około 40 przypadków tego schorzenia, nasze przypadki wyróżniają się początkiem choroby już w okresie życia płodowego.

М. Домбска, В. Шмидт-Сидор

## НАСЛЕДСТВЕННАЯ ДЕТСКАЯ ГЛИОНЕВРАЛЬНАЯ ГУБЧАТАЯ ДИСТРОФИЯ

### Резюме

Обсуждена проблема прогрессирующей дегенерации серого вещества мозга детей на основе трех случаев, наблюдавшихся авторами. В первом случае без наследственного порока клинико-патологический анализ предполагает, что повреждения нервной системы являются следствием не экзогенных нарушений, а прогрессирующего процесса болезни, охватывающего главным образом кору мозга. Он заключается в атрофии нейрона, разрастании глии и образовании губчатости ткани. Два случая, в которых обнаружен подобный патоморфологический синдром, имеют явный наследственный характер. Из пяти братьев и сестер трое с микроцефалией умерло в младенчестве, у двух из них проводилось neuropatologicкое исследование. Совокупность исследований позволяет в этих случаях распознать детскую глионевральную губчатую дистрофию. Среди всех до сих пор описанных приблизительно 40 случаев наши случаи отличаются началом болезни уже в период утробной жизни.



## REFERENCES

1. Alpers B. J.: Diffuse progressive degeneration of the gray matter of the cerebrum. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 1931, 25, 469—505.
2. Bailay O., Woodard J.: Some problems in the pathology of mental deficiency with microencephaly. *Neurology*, 1956, 6, 751—774.
3. Bohnert B., Noetzel H.: Beitrag zur familiären spongiösen glio-neuralen Dystrophie. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1974, 218, 353—368.
4. Christensen E., Hojgaard K.: Poliodystrophia cerebri progressiva infantilis. *Acta neurol. scand.*, 1964, 40, 21—40.
5. Courville C. B.: Widespread softening of cerebral gray matter in infancy. *Bull. Los Angeles neurol. Soc.*, 1960, 25, 72—88.
6. Gibbs C. J., Gajdusek D. C.: Characterization and nature of viruses causing subacute spongiform encephalopathies. *Proc. VI Congress of Neuropath.*, 1970.
7. Gniazdowska Z., Oknińska A., Stolarska A.: Częściowa delecja ramion krótkich chromosomów z grupy B z przemieszczeniem do grupy D u ojca dzieci z mnogimi wadami rozwojowymi. *PTL* 1969, 24, 1845—1848.
8. Gross H., Kaltenbäck E.: Über eine Microcephalia vera mit Fehlbildung und ubiquitäres Laminärschädigung der Grosshirnrinde. *Wien. Ztschr. Nervenheilk.*, 1960, 17, 324—336.
9. Jellinger K., Seitelberger F.: Spongy glio-neuronal dystrophy in infancy and childhood. *Acta neuropath.*, 1970, 16, 125—140.
10. Klein H., Dichgans J.: Familiäre juvenile glio-neurale Dystrophie. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 1969, 212, 400—422.
11. Laurence K. M., Cavanagh J. B.: Progressive degeneration of the cerebral cortex in infancy. *Brain* 1938, 91, 261—280.
12. Lejeune J., Lafourcade J., de Grouchy J., Berger R., Gautier M., Salmon C., Turpin R.: Délétion partielle du bras court du chromosome 5. Individualisation d'un nouvel état morbide. *Sem. Hop. Paris* 1964, 40, 1069.
13. Osetowska E.: Zapalenia i zwyrodnienia mózgu a wirusy powolne i utajone. *Neuropat. Pol.*, 1971, 9, 1—12.
14. Solitare G. B.: The cri du chat syndrome: neuropathologic observations. *J. of Mental Def. Res.*, 1967, 11, 267—277.
15. Stefanko S., Gaillard J. L. J., Loonen M. C. B., Schenk V. D. W.: Poliodystrophia cerebri progressiva infantilis (Alpers' disease) in two cases of enzymatic deficiency. *Proc. VIIth Int. Congr. Neuropath.* Eds.: S. Környey, S. Tariska, G. Gosztonyi. *Excerpta Med. Amsterdam. Akademiai Kiado, Budapest* 1975, 2, 325—328.
16. Zelman I. B., Kroh H., Gniazdowska Z.: Przypadek mikrocefalii encefaloklastycznej. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 125—132.

Authors address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur Str., 02-093 Warsaw.

DANUTA MARKIEWICZ, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ,  
IRMINA B. ZELMAN, JERZY DYMECKI, JERZY BIENIASZ

A CASE OF METACHROMATIC LEUKODYSTROPHY  
WITH A CHRONIC COURSE \*

(Clinical-morphological-biochemical study)

Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, Warsaw

Head: prof. J. Dymecki

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

Head: prof. M. Wender

Department of Neuropathology, Experimental and Clinical Medical Research  
Centre, Polish Academy of Sciences, Warsaw

Head: prof. M. J. Mossakowski

Neurological Department, District Hospital for Nervous and Psychic Diseases,  
Lublin

Head: dr J. Bieniasz

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a hereditary disease caused by the genetically determined error of sphingolipids metabolism. The metabolic deviation in MLD appears to be a deficient activity of a cerebroside sulphuric acid esterase (Austin et al., 1963; 1965, Mehl, Jatzkewitz, 1965). At least three different enzymes have been demonstrated in human tissue which catalyze the hydrolysis of sulphuric acid esters. They have been designated as arylsulphatase A, B and C. Austin et al. (1963) have demonstrated a decrease in arylsulphatase A activity in brain and other tissues obtained from patient with MLD. The most prominent feature of the disease is accumulation of sulphatides (sulphuric cerebroside esters) in brain and in some internal organs (Austin, 1958; Jatzkewitz, 1958). The most affected is the white matter of the nervous system, where sulphatides accumulation is associated with severe myelin loss. It is now widely accepted that these sulphati-

---

\* The biochemical part of this work was financially supported by NIH PL Agreement No. 05-027-1.



des are responsible for the brown metachromatic staining, the most characteristic feature of the pathological process.

The disease may manifest at any age from infancy to adult life depending on the gravity (Austin et al., 1968; Porter et al., 1971; Stumpf, Austin, 1971) and quality (Suzuki et al., 1974) of the enzyme deficiency. The late infantile form accounts for approximately two-thirds of all cases.

The MLD case which will be presented here represents the late infantile form of the disease, with an atypical and protracted clinical course.

#### CASE REPORT

The female patient aged 25 years (case history no. 1621/70) was admitted to the Neurological Department of the District Hospital for Nervous and Psychiatric Diseases in Lublin in epileptic state. She was born naturally from the first pregnancy without complications. In childhood she had whooping cough. The parents were healthy and unrelated. Her sister is 23 and her brother 21, both are healthy. From early childhood the patient developed worse than other even-aged children. Nevertheless she was sent to school at the age of 7 years, but from the first class she could not manage to learn. She passed through 5 classes repeating the first and the third class. At the age of 14 she had a serious road accident, in which she lost consciousness and suffered fractures of pelvis bones. After dismissal from hospital she developed difficulty in walking and the first epileptic seizures appeared. Gradually the disturbances in walking increased, disorders in speech and symptoms of mental deterioration appeared. One year before death she stopped speaking and walking and became incontinent. Epileptic seizures of grand mal or of focal type occurred more and more frequently.

Neurological examination revealed: patient bedridden, does not obey any orders. She reacts to stronger external stimuli by choreo-athetotic movements of the upper extremities. Lower extremities slightly bent in the hip joint and knees, feet in equinovarus position. A considerably raised muscle tonus of plastic type was stated in all groups of muscle of the upper and lower extremities. Tendon and periosteal reflexes of upper extremities somewhat enhanced. In lower extremities tendon and plantar reflexes lacking. No pyramidal symptoms were observed. Cerebrospinal fluid examination showed increased protein level (66 mg%) in the absence in any rise of the cell counts. The patient died after 3 weeks of hospitalization of circulatory insufficiency in the course of pneumonia.

*Neuropathological study*

On naked eye examination there was severe generalized atrophy of cerebral hemispheres. The unfixed brain weighted 800 g. On frontal section the cerebral white matter had a greyish tinge and increased consistence. Corpus callosum was very thin, white matter narrow and the ventricles dilated. Brain stem and cerebellum beside demyelination showed also marked atrophy.

For microscopic examination slices from the whole cerebral hemispheres and slices from the brain stem and cerebellum were taken. The material was embedded in paraffin and stained with hematoxylin-eosin, cresyl violet and according to van Gieson, Heidenhain, Weil, Bielschowsky and Kanzler-Arendt methods. Frozen sections were stained with Sudan III and IV, with sudan black B, PAS and acid cresyl violet.

Microscopical study revealed diffuse demyelination in the white matter of cerebral hemispheres, brain stem and cerebellum. The demyelination varied in degree being most intense in cerebral hemispheres. The centrum semiovale and the central part of the gyri were entirely devoid of myelin, whereas the subcortical fibres, inner capsule, ansa lenticularis, strio-pallidal fibres and optic tracts were better preser-



*Fig. 1.* Diffuse demyelination of the white matter in cerebral hemisphere, partially involving also subcortical U-fibres. Weil staining.

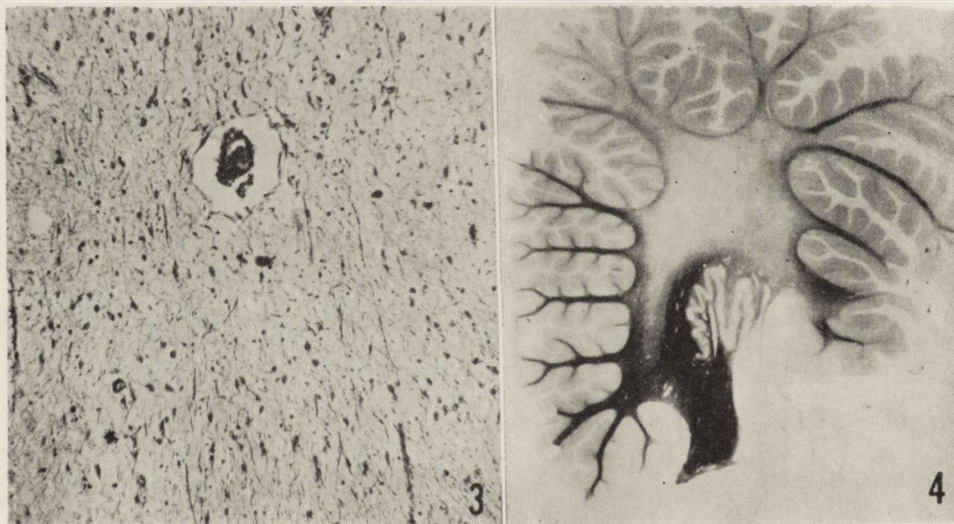
*Ryc. 1.* Rozlana demielinizacja istoty białej półkuli mózgu częściowo obejmująca również obszar U-włókien. Met. Weila.

*Fig. 2.* Profuse fibrogliosis in demyelination area in cerebral hemisphere. Kanzler-Arendt staining.

*Ryc. 2.* Nasiloną glejoza włóknista w obszarze demielinizacji w półkuli mózgu. Met. Kanzler-Arendta.



ved or looked entirely normal (Fig. 1). Even in the most damaged areas single myelin fibres were visible. These exhibited features of degeneration in the form of swelling, fragmentation and the presence of myelin balls. The demyelination was accompanied by profuse fibroglia (Fig. 2) whereas in cellular stainings distinct decrease in the number of astrocytes and almost complete lack of oligodendroglia was observed. The remaining astroglial cells showed features of hypertrophy, they never however, took the form of gemistocytic astroglia. Their cytoplasm was scanty with numerous processes, the nuclei were small, dark and usually excentrically located. Inflammatory reaction was represented only by scanty lymphocyte infiltrations discovered around some blood vessels. Sudanophilic myelin breakdown products were few. In silver impregnation the axon cylinders were greatly reduced (Fig. 3). Moreover a loosening of the tissue was visible, which in the neighbourhood of blood vessels had the character of a typical spongy state. Changes in the cerebellar white matter (Fig. 4) were similar to those seen in the cerebral hemispheres, although in general they were less advanced than in the centrum semiovale. In the brain



*Fig. 3.* Severe axon cylinders loss with spongy tissue loosening in the area of myelin damage in the centrum semiovale. Bielschowsky silver impregnation  $\times 100$ .

*Ryc. 3.* Wybitne uszkodzenie aksonów z gąbczastym rozrzedzeniem struktury tkanki w polu uszkodzenia mieliny w centrum semiovale. Impregnacja met. Bielschowsky'ego. Pow. 100  $\times$ .

*Fig. 4.* Demyelination in the cerebellar white matter. Myelin sheaths in the medial part of cerebellar hemisphere better preserved. Weil staining. Magn. glass

*Ryc. 4.* Demielinizacja w istocie białej mózdzku. Lepiej utrzymane osłonki w przyśrodkowej części półkuli. Met. Weila. Pow. lup.

stem and in medulla the damage to myelin sheaths appeared as diffuse myelin pallor particularly pronounced within the pyramidal tracts. Nearly all staining methods visualized in the white matter of the cerebral hemispheres, brain stem and cerebellum large deposits of a substance either distributed loosely in the tissue or localized in macrophages and astroglia. These granular or homogenous deposits were strongly PAS and Sudan black positive. When acid cresyl violet was used, they stained metachromatically brown (Fig. 5). The greatest

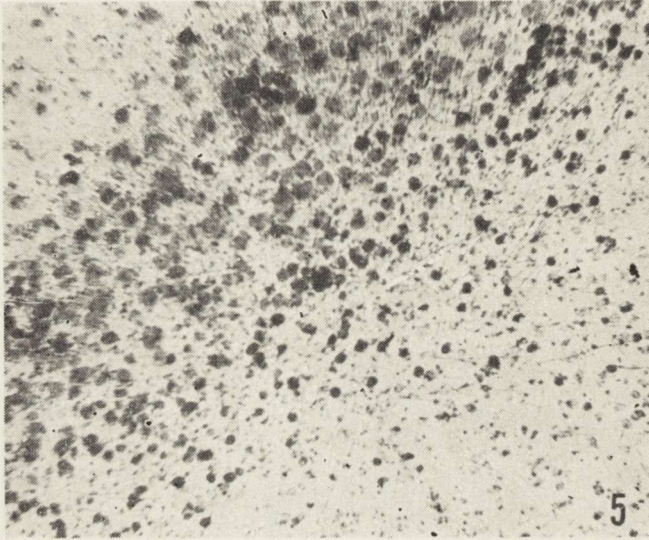


Fig. 5. Metachromatic deposits at the border of demyelination in the subcortical area. Acid cresyl violet.  $\times 100$ .

Ryc. 5. Złogi metachromatyczne na pograniczu obszaru uszkodzenia mieliny w okolicy podkorowej. Barw. kwaśnym fioletem krezyłu. Pow.  $100 \times$ .

quantities of the metachromatic material was found in the subcortical area and cerebellar white matter i.e. in places where demyelination was incomplete. A small amount of metachromatic deposits was detected in sites, where myelin was not obviously damaged.

In the cerebral cortex diffuse neuronal loss with almost complete absence of large pyramidal cells was discovered. Many Purkinje cells had disappeared. The same was true for dentate nuclei and nuclei of the oliva. Very small amount of pigment was found in the substantia nigra.

In kidney sections stained with acid cresyl violet the epithelial cells of convoluted and collecting tubules contained abundant metachromatic granules.



*Biochemical investigation*

Material fixed in formalin was used. Lipids were extracted from the white and grey matter of the brain by the method of Folch-Pi et al. (1957). The extract was separated into particular lipid classes by column and thin-layer chromatography after Svennerholm (1964). The fractionated phospholipids and the cerebroside fraction were determined according to Bartlett (1959) and Rodin (1955). For cholesterol determination the specific reaction for 3-hydroxysterols was applied according to Sperry and Webb (1959). The most polar glycolipids — gangliosides were chromatographically separated and determined quantitatively after Suzuki (1964). The particular lipid fractions were identified on the basis of chromatograms of standard substances and by means of colour reactions with ninhydrin, Dragendorff's reagent and perchloromolybdenic acid. As control material served brain tissue of a man who died aged 25 years without symptoms of neurological disease.

Results. Table 1 presents the percent distribution of gangliosides in the cerebral grey and white matter. The results for the patient showed no deviations when compared with the control.

Table 2 gives the results of the lipids analysis from the white matter and substantia nigra of the brain. The brain investigated showed as compared with control one changes in the grey and white matter involving sphingomyelin, phosphatidylserine, phosphatidylethanolamine, cholesterol and cerebroside. The content of the above mentioned lipids, particularly of cerebroside was markedly lowered as compared with normal. At the same time an important increase in the sulphatide content was noted.

## DISCUSSION

MLD is classified in 4 types, according to the age at which clinical disturbances appear: congenital, late infantile, in which the first symptoms appear around the age of 2 years, juvenile with the beginning at the age of 13—20 years and adult form occurring after the 20th years of life (Hirose, Bass, 1972). In the late infantile form the first manifestation of the disease are disturbances in motor function, particularly in gait and speech, than mental deterioration is observed. The duration of the disease in typical cases is 3—5 years. In the adult form mental abnormalities and personality changes predominate and its course is often protracted. The clinical course of the juvenile cases may be essentially identical to that as for late infantile MLD or visual and

Table 1. Distribution of gangliosides (in % of NANA) in the cerebral white and grey matter in metachromatic leukodystrophy (formolin-fixed material)

Tabela 1. Rozdział gangliozydów (w % NANA) w istocie białej i szarej mózgu w przypadku leukodystrofii metachromatycznej (materiał formolowy)

Ganglioside fraction Frakcja gangliozydu	Control Kontrola		Metachromatic leukodystrophy Leukodystrofia metachromatyczna							
	Frontal Pl. czołowy		Parietal Pl. ciemien.		Temporal Pl. skroniowy		Frontal Pl. czołowy		Occipital Pl. potyliczny	
	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara
G <sub>0</sub>	2.01	1.80	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
G <sub>1</sub> (GT <sub>1</sub> )	8.05	11.10	15.65	13.51	14.90	10.47	12.61	15.11	12.56	19.27
G <sub>2</sub> (GD <sub>1</sub> b)	35.57	32.28	28.02	28.16	33.89	35.47	35.75	33.42	35.46	26.79
G <sub>3</sub> (GD <sub>1</sub> a)	33.56	34.32	37.65	34.79	32.93	35.26	32.49	33.98	31.89	33.36
G <sub>4</sub> (GM <sub>1</sub> )	18.12	16.18	13.10	14.10	13.21	13.97	12.61	12.46	13.06	15.03
G <sub>5</sub> (GM <sub>2</sub> )	2.69	4.32	5.58	9.44	5.08	4.83	6.54	5.03	7.03	5.55
G <sub>6</sub> (GM <sub>3</sub> )	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10	< 0.10
Total ganglioside content g/100 g tissue dry weight	2.75	3.62	2.63	3.01	2.19	3.47	2.29	3.09	2.52	3.12
Całkowita zawartość gangliozydów w g/100 g suchej tkanki										



Table 2. Distribution of lipids in the cerebral white and grey matter in metachromatic leukodystrophy in g/100 g tissue dry weight

Tabela 2. Rozkład lipidów istoty białej i szarej mózgu w przypadku leukodystrofii metachromatycznej w g/100 g suchej tkanki

Lipids Lipidy	Control Kontrola		Metachromatic Leukodystrophy Leukodystrofia metachromatyczna							
	Frontal Pł. czołowy		Parietal Pł. ciemieniowy		Temporal Pł. skroniowy		Frontal Pł. czołowy		Occipital Pł. potyliczny	
	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara	white i. biała	grey szara
Phosphatidylserine + phosphoinositol Fosfatydyloseryna + fosfoinositol	2.50	1.67	1.16	0.83	0.91	0.77	1.67	0.79	1.81	0.67
Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolocamina	3.32	2.00	2.33	1.11	2.16	1.68	2.12	1.12	2.19	1.15
Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina	2.50	1.50	2.77	1.28	2.64	1.40	2.45	1.19	2.63	1.79
Sphingomyelins Sfingomieliny	3.25	2.60	2.80	1.15	2.86	1.43	2.50	1.10	2.60	1.75
Cerebrosides Cerebrozydy	6.51	3.68	3.02	1.19	2.11	1.42	2.08	1.48	2.50	1.37
Sulphatides Sulfatydy	2.30	1.01	5.68	3.85	5.71	3.33	5.75	3.16	5.62	2.98
Cholesterol	9.47	6.10	4.73	3.01	4.04	2.90	3.87	2.68	3.07	2.66

mental symptoms are recognized before motor symptoms appear (Moser, 1972). The occurrence of the late infantile and juvenile cases in the same family indicate that they are rather two variants of the one entity than two distinct patterns of the disease (Austin et al., 1963).

The case presented here should, from the clinical point of view, be classified to the late infantile group of the MLD since retarded mental development was observed in the patient from the early childhood. The duration of the disease was, however, exceptionally long and clinical course quite atypical for this group. From among the cases known to us in the available literature recently Paolozzi et al. (1976) described two sisters with late infantile MLD, who died in the age of 15 and 22 years. Nyberg (1972) presented two brothers with the late infantile MLD, who were still alive when his paper appeared, and the duration of the disease was also very long (16 and 23 years). Arylsulphatase A determination in both cases revealed a decrease of enzyme activity as compared with normal by 10 and 20 percent in the leukocytes and 42 and 54 percent in urine. Nyberg believes that the exceptionally slow course of the disease, in spite of its early onset (2 years) was due to the decrease of arylsulphatase A activity but not to its absence, as found in MLD cases in infants (Austin et al., 1968; Moser, 1972). Two component of arylsulphatase, A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub>, were shown by Suzuki and Mizuno (1974). both were deficient in the late infantile MLD, while only A<sub>1</sub> was missing in the juvenile form.

An interesting hypothesis has been advanced by Hirose and Bass (1972) concerning the possibility of compensation of arylsulphatase A deficiency. The authors consider that the occurrence of MLD symptoms at a later age could be connected with the involvement of nonspecific sulphatase in degradation of sulphatide compounds. Stumpf and Austin (1971) suggest, that the differences in the duration of the disease and clinical symptomatology in MLD cases may be connected with certain deviations in the configuration of arylsulphatase A protein molecules.

Pathomechanism of white matter damage in MLD is not fully known as yet. Sulphatides play an important role in the stabilization of cell membranes and myelin sheaths. The increase in their content with simultaneous fall of the cerebroside level and other deviations in the sphingolipids spectrum would seem to be the cause eliciting changes in the cell membranes of the oligodendroglia and Schwann cells as well as in the membranes of various cell organelles (Peiffer, 1970). According to O'Brien (1965) the accumulation of electrically negative sulphate groups on the surface of bimolecular lipids is the underlying cause of decomposition of the myelin sheaths in MLD.



In the metabolism of myelin sheaths, maintaining them in normal state, an important role is also played by fatty acids with long hydrocarbon chains. These fatty acids are present in neutral galactolipids. Their deficiency is observed in MLD (O'Brien, 1965) Austin et al. (1965) attribute the decrease in the content of fatty acids with long chains in MLD to damage of the mitochondria. An argument in favour of impairment of the mitochondrial system is the absence of cholesterol esters. Cholesterol esterification occurs, namely, in the mitochondria. The electron microscopic data are rather suggestive of structural normalcy of the myelin sheaths and a progressive impairment of sheath cell's metabolism by the intracellular accumulation of sulphatides.

D. Markiewicz, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, I. Zelman, J. Dymecki, J. Bieniasz

#### PRZYPADK LEUKODYSTROFII METACHROMATYCZNEJ O PRZEWLEKŁYM PRZEBIEGU

##### Streszczenie

Autorzy przedstawili przypadek przewlekłej postaci leukodystrofii metachromatycznej, której pierwsze objawy kliniczne wystąpiły w dzieciństwie. Na 4 lata przed zgonem pojawiło się postępujące otępienie, zaburzenia chodu oraz napady padaczkowe typu grand mal i jacksonowskie. Pacjentka zmarła w wieku 25 lat z powodu zapalenia płuc.

Neuropatologicznie wykazano w istocie białej rozlaną demielinizację z uszkodzeniem włókien osiowych, zanik oligogleju i astrogleju, rozplem gleju włóknistego oraz obecność złogów barwiących się metachromatycznie kwaśnym fioletem krezyłu.

Badania neurochemiczne wykazały gromadzenie się w mózgu sulfatydów przy jednoczesnym spadku zawartości zarówno w istocie białej, jak i w korze sfingomieliny, fosfatydyloseryny, fosfatydyloetanoloaminy, cholesterolu i cerebrozydów.

Д. Маркевич, З. Адамчевска-Гонцежевич, И. Зельман, Е. Дымецки, Е. Беньяш

#### СЛУЧАЙ ХРОНИЧЕСКОЙ МЕТАХРОМАТИЧЕСКОЙ ЛЕЙКОДИСТРОФИИ

##### Резюме

Авторы представили случай хронической формы метакроматической лейкодистрофии, первые клинические симптомы которой появились в детстве. За 4 года перед смертью появилось прогрессирующее отупение, нарушения ходьбы и эпилептические припадки типа grand mal и джексоновские. Пациентка умерла в возрасте 25 лет по причине воспаления легких.

Нейропатологически выявлена в белом веществе разлитая демиелинизация с повреждением осевых волокон, атрофия олигоглии и астроглии, пролифера-

ция волокнистой глии и присутствие отложений метахроматически красящихся кислым крезиллом фиолетовым.

Нейрохимические исследования выявили накопление в мозгу сульфатидов при одновременном спаде как в белом веществе, так и в коре сфингомиелина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина, холестерина и цереброзидов.

## REFERENCES

1. Austin J. H.: Observations in metachromatic leucoencephalopathy. *Trans. Amer. neurol. Ass.*, 1958, 83, 149—152.
2. Austin J. H.: Metachromatic leucodystrophy (sulfatide lipidosis, metachromatic leucoencephalopathy). In: *Mental retardation*. Ed. C. H. Carter, Thomas, Springfield Ill., 1965, 768—812.
3. Austin J. H., Balasubramanian A. S., Pattabirman T. N., Sarawathi S., Basu D. K., Bachavat B. K.: A controlled study of enzymic activities in three human disorders of glycolipid metabolism. *J. Neurochem.* 1963, 10, 805—816.
4. Austin J. H., Armstrong D., Fouch S., Mitchell B. S., Stumpf D., Shearer L., Briner O.: Metachromatic leukodystrophy (MLD). VII. MLD in adults; diagnosis and pathogenesis. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1968, 18, 225—240.
5. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. biol. Chem.* 1957, 226, 497—511.
6. Hirose G., Bass N. H.: Adult and late infantile metachromatic leucodystrophy: a comparative biochemical study. *Neurology (Minneap.)* 1972, 22, 312—320.
7. Mehl E., Jatzkewitz H.: Cerebroside 3-sulfate as a physiological substrate of arylsulfatase A. *Biochem. biophys. Acta* 1968, 151, 619—621.
8. Moser H. W.: Sulfatide lipidosis: metachromatic leukodystrophy. W: The metabolic basis of inherited disease. Eds.: J. B. Wyngaarden, D. S. Fredricson. *Mc Graw Hill Book Comp. New York*, 1972, 688—729.
9. Nyberg H. R.: Metachromatic leucodystrophy. Two unusual cases of the late infantile form. *Neurol.* 1972, 203, 145—154.
10. O'Brien J. S.: Stability of the myelin membrane. *Science* 1965, 147, 1099—1107.
11. Paolozzi C., Federico A., Guazzi G.: Grafoelementi rapidi fusali ubiquitari non farmacologici nel tracciato elettroencefalografico di due sorelle con sulfatidosi di tipo A ed atrofia sistematica ponto cerebellare. *Ita Riv. Neurol.* 1976, 46, 194—209.
12. Peiffer J.: Metachromatic leucodystrophy. In: *Handbook of clinical neurology*. Eds.: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. *North-Holland Publ. Company, Amsterdam* 1970, V. 10, 43—66.
13. Porter M. T., Fluharty A. L., Trammel J., Kihara H.: A correlation of intracellular cerebroside sulfatase activity in fibroblasts with latency in metachromatic leukodystrophy. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 1971, 44, 660—666.
14. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determination of cerebroside. *J. biol. Chem.* 1955, 217, 789—796.
15. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. biol. Chem.* 1959, 187, 97—106.



16. Suzuki K.: A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside pattern. *Life Sci.* 1964, 3, 1227—1233.
17. Stumpf D., Austin J. H.: Metachromatic leukodystrophy (MLD). IX. Qualitative and quantitative differences in urinary arylsulfatase A in different forms of MLD. *Arch. Neurol. (Chic.)* 1971, 24, 117—124.
18. Suzuki K., Suzuki K., Mizuno Y.: Juvenile metachromatic leukodystrophy. Deficiency of an arylsulfatase A component. *J. Pediat.* 1974, 85, 823—825.

Author's address: Department of Neuropathology, Psychoneurological Institute, 1/9 Sobieskiego Str., Warsaw.

EUGENIA TARNOWSKA-DZIDUSZKO

PROCES INWOLUCYJNY KORY AMONALNEJ  
I UGRUPOWAŃ JĄDRA MIGDAŁOWEGO  
W PRZEWLEKŁYM ALKOHOLIZMIE \*

Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego  
Kierownik: prof. dr med. J. Dymecki

W klinicznym przebiegu przewlekłego alkoholizmu pojawiają się stopniowo objawy zespołu psychoorganicznego, w którym dominuje osłabienie zdolności zapamiętywania i chwiejność afektywna. Z przeglądu piśmiennictwa wiadomo, że szczególne znaczenie dla prawidłowej funkcji pamięci i orientacji ma układ limbiczny, a zwłaszcza ugrupowania jądra migdałowego i kora amonalna (Uhle 1951, 1954, Gleses, Griffith 1952, Meyer, Yates 1955, Penfield, Milner 1958, Grünthal 1959, Störning i wsp. 1962 i inni). Z prac Simchowicza (1913), Gellerstedta (1933), Braunmühla (1956), klasyków patologii starzenia się oun, wynika, że zmiany inwolucyjne podeszłego wieku rozwijają się predylekcyjnie w tych strukturach, ich nasilenie jest w tych obszarach największe i często zajęcie jądra migdałowego i kory amonalnej wyprzedza zajęcie innych okolic mózgu (Jamada, Mehraein 1968).

Interesującym wydawało się zagadnienie czy przewlekłe nadużywanie alkoholu przyspiesza lub nasila zmiany inwolucyjne w strukturach predylekcyjnie dotkniętych starzeniem. Dla uzyskania odpowiedzi na to pytanie przeprowadzono szczegółową analizę morfologiczną kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowego w przypadkach przewlekłego alkoholizmu.

MATERIAŁ I METODA

Materiał pochodzi ze zbiorów Zakładu Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego i obejmuje 47 przypadków sekcyjnych chorych nadużywających przewlekłe alkoholu, zmarłych w różnych szpitalach

---

\* Praca finansowana w ramach Funduszu Celowego dla Badań nad Alkoholizmem.



psychiatrycznych. Z badań wyłączono przypadki, w których w badaniu mikroskopowym wykazano dodatkowo obecność nowotworu. Do badania histopatologicznego pobrano wycinki obejmujące korę zwoju hipokampa z rogiem Amona oraz ugrupowania jądra migdałowatego. Pobrane wycinki zatapiało w parafinie. Skrawki barwiono fioletem kryzylu, hematoksyliną-eozyną, wg metody van Gieson, Spielmeyera, Bielschowsky'ego oraz Kanzler-Arendta.

#### WYNIKI

W grupie 47 wyselekcjonowanych do badania przypadków było 42 mężczyzn i 5 kobiet, zmarłych w wieku 28—76 lat. Przypadki te podzielono na 2 grupy.

Grupa I obejmowała 20 chorych w wieku 28—49 lat; średnia wieku wynosiła 39 lat. U 15 chorych anamnestycznie ustalono okres nadużywania alkoholu, który wahał się od 3 do 29 lat (średnio 15 lat). U 5 chorych nie można było ustalić okresu nadużywania alkoholu; w wywiadzie powtarzało się określenie „zawsze”, bądź „długo”. W przebiegu nałogu u 16 chorych występowało ostre majaczenie alkoholowe, w tym u 6 chorych 2 razy, a u jednego — 4 razy; na przewlekłą halucynozę alkoholową cierpiały 2 osoby. U jednego chorego występowały okresowo lęki oraz znaczne obniżenie nastroju. Badaniem psychiatrycznym u wszystkich pacjentów stwierdzono mniej lub bardziej nasilony zespół psychoorganiczny, u 18 osób w połączeniu z charakteropatią alkoholową, a u 3 chorych z ciężkim otępieniem. W stanie neurologicznym dominowały rozsiane objawy uszkodzenia oun (10 przypadków), tylko u 1 chorego stwierdzono alkoholowe uszkodzenie nerwów obwodowych. Napady padaczkowe typu grand mal występowały u 3 chorych. Przyczyną zgonu w 16 przypadkach było ostre majaczenie alkoholowe, w 7 przypadkach powikłane zapaleniem płuc. W 3 przypadkach stwierdzono krwotok podtwardówkowy, w 1 przypadku — krwotok do mózdzku.

Badaniem sekcyjnym w 13 przypadkach stwierdzono marskość wątroby ze stłuszczeniem, w 8 przypadkach uszkodzenie mięszu nerek, w 14 przypadkach zmiany zwyrodnieniowe mięśnia sercowego oraz w 7 przypadkach owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy. Badanie makroskopowe mózgu wykazało w 10 przypadkach uogólniony zanik, w 10 przypadkach obrzęk mózgu. Miażdżycę naczyń podstawy stwierdzono tylko w 1 przypadku.

Grupa II obejmowała 27 chorych w wieku 50—76 lat; średnia wieku wynosiła 63 lata. U 9 chorych nadużywanie alkoholu trwało od 16 do 50 lat (średnio 32 lata). U pozostałych chorych nadużywanie alkoholu trwało również kilkadziesiąt lat. Ilość jednorazowo spożywane-

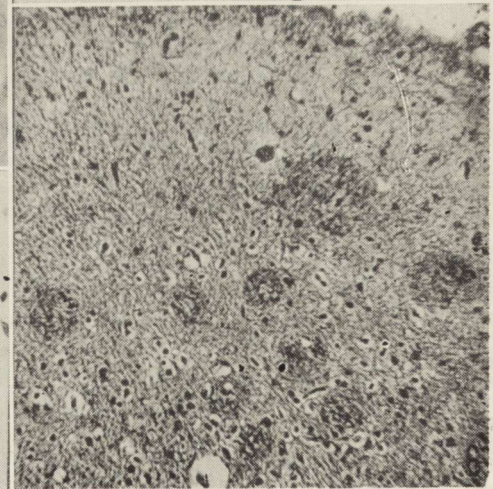
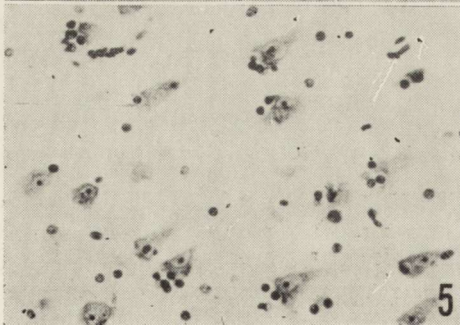
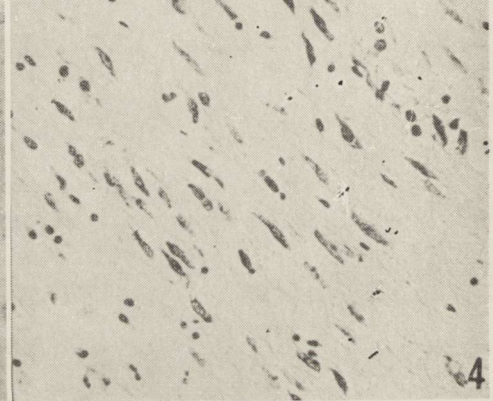
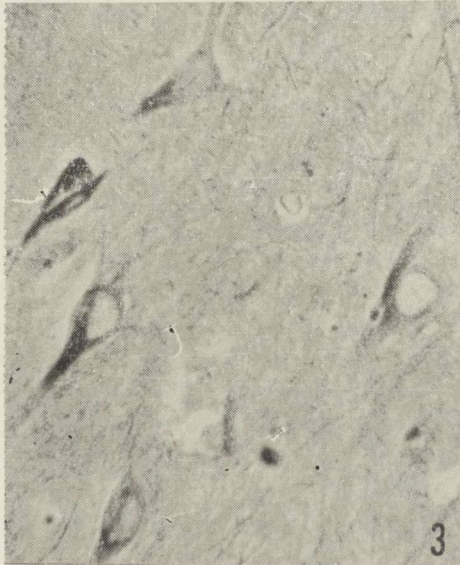
go alkoholu jak i częstość jego nadużywania była, podobnie jak w grupie I, niemożliwa do ustalenia. W przebiegu nałogu u 10 chorych występowało ostre majaczenie alkoholowe, przy czym u 4 chorych dwa razy, a u jednego — 6 razy. Przewlekłą psychozę alkoholową miało 4 chorych. Chorobę Wernickego stwierdzono w 1 przypadku, podobnie zespół Korsakowa. Zespół urojeniowy występował u 4 chorych, lęki i halucynacje słuchowe pojawiały się okresowo u 2 chorych. W 25 przypadkach stwierdzono zespół psychoorganiczny, u 17 chorych ze znacznym otępieniem. W 3 przypadkach naśladował on psychozę przedstarczą, a w jednym — starczą. U 11 chorych stwierdzono charakteropatię alkoholową. W stanie neurologicznym w 14 przypadkach dominowały rozsiane objawy uszkodzenia oun, u 2 chorych stwierdzono uszkodzenie nerwów obwodowych. U 3 osób występowały napady padaczkowe typu grand mal. Chorzy tej grupy przebywali wielokrotnie w szpitalach psychiatrycznych. U 10 osób hospitalizacja trwała wiele (do 6) lat. Przyczyną zgonu u 7 chorych było ostre majaczenie alkoholowe, 4 osoby zmarły w przebiegu klinicznie nie rozpoznanego krwotoku podtwardówkowego, 2 chorych w przebiegu rozmiękania półkul mózgowych bądź spoidła wielkiego. Zapalenie płuc spowodowało zejście śmiertelne 6 chorych. Ostre zatrucie alkoholem lub skaza krwotoczna w przebiegu marskości wątroby była przyczyną zgonu w pojedynczych przypadkach. U 3 chorych wystąpiła ostra niewydolność krążenia, której przyczyny nie ustalono badaniem anatomo-patologicznym. Badaniem sekcyjnym w 21 przypadkach stwierdzono marskość wątroby ze stłuszczeniem, w 7 przypadkach zwyrodnienie mięśnia sercowego, w 13 przypadkach uszkodzenie miąższu nerek, w 10 przypadkach owrzodzenie żołądka i/lub dwunastnicy. Badanie makroskopowe mózgu wykazało w 21 przypadkach zanik, w tym w 18 przypadkach uogólniony, w 9 przypadkach obrzęk mózgu. Zmiany miażdżycowe w naczyniach podstawy mózgu stwierdzono w 14 przypadkach.

#### WYNIK BADANIA MIKROSKOPOWEGO

##### *Grupa I*

W korze amonalnej na czoło procesu patologicznego wysuwają się ubytki komórek nerwowych. W 16 przypadkach występują one pod postacią rozsianych wysepkowatych opustoszeń komórkowych (ryc. 1) a w 2 przypadkach są tak znaczne, że prowadzą do zupełnego zatarcia budowy warstwowej kory. W zachowanych komórkach nerwowych przeważa stłuszczenie. W przeważającej liczbie przypadków (16) komórki obciążone lipofuscyną są bardzo liczne (przy powiększeniu 400× wię-







cej niż 1/3 neurocytów w polu widzenia jest zmieniona). Masy lipofuscyny rozpychają i zniekształcają komórkę nerwową (ryc. 2), uciskają i spychają na obwód ścięzające włókienka nerwowe. W 12 przypadkach w licznych komórkach w obrazie Bielschowsky'ego włókienka nerwowe są pogrubiałe i wrzecionowato rozdęte (ryc. 3) i przypominają zwyrodnienie włókienkowe Alzheimerera. We wszystkich przypadkach w sposób rozsiany występują komórki ze schorzeniem przewlekłym bądź ischemicznym, rzadziej (4 przypadki) ze schorzeniem ciężkim oraz cienie komórkowe. Dostyc często (w 10 przyp.) spotykano wydłużone, „nitkowate”, ciemno barwiące się komórki nerwowe. Struktura cytoplazmy i jądra tych komórek jest zupełnie niewidoczna (ryc. 4). Opisane komórki, występujące w miejscu wklonowania zakrętu hipokampa, obserwowano we wszystkich przypadkach, w których już makroskopowo spostrzegano obrzęk mózgu. Zmianom komórkowym w korze amonalnej towarzyszył dość żywy rozplem gleju. Wzmoczoną satelitozę, neuronofagię i grudki glejowe (ryc. 5) obserwowano w 13 przypadkach.

Wyrazem zaniku obserwowanego makroskopowo były kłębki naczyniowe, które stwierdzono w 15 przypadkach. Płytki starcze, najczęściej amorficzne (ryc. 6), pojedyncze lub w skupieniach po 4—5 obserwowano co kilka pól widzenia w 6 przypadkach.

W ugrupowaniach jądra migdałowatego (*amygdaleum superficiale, amygdaleum profundum mediale, intermedium et laterale*) w 10 przypadkach stwierdzono ogniska zbłądnieć z niewielkimi, wysepkowatymi opustoszeniami komórkowymi. Ubytki komórkowe wydawały się bar-

Ryc. 1. Wysepkowate opustoszenia komórek nerwowych w korze amonalnej. H.E. Pow. 60 ×.

Fig. 1. Insular neuronal loss in Ammonal cortex. H.E. × 60

Ryc. 2. Stłuszczenie komórek nerwowych. Bielschowsky. Pow. 200 ×.

Fig. 2. Fatty degeneration of nerve cells. Bielschowsky. × 200

Ryc. 3. Pogrubienie i wrzecionowate zniekształcenie włókienek nerwowych w jądrze migdałowatym. Bielschowsky. Pow. 400 ×

Fig. 3. Distention and fusiform deformation of neurofibrils in amygdaloid complex. Bielschowsky. × 400

Ryc. 4. Nitkowate, nadbarwliwe komórki nerwowe w zakręcie hipokampa. Fiolet krezyłu. Pow. 100 ×

Fig. 4. Elongated, hyperchromatic neurons in hippocampal gyrus. Cresyl violet. × 100

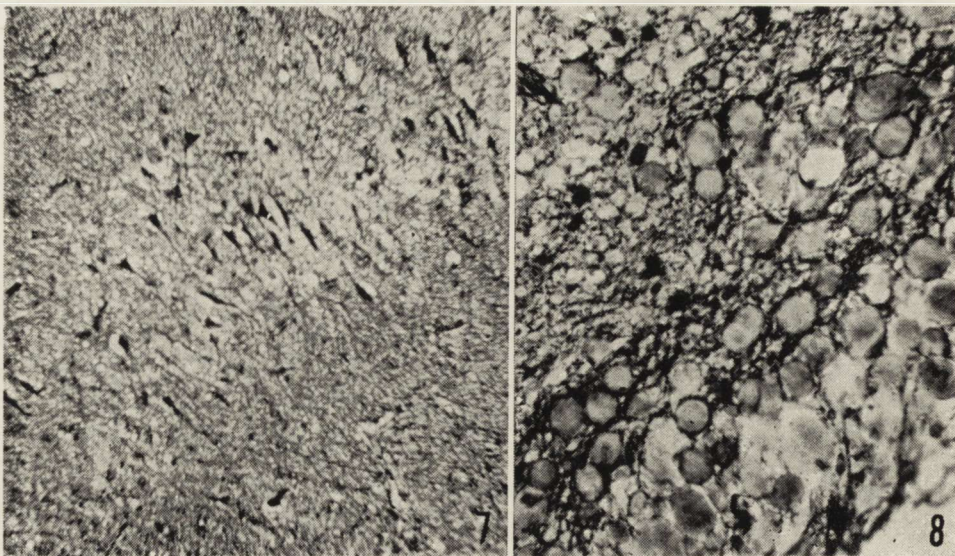
Ryc. 5. Wzmoczona satelitoza, neuronofagia i grudki glejowe w korze amonalnej. Fiolet krezyłu. Pow. 200 ×

Fig. 5. Increased satellitosis, neuronophagia and glial nodules in Ammonal cortex. × 200

Ryc. 6. Płytki starcze w korze amonalnej. Bielschowsky. Pow. 200 ×

Fig. 6. Senile plaques in Ammonal cortex. Bielschowsky. × 200





Ryc. 7. Zgąbczenie i zatarcie warstw kory amonalnej. Bielschowsky. Pow. 60 ×  
 Fig. 7. Spongiosis and blurred outlook of Ammonal cortex layers. Bielschowsky. × 60

Ryc. 8. Ciała amyloidowe pod wyściółką kory amonalnej. Bielschowsky. Pow. 400 ×

Fig. 8. Amyloid bodies beneath the ependyma of Ammonal cortex. Bielschowsky. × 400

dziej nasilone w ugrupowaniu jądrowym głębokim środkowym. W strukturach jądra migdałowego, podobnie jak w korze amonalnej dominuje stłuszczenie komórek nerwowych. W 14 przypadkach przy powiększeniu 400 × prawie wszystkie komórki w polu widzenia są objęte zwyrodnieniem tłuszczowym. Deformację włókienek nerwowych obserwowano w 8 przypadkach, a płytki starcze w nieco większym zagęszczeniu w 6 przypadkach. Rzadziej niż w korze amonalnej obserwowano grudki glejowe. Nie znaleziono różnic w nasileniu zmian komórkowych i zmian starczych pomiędzy poszczególnymi ugrupowaniami jądrowymi.

### Grupa II

W korze amonalnej ubytki komórek nerwowych doprowadzają w 1/3 przypadków do zupełnego zatarcia budowy warstwowej kory, bądź zgąbczenia (ryc. 7). We wszystkich pozostałych przypadkach stwierdzono liczne wysepkowate opustoszenia komórkowe. W połowie przypadków przy pow. 400 × więcej niż 2/3 liczby komórek jest obciążonych lipofuscyną. Obrazy schorzenia ciężkiego i cienie komórkowe obser-



wowano w 7 przypadkach, liczne komórki wykazywały schorzenie przewlekłe. Deformację włókienek nerwowych stwierdzono w 17 przypadkach, a wyraźne typowe zwyrodnienie włókienek nerwowych Alzheimera w 4 przypadkach. Płytki starcze ziarniste i amorficzne spostrzegano w 10 przypadkach. Rozplem gleju był niewielki, tylko w 6 przypadkach występowały grudki glejowe. Kłębki naczyniowe stwierdzono we wszystkich przypadkach.

W ugrupowaniach jądra migdałowego opustoszenia komórkowe występowały we wszystkich obszarach, w nieco większym nasileniu w jądrze migdałowatym głębokim środkowym i pośrodkowym, w których w 3 przypadkach tworzyły plackowate wyłysienia. Stłuszczenie i zmiany przewlekłe komórek nerwowych są również wybitne w tych strukturach. Płytki starcze, zniekształcenie włókienek nerwowych oraz kłębki nerwowe występują równie często jak w korze amonalnej. Tylko w 2 przypadkach obserwowano grudki glejowe. W 1/3 liczby przypadków stwierdzono neuronofagię.

W przypadkach obu grup występowały w zmiennym nasileniu ciała amyloidowe (ryc. 8), ponadto wzmożona glejoza podwyściółkowa, podoponowa i okołonaczyniowa. W istocie białej rogu Amona obserwowano rozluźnienie i zgąbczenie struktury, głównie wokół naczyń.

#### OMÓWIENIE

Przeprowadzone badanie mikroskopowe mózgów grupy I, „młodszej wiekiem” (średnia wieku 39 lat) wykazało w większości przypadków znaczne nasilenie procesu zanikowego w badanych strukturach. Morfologicznym wykładnikiem zaniku była obecność kłębków naczyniowych (Tarnowska-Dziduszko 1970). Rozsiane wysepkowate ubytki komórek nerwowych i znaczne nasilenie stłuszczenia neuronów przewyższało podobne zmiany, obserwowane w tych przedziałach wieku (Braunmühl 1956, Corsellis 1962, McMenemey 1963 i inni). Wprawdzie ugrupowania jądra migdałowego należą wg Obersteinerja (1904) do struktur lipofilnych, ale nasilenie zmian w badanej grupie chorych odpowiada zwyrodnieniu tłuszczowemu tych struktur w podeszłym wieku (Simchowicz 1913, Grünthal 1936 i inni).

Zniekształcenie włókienek nerwowych, obserwowane wśród skupień lipopigmentu nagromadzonego w komórce nerwowej odpowiada zwyrodnieniu włókienkowemu Alzheimera, obserwowanemu głównie w psychozie przedstarczej Alzheimera i w otępieniu starczym. Z badań m.in. Terry'ego i wsp. (1964) oraz Thomasa i Wiśniewskiej (1967) wynika, że obecność zmian neurofibrylarnych świadczy o zaburzonym metaboliz-



mie wewnątrzkomórkowym i jest aktywną odpowiedzią komórki nerwowej na działanie czynnika szkodliwego (Thomas 1968). Terry i Pena (1965) obserwowali powstanie tych zmian w pobliżu kropelek lipopigmentu w komórce nerwowej. Podobnie w tym przedziale wieku nie obserwuje się również płytek starczych, morfologicznego wykładnika procesu inwolucji. Suzuki i Terry (1967) łączą powstanie płytek starczych ze zmianami włókienkowymi Alzheimera w perikarionie. Wydaje się więc, że przewlekłe nadużywanie alkoholu, które średnio trwało w grupie I 15 lat, zakłóciło funkcję komórki nerwowej i przyspieszyło proces inwolucji w badanych strukturach.

Podobnie w grupie II, starszej wiekiem (średnia 63 lata) przewlekłe nadużywanie alkoholu trwające kilkadziesiąt lat, pogłębiło proces inwolucji, o czym świadczy obecność kłębków naczyńniowych, znaczne nasilenie ubytków komórkowych i stłuszczeń oraz przewlekłego schorzenia neuronów, deformacja włókienek nerwowych, płytki starcze oraz ciała amyloidowe. Stwierdzone nasilenie zmian odpowiada obrazom patologicznym obserwowanym w psychozach podeszłego wieku (Braunmühl 1956, Grünthal 1959, Tarnowska-Dziduszko 1967, Jamada, Mehraein 1968, Arendt 1970).

Wydaje się, że ugrupowania jądra migdałowego są wcześniej dotknięte procesem inwolucji w obu grupach, podobnie jak w psychozie przedstarczej Alzheimera i w psychozie starczej (Jamada, Mehraein 1968). Odczyn gleju jest w tym obszarze wyraźnie mniejszy przy znacznym nasileniu zmian inwolucyjnych.

Przedstawione w tej pracy wyniki mogą świadczyć o zaburzeniu metabolizmu komórek nerwowych w badanych strukturach. W młodszych przypadkach zaburzenia te przyspieszają, a u starszych chorych pogłębiają proces inwolucyjny zarówno w komórce nerwowej, jak i w pilsni nerwowej.

#### WNIOSKI

1. Przewlekłe nadużywanie alkoholu przyspiesza i nasila występowanie zmian inwolucyjnych w korze amonalnej i w ugrupowaniach jądra migdałowego.
2. Ugrupowania jądra migdałowego są wcześniej dotknięte procesem chorobowym niż kora amonalna.
3. Uszkodzenie kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowego może m.in. przyczynić się do rozwoju zespołu psychoorganicznego występującego w przebiegu klinicznym przewlekłego alkoholizmu.

Е. Тарновска-Дзидушко

ИНВОЛЮЦИОННЫЙ ПРОЦЕСС КОРЫ ГИППОКАМПА И КОМПЛЕКСА  
МИНДАЛЕВИДНОГО ЯДРА ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЛКОГОЛИЗМЕ

Резюме

Проведены морфологические исследования коры гиппокампа и комплекса миндалевидного ядра в случаях хронического алкоголизма для установления влияния алкоголя на развитие инволюционных изменений. Выбор исследованных структур мозга был продиктован их податливостью на раннее появление в их области признаков старения.

Материал, охватывающий 47 случаев секции больных, хронически злоупотреблявших алкоголем, разделили на две группы. В группе случаев от 28 до 49 лет злоупотребление алкоголем длилось в среднем 15 лет. В более чем половине случаев секция обнаружила ожирение и цирроз печени, дегенерацию сердечной мышцы и обобщенную атрофию мозга.

В группе случаев от 50 до 76 лет злоупотребление алкоголем продолжалось в среднем 32 года. В 75% случаев секция обнаружила ожирение и цирроз печени и атрофию мозга.

Гистологическое исследование в группе более молодых людей выявило в большинстве случаев значительное усиление процесса атрофии. Островковые потери нервных клеток, усиление клеточных липоидозов превышали структурные изменения, наблюдаемые у неалкоголиков в том же самом возрасте. Среди липопигмента, накопленного в нервных клетках, отмечена деформация нервных волокон, подобная фибриллярным изменениям типа Алцгеймера. Кроме того наблюдали старческие пластинки.

В группе старших людей установлено значительное усиление инволюционных изменений, соответствующее усилению патологических изменений, наблюдаемых при психозах старческого возраста. По-видимому комплекс миндалевидного ядра раньше охватывается болезнью, чем кора гиппокампа.

Полученные результаты могут свидетельствовать о нарушенном метаболизме нервных клеток, вызванном хроническим злоупотреблением алкоголем. Оно ускоряет у молодых и усиливает у старших пациентов инволюционный процесс как в нервных клетках, так и в нервных волокнах.

Наблюдаемые повреждения коры гиппокампа и комплекса миндалевидного ядра могут быть ответственными за клинический психоорганический синдром.

Е. Tarnowska-Dziduszko

INVOLUTION PROCESS OF AMMONAL CORTEX AND AMYGDALOID  
COMPLEX IN CHRONIC ALCOHOLISM

Summary

The morphological study was performed in purpose to evaluate the influence of alcohol on the development of involution changes in ammonal cortex and in amygdaloid complex in cases of chronic alcoholism. The choice of the studied structures resulted from the known susceptibility of early appearance of ageing symptoms within these area. The material consisting of 47 post mortem cases of



chronic alcoholic patients was divided into two groups. In group of cases comprising patients aged 28—49 years, the abuse of alcohol lasted 15 years (average). At post mortem in more than 50% of cases, steatosis and cirrhosis of liver, heart muscle degeneration and generalized brain atrophy was found. In group of patients 50—76 years old excessive drinking of alcohol lasted 32 years (average). Post mortem revealed in 75% of cases steatosis and cirrhosis of liver and brain atrophy.

Histologically the majority of cases from the group of younger individuals presented marked enhancement of atrophic process. Insular loss of nerve cells, excess of lipopigment dominated over structural alterations observed in non alcoholic cases of the same age. Among lipopigment accumulated in nerve cells there was observed deformation of neurofibrils similar to fibrillary changes of Alzheimer type. Senile plaques were also present. In the group of older individuals there was marked increase of involution changes corresponding in intensity to pathological changes observed in senile psychoses. It seemed that amygdaloid complexes were earlier affected by the pathological process than the ammonal cortex.

The results can speak for disturbed metabolism of nerve cells caused by chronic abuse of alcohol. It hastens the involution process in the nerve cells and in the neuropil in younger individuals and makes it more intensive in older patients. The damage observed in ammonal cortex and amygdaloid complexes can be responsible for clinical psychoorganic syndromes.

#### PIŚMIENICTWO

1. Arendt A.: Altern des Zentralnervensystems. *Math. Naturwiss.* 1970, 19, 441—450.
2. Braunnühl v. A.: Alterserkrankungen des Zentralnervensystems. W: *Hdb. der spez. path. Anatomie u. Histologie*. Eds.: Henke, Lubarsch, Rössle. Springer, Berlin 1957, Bdt. 13/IA.
3. Corsellis J. A. N.: *Mental illness and the ageing brain*. Oxford, 1962.
4. Gellerstedt N.: Zur Kenntnis der Hirnveränderungen bei der normalen Altersinvolution. *Acta Soc. Med. Uppsala* 1933, 39, 193—408.
5. Glees P., Griffith H. B.: Bilateral destruction of the hippocampus (Cornu Ammonis) in a case of dementia. *Mschr. Psychiat. Neurol.* 1952, 123, 193—204.
6. Grünthal E.: Die präsenilen und senilen Erkrankungen des Gehirns und des Rückenmarks. W: *Hdb. der Neurologie*. Springer, Berlin 1936, 11, 466—500.
7. Grünthal E.: Über den derzeitigen Stand der Frage nach den klinischen Erscheinungen bei Ausfall des Ammonshorns. *Psychiat. Neurol. (Basel)* 1959, 138, 145—159.
8. Jamada M., Mehraein P.: Verteilungsmuster der senilen Veränderungen im Gehirn. *Arch. Psychiat. Z. Neurol.* 1968, 211, 308—324.
9. McMenemey W. H.: *The dementias and progressive diseases of the basal ganglia*. W: *Grienfield's Neuropathology*. Ed. E. Arnold, London 1963, 520—576.
10. Meyer V., Yates A.: Intellectual changes following temporal lobectomy for psychomotor epilepsy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1955, 18, 44—52.
11. Obersteiner H.: Über das hellgelbe Pigment in den Nervenzellen und das Vorkommen weiterer fettähnlicher Körper im Zentralnervensystem. *Obersteiners Arbeiten* 1903, 10, 245—274.

12. Penfield W., Milner B.: Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone. *Arch. Neurol. Psychiat. (Chic.)* 1958, 79, 475—497.
13. Simchowicz T.: Badania nad anatomią patologiczną otępienia starczego. *Pamiętnik Warszawskiego Tow. Lek.* 1913, 109, 16—96 i 240—287.
14. Störing G. E., Hauss K., Uhle G.: Zur topischen Diagnostik des amnestischen Symptomenkomplexes. *Psychiat. Neurol. (Basel)* 1962, 143, 161—177.
15. Suzuki K., Terry R. D.: Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia. *Acta neuropath. (Berl.)* 1967, 8, 267—284.
16. Tarnowska-Dziduszko E.: Badania morfologiczne mózgu w psychozach wieku podeszłego. *Rozprawa doktorska, Instytut Psychoneurologiczny* 1967.
17. Tarnowska-Dziduszko E.: Badania nad strukturą, topografią i patogenезą kłębków naczyniowych w procesie starzenia się mózgu. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1970, 20, 15—22.
18. Terry R. D., Gonatas N. K., Weiss M.: Ultrastructural studies in Alzheimer's presenile dementia. *A.M.A. Arch. Pathol.* 1964, 44, 269—297.
19. Terry R. D., Pena C.: Experimental production of neurofibrillary degeneration. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1965, 24, 200—210.
20. Thomas E., Wiśniewska K.: Histochemische Untersuchungen an Nervenzellen mit experimentall erzeugten fibrillären Ablagerungen durch Aluminium phosphat. *Acta neuropath. (Berl.)* 1967, 9, 335—345.
21. Thomas E.: Histochemie der Altersvorgänge des Nervensystems, insbesondere der Alzheimerschen Fibrillenveränderungen. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft f. Pathol. Ed. G. Fischer, Stuttgart* 1968, 74—93.
22. Uhle G.: Korsakow-Psychose nach doppelseitiger Ammonshornzerstörung mit transneuronaler Degeneration der Corpora mamillaria. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1951, 165, 446—456.
23. Uhle G.: Über das Ammonshorn. *Fortschr. Neurol. Psychiat.* 1954, 22, 510—518.

Adres autorki: Zakład Neuropatologii Instytutu Psychoneurologicznego, Aleja Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa.



## WSKAZÓWKI DLA AUTORÓW

Neuropatologia Polska zamieszcza prace z zakresu neuropatologii klinicznej i doświadczalnej oraz dziedzin pokrewnych (neuroonkologii, neuroanatomii, neurochemii itp.).

Redakcja pisma przyjmuje do druku prace oryginalne i doniesienia kazuistyczne; prace poglądowe — przygotowane wyłącznie na zaproszenie Redakcji.

Neuropatologia Polska przyjmuje do druku prace w języku polskim, angielskim, francuskim i niemieckim.

Warunkiem przyjęcia pracy jest oświadczenie autora, że praca nie była drukowana w innym czasopiśmie oraz pisemna zgoda kierownika placówki/ek na jej opublikowanie.

Objętość pracy oryginalnej nie powinna przekraczać wraz z pełną dokumentacją (streszczenie, piśmiennictwo, tabele, wykresy, ryciny itp.) 20 stron, pracy kazuistycznej — 10 stron.

Prace należy przesyłać w 2 egzemplarzach w znormalizowanym maszynopisie (4-cm margines z lewej strony, 30 wierszy na stronę z zachowaniem podwójnego odstępu, bez odręcznych poprawek i podkreśleń).

Wykaz piśmiennictwa, ułożony alfabetycznie, powinien obejmować wyłącznie pozycje cytowane w pracy. W wykazie piśmiennictwa podaje się nazwiska i inicjały wszystkich autorów, tytuł pracy, nazwę czasopisma, rok, tom, pierwszą i ostatnią stronę publikacji. W przypadku źródeł książkowych — nazwisko(a) i inicjał(y) autorów, tytuł książki (ew. rozdziału), wydawcę, miejsce i rok wydania. W tekście należy podać nazwisko autora(ów) oraz rok publikacji. W przypadku, gdy autorów cytowanej pozycji jest więcej niż dwóch, należy podać nazwisko pierwszego autora ze skrótem „i wsp.”.

Ryciny ograniczone do niezbędnych powinny być oznaczone kolejnymi numerami. Wskazane jest zestawienie rycin w tablice zbiorcze o wymiarach 12,5 × 19 cm.

Redakcja prosi o nadsyłanie objaśnień i podpisów do tabel, schematów i rycin oraz streszczenia w języku polskim i angielskim.

Redakcja zastrzega sobie prawo wprowadzania koniecznych poprawek stylistycznych i zmniejszania ilości rycin bez porozumienia z autorem.

Redakcja nie zwraca maszynopisów nadesłanych prac.

Redakcja prosi autorów o dokładne sprawdzenie tekstów apelując o zwięzłość, przejrzysty układ pracy oraz staranne przygotowanie materiału ilustracyjnego.

Autorzy otrzymują pierwszą korektę pracy. W korekcie Redakcja uwzględni jedynie błędy literowe oraz poprawki pomyłek drukarskich.

Autorzy prac zamieszczonych w *Neuropatologii Polskiej* otrzymują honorarium wg ustalonych stawek oraz 25 odbitek na koszt autora.

KATARZYNA KUCHARSKA-DEM CZUK

ESTERAZA NIESWOISTA KOMÓREK MONOCYTARNO-  
-RETIKULARNYCH PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO  
W ZAPALENIACH I PODRAŻNIENIACH OPON  
MÓZGOWO-RDZENIOWYCH \*

Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych  
Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie  
Kierownik: doc. dr hab. med. B. Trzaska

W warunkach zdrowia komórki monocytarne płynu mózgowo-rdzeniowego (m.-rdz.) nie różnią się morfologicznie od monocytów krwi obwodowej, a liczba ich waha się od 0—50%, nie przekraczając zwykle 30% (Sayk, 1960; Kolar, Zeman, 1968; Bischoff, 1971; Sörnäs, 1972). W wyniku działania różnych czynników zapalnych (bakteryjnych, wirusowych) lub toksycznych (jady bakteryjne, niektóre produkty przemiany materii itp.) dochodzi do rozplemu i stymulacji różnych elementów komórkowych, w tym także komórek monocytarnych i retikularnych (Sayk, 1960; Olischer, 1966; Kolar, Zeman, 1968; Bischoff, 1971; Sörnäs, 1971; Dyken, 1975; Kucharska-Demczuk, 1975, 1977; Oehmichen, 1976). W tych stanach klasyfikacja i różnicowanie komórek monocytarnych płynu w oparciu o kryteria morfologiczne jest trudna lub wręcz niemożliwa z uwagi na dużą zdolność tych komórek do transformacji (Sörnäs, 1971; Oehmichen, Grüniger, 1974; Guseo, 1976; Oehmichen, 1976).

Wprowadzenie metod cytochemicznych i cytoenzymatycznych do cytologii płynu m.-rdz. pozwala na bliższe scharakteryzowanie komórek płynu w różnych stanach patologicznych, dostarczając więcej danych niż barwienie panoptyczne (Olischer, 1966, 1971; Olischer, Sayk, 1969; Peiffer, Schwarze, 1971). Enzymem powszechnie uznanym za dogodny wskaźnik dla monocytów jest esteraza nieswoista, należąca do grupy hydrolaz.

---

\* Praca wykonana w ramach problemu resortowego 10-MZ-V, koordynowanego przez Instytut Psychoneurologiczny w Warszawie.

Badania przeprowadzono przy pomocy technicznej p. Marii Zaremby.



Celem pracy była ocena występowania i aktywności esterazy nieswoistej komórek płynu m.-rdz., określanych w barwieniu panoptycznym jako monocytarno-retikularne (mon.-ret.), zarówno w stanach zapalnych, jak i w zespołach podrażnienia opon. Postanowiono również odpowiedzieć na pytanie, czy istnieją różnice cytochemiczne między komórkami mon.-ret. spotykanymi w ropnych i nieropnych zapaleniach opon oraz w zespole podrażnienia opon i jak zachowuje się aktywność esterazy nieswoistej w zależności od okresu choroby.

## MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na materiale pochodzącym od 94 chorych (55 mężczyzn i 39 kobiet) w wieku od 14 do 60 lat, leczonych w Klinice Chorób Zakaźnych PAM w latach 1975—1977. Chorych w zależności od ustalonego rozpoznania podzielono na 4 grupy (tabela 1).

Tabela 1. Podział badanych chorych

Grupy	Liczba chorych	Płeć	Wiek (lata)	Rozpoznanie kliniczne i liczba przypadków
I Ropne zapalenie opon m.-rdz.	23	7 K 16 M	28—57	Meningokokowe zapalenie opon - 6 Pneumokokowe zapalenie opon - 2 Ropne zapalenie opon o nieustalonej etiologii - 15
II Wirusowe zapalenie opon m.-rdz.	38	14 K 24 M	14—60	Świnkowe zapalenie opon - 9 Półpaścowe zapalenie opon - 1 Kleszczowe zapalenie mózgu (postać oponowa) - 1 Limfocytarne zapalenie opon o nieustalonej etiologii - 27
III Podrażnienie opon m.-rdz. w zakażeniach wirusowych	20	9 K 11 M	14—59	Ostre zakażenia górnych dróg oddechowych - 13 Zakażenia wirusowe z wysypką - 2 Opryszczka zwykła - 1 Wirusowe zapalenie wątroby - 1 Mononukleozą zakaźną - 1 Neuronitis vestibularis - 1 Odczyn poszczepienny przeciw ospie prawdziwej - 1
IV Podrażnienie opon m.-rdz. w zakażeniach bakteryjnych	13	7 K 6 M	17—54	Angina ropna - 4 Zapalenie płatowe płuc - 2 Zapalenie zatok obocznych nosa - 3 Zatrucie pokarmowe - 1 Odmiedniczkowe zapalenie nerek - 1 Czyrączność karku - 1 Dur brzuszny - 1

Badania cytologiczne i cytoenzymatyczne płynu m.-rdz. wykonywano metodą osadową według Sayka (1960) w komorze osadowej własnej konstrukcji (Kucharska-Demczuk, 1974). Płyn m.-rdz. pobierano drogą nakłucia przestrzeni podpajęczynówkowej kanału kręgowego w odcinku lędźwiowym. Wykonywano barwienie panoptyczne metodą May-Grünwalda-Giemsy oraz oznaczenie obecności esterazy nieswoistej metodą Braunsteīnera (1959). Aktywność enzymatyczną wyrażano w kryteriach półilościowych według schematu opracowanego przez Kapłowa (1955) i Rozensztajna i wsp. (1963). Komórki monocytarno-retikularne w zależności od obecności reakcji enzymatycznej podzielono na dwie zasadnicze grupy: komórki esterazo-dodatnie i esterazo-ujemne. Natężenie aktywności enzymatycznej w poszczególnych komórkach esterazo-dodatnich określono w stopniach od 1 do 4. Stopień 1 oznacza pojedyncze ziarna esterazo-dodatnie rozmieszczone nieregularnie w cytoplazmie komórkowej; stopień 2 oznacza kilka ziarnistości esterazo-dodatnich umieszczonych przeważnie na obwodzie komórki; stopień 3 oznacza dodatnią reakcję esterazową obejmującą całą cytoplazmę komórkową, jądro jest jednak widoczne, w 4 stopniu silna reakcja barwna obejmuje całą cytoplazmę, jądro komórkowe jest niewidoczne, zostało przysłonięte produktami reakcji enzymatycznej. W każdym przypadku poddano ocenie 100 komórek mon.-ret. w mikroskopie świetlnym w powiększeniu 900×. Średnią aktywność esterazy nieswoistej wyrażano wskaźnikiem „score”. Wskaźnik „score” uzyskiwano z sumy iloczynów wartości w poszczególnych stopniach aktywności enzymatycznej.

Wykonano 136 badań cytologicznych i 136 oznaczeń cytoenzymatycznych.

#### WYNIKI I OMÓWIENIE BADAŃ

Wyniki uzyskanych badań przedstawiono w tabelach 2 i 3. Materiał kontrolny stanowiły płyny m.-rdz. 10 osób (6 mężczyzn i 4 kobiet w wieku od 16 do 47 lat), u których nie występowały żadne infekcje, ani choroby organiczne ośrodkowego układu nerwowego. U 7 chorych rozpoznano nerwicę wegetatywną, u 3 migrenę; do Kliniki skierowano ich z podejrzeniem zapalenia opon z powodu skarg na silne bóle głowy.

W komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz. badanych chorych stwierdzano dodatni bądź ujemny odczyn na obecność esterazy nieswoistej.

Obserwowano także różny stopień aktywności enzymu w postaci od słabej do mocnej reakcji dyfuzyjnej, dającej różne zabarwienie cytoplazmy od jasnopomarańczowej do brunatnoceglastej. Niekiedy stwierdzano ziarniste produkty reakcji, często na obwodzie komórki. W ko-



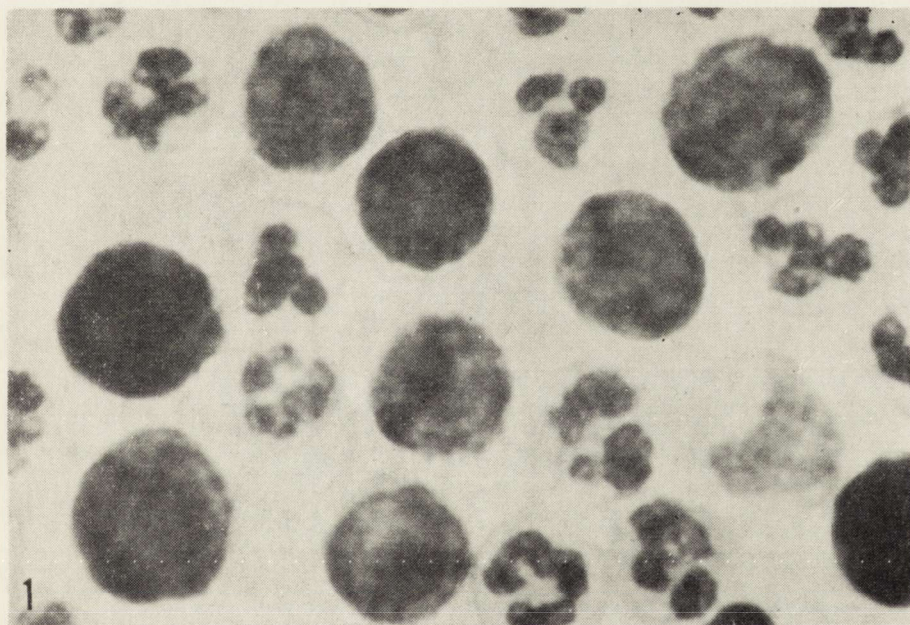
Tabela 2. Wyniki badań aktywności esterazy nieswoistej komórek monocytarno-retikularnych płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na ropne i wirusowe zapalenie opon

Zap. opon	Okres choroby (dni)	Liczba badań	Cytoza w mm <sup>3</sup>	Komórki mon.-ret. %	Komórki esterazo-dodatnie %	Komórki esterazo-ujemne %	Stopień aktywności enzymu				„ Score”
							1	2	3	4	
Ropne	I 2—4	17	1560—27800	3—74	100—56 (17)	1—44 (15)	2—25 (13)	1—43 (15)	17—78 (17)	1—44 (15)	150—349 (17)
	$\bar{x}=3$		$\bar{x}=9743,8$	$\bar{x}=19,9$	$\bar{x}=85,9$	$\bar{x}=14,1$	$\bar{x}=7,8$	$\bar{x}=16,8$	$\bar{x}=43,4$	$\bar{x}=14,1$	$\bar{x}=251$
	II 9—18	17	1—2442	11—72	2—94 (8)	6—100 (17)	2—28 (8)	1—33 (6)	1—31 (4)	2 (1)	2—193 (8)
	$\bar{x}=12$		$\bar{x}=263,8$	$\bar{x}=37,7$	$\bar{x}=6,6$	$\bar{x}=93,4$	$\bar{x}=4,7$	$\bar{x}=4,6$	$\bar{x}=2,5$		$\bar{x}=21,8$
	III 19—106	12	2—444	6—56	1—75 (7)	25—100 (17)	1—34 (7)	1—28 (6)	1—13 (4)	0 (12)	1—129 (7)
	$\bar{x}=48,9$		$\bar{x}=68,7$	$\bar{x}=29,5$	$\bar{x}=13,9$	$\bar{x}=86,1$	$\bar{x}=5,5$	$\bar{x}=5,5$	$\bar{x}=2,6$		$\bar{x}=41,0$
Wirusowe	I 2—10	28	30—949	4—82	2—86 (16)	14—100 (28)	1—32 (17)	2—41 (12)	1—36 (8)	2—12 (3)	1—215 (17)
	$\bar{x}=5,1$		$\bar{x}=295,9$	$\bar{x}=33,9$	$\bar{x}=36$	$\bar{x}=64$	$\bar{x}=9,8$	$\bar{x}=15$	$\bar{x}=15,8$	$\bar{x}=7,3$	$\bar{x}=62,4$
	II 11—20	27	6—125	4—60	1—17 (11)	83—100 (27)	1—12 (11)	1—9 (8)	1—3 (4)	0 (27)	1—32 (11)
	$\bar{x}=14,7$		$\bar{x}=43,1$	$\bar{x}=24,5$	$\bar{x}=6,9$	$\bar{x}=93,1$	$\bar{x}=3,6$	$\bar{x}=3,6$	$\bar{x}=1,5$		$\bar{x}=10,5$
	III 25—32	2	15—30	22—55	0—6	94—100	6 (1)	0	0	0	6 (1)

$\bar{x}$  — średnia arytmetyczna

W nawiasach podano liczbę badań, w których stwierdzono określone komórki mon.-ret.

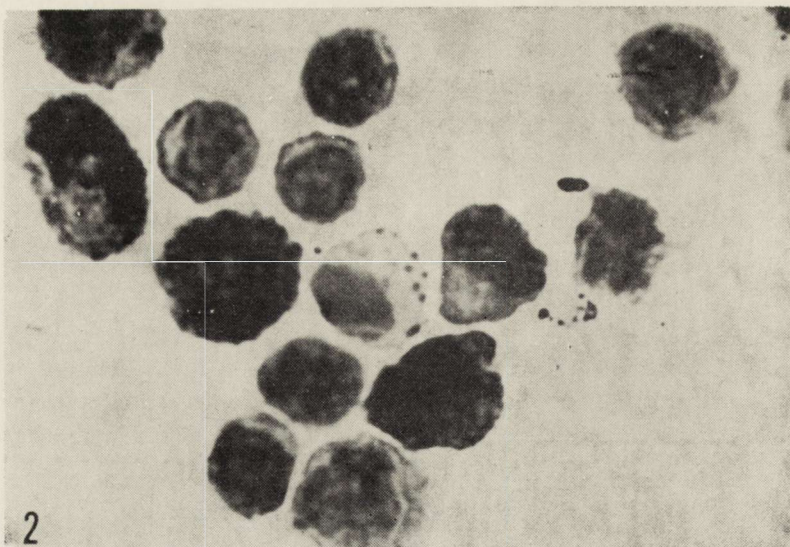
mórkach o wysokiej aktywności enzymu odczyn barwny był tak intensywny, że obejmował całą cytoplazmę i przysłaniał jądro (ryc. 1, 2). Najwyższą aktywność esterazy nieswoistej stwierdzano w komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz. u chorych na ropne zapalenie opon w ostrym okresie choroby, między 2 a 4 dniem. U chorych tej grupy wszystkie komórki mon.-ret. wykazywały reakcję dodatnią, a średnia wartość wskaźnika „score” była wysoka i wynosiła 251. Wartość powyżej 300 stwierdzono u dwóch chorych na meningokokowe i u jednego na pneumokokowe zapalenie opon, u których choroba miała przebieg bardzo ciężki. W przypadkach średnio ciężkich i lekkich średnie wartości wskaźnika „score” nie przekraczały 200. W okresie zdrowienia równoległe z ustępowaniem objawów klinicznych i zmian zapalnych w płynie, aktywność esterazy nieswoistej w komórkach mon.-ret. była znacznie słabsza, bądź nie występowała wcale. Od 19 dnia choroby tylko u 7 chorych, u których choroba przewlekłała się, stwierdzano dodatnią reakcję esterazową w średniej wartości „score” 41.



Ryc. 1. Wybitnie dodatni odczyn na obecność esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu mózgowo-rdzeniowego u chorego na ropne meningokokowe zapalenie opon w ostrym okresie choroby. Stopień aktywności enzymatycznej określono na 3 i 4 w tych komórkach, w których reakcja barwna obejmuje całą komórkę pokrywając jądro. Pow. 1350  $\times$

Fig. 1. Prominent reaction of nonspecific esterase in monocyctic reticular cells from cerebro-spinal fluid from the patient in acute period of purulent meningococcal meningitis. The intensity of enzymatic activity corresponds to 3rd and 4th degree in the cells totally filled with reaction products.  $\times$  1350.





Ryc. 2. Dodatni odczyn na obecność esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu mózgowo-rdzeniowego u chorego na półpaścowe zapalenie opon w ostrym okresie choroby. W komórce leżącej centralnie widoczny jest odczyn typu ziarnistego odpowiadający 2 stopniowi aktywności enzymatycznej. W pozostałych komórkach monocytarno-retikularnych reakcja ziarnisto-dyfuzyjna jest określona jako 3 i 4 stopień aktywności. Pow. 1350 X.

Fig. 2. Positive reaction of nonspecific esterase in monocyte-reticular cells of cerebro-spinal fluid from the patient in acute period of herpes zoster meningitis. In the central cell a granular reaction corresponding to 2nd degree of enzymatic activity. Remaining monocyte-reticular cells exhibit granular diffuse reaction defined as the 3rd and 4th degree of enzymatic activity X 1350.

W grupie II u chorych na wirusowe zapalenie opon występowanie esterazy nieswoistej w komórkach mon.-ret. było odmienne. W 11 na 28 osadów płynu w ostrym okresie choroby i w 16 na 27 w okresie wcześniejszego zdrowienia komórki mon.-ret. wykazywały ujemny odczyn enzymatyczny. U pozostałych badanych aktywność tego enzymu była znacznie słabsza w porównaniu z grupą I (ropne zapalenie opon) (ryc. 2). Tylko u 4 chorych, u których choroba miała przebieg szczególnie ciężki stwierdzano dość wysoki odczyn esterazy nieswoistej (średnie wartości „score” powyżej 100). Najwyższą aktywność („score” 215) obserwowano u jednego chorego na ciężkie półpaścowe zapalenie opon i mózgu w przebiegu rozsianej postaci półpaśca piersiowego. U chorych, u których choroba miała przebieg lekki, zarówno w ostrym okresie, jak i w okresach zdrowienia odsetek komórek mon.-ret. esterazo-dodatnich był niski, a odczyn enzymatyczny słaby.

U większości pacjentów z zespołem podrażnienia opon, zarówno w przebiegu infekcji bakteryjnych jak i wirusowych, stwierdzano ujemny

odczyn na obecność esterazy nieswoistej w komórkach monocytarnych płynu m.-rdz. (tabela 3). Tylko u nielicznych komórek monocytarne wykazywały słabą reakcję enzymatyczną. I tak w jednym przypadku zespołu podrażnienia opon w przebiegu płatowego zapalenia płuc i w jednym z ostrym nieżytem górnych dróg oddechowych, średnie wartości wskaźnika „score” wynosiły 59 i 50.

U osób grupy kontrolnej wszystkie komórki monocytarne płynu m.-rdz. były esterazo-ujemne.

#### DYSKUSJA

W różnych stanach patologicznych ośrodkowego układu nerwowego, w tym również w procesach zapalnych opon, w płynie m.-rdz. często i niekiedy w znacznym odsetku obserwuje się odczyny monocytarno-retikularne (Sayk, 1960; Kolar, Zeman, 1968; Bischoff, 1971; Kuchar-ska-Demczuk, 1975, 1977). Wykazano, że komórki monocytarno-retikularne płynu m.-rdz. odgrywają ważną rolę w odporności komórkowej, a także humoralnej (Sörnäs, 1971; Oehmichen, Grüninger, 1974; Guseo, 1976; Oehmichen, 1976).

W wyniku działania różnych czynników antygenowych dochodzi do stymulacji komórek i podejmowania przez nie różnych czynności dotychczas nie spełnianych. Sörnäs (1971) podał, że aktywność komórek monocytarnych płynu m.-rdz. i ich zdolność do transformacji wzrasta w obecności granulocytów obojętnochłonnych. Jednym z wykładników stymulacji komórkowej są zmiany aktywności enzymów, w tym także nieswoistej esterazy.

Znamienną cechą uzyskanych wyników własnych dotyczących odczynu esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz. jest ich różnorodność, wykazująca pełną zależność od etiologii, jak również okresu choroby. Wykazano, że komórki monocytarno-retikularne płynu m.-rdz. chorych na ropne zapalenie opon mają wspólną właściwość polegającą na wysokiej aktywności enzymu. Wzrost aktywności esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz. stwierdzono w różnych chorobach ośrodkowego układu nerwowego, w tym i w zapaleniach opon (Olischer, Sayk, 1969; Olischer, 1971). Peiffer i Schwarze (1971) w pracach doświadczalnych wykazali, że komórki monocytarne pochodzące z tkanki oponowej cechuje wysoka aktywność esterazy nieswoistej. Można zatem przyjąć, że w ropnych zapaleniach opon w ostrej fazie choroby komórki monocytarne płynu m.-rdz. są raczej pochodzenia oponowo-tkankowego niż hematogenego. Ponieważ wiadomo, że esteraza nieswoista ma ścisły związek z fagocytozą, obserwowany przez nas wzrost aktywności tego enzymu, zwłaszcza



Tabela 3. Wyniki badań aktywności esterazy nieswoistej komórek monocytarno-retikularnych płynu mózgowo-rdzeniowego u chorych z zespołem podrażnienia opon w przebiegu zakażeń bakteryjnych i wirusowych

Rodzaj zakażenia	Dzień choroby	Liczba badań	Cytoze w mm <sup>3</sup>	Komórki mon.-ret. %	Liczba badań z dodatnią reakcją estera-zową	Komórki mon.-ret. estera-zo-dodatnie %	Komórki mon.-ret. estera-zo-ujemne %	Stopień aktywności enzymu				Score
								1	2	3	4	
Wirusowe	2—14	20	1—26	11—70 (18)	8	2—23	76—100 (18)	1—6 (8)	1—10 (7)	2—8 (2)	0	2—50
	$\bar{x}=4,6$		$\bar{x}=3,5$	$\bar{x}=43,0$		$\bar{x}=8,6$	$\bar{x}=91,4$					$\bar{x}=15,7$
Bakteryjne	2—21	13	1—20	25—90 (12)	4	1—34	66—100 (12)	1—16 (3)	1—11 (4)	2—7 (2)	0	2—59
	$\bar{x}=6,4$		$\bar{x}=3,3$	$\bar{x}=54,5$		$\bar{x}=13,0$	$\bar{x}=87,0$					$\bar{x}=18,2$

$\bar{x}$  — średnia arytmetyczna

W nawiasach podano liczbę badań, w których stwierdzono określone komórki mon.-ret.

w ropnych zapaleniach opon, świadczy o zwiększonej aktywności żernej komórek, stanowiąc jednocześnie pewien wykładnik ciężkości zmian zapalnych toczących się w oponach.

W przypadkach wirusowych zapaleń opon, jak również w zespołach ich podrażnienia zachowanie się esterazy nieswoistej było zmienne. Odczyn dodatni występował nieregularnie z pewnymi wahaniami ilościowymi, przy czym należy podkreślić, że w przypadkach o ciężkim przebiegu klinicznym reakcja enzymatyczna była wyraźniejsza i wyższa. Może to wskazywać, że pochodzenie i czynności komórek monocytarnych płynu m.-rdz. w tych stanach są zróżnicowane. Wiadomo, że ujemną bądź słabo dodatnią reakcją esterazową wykazują komórki wywodzące się rozwojowo z elementów limfoidalnych. Można by zatem wnioskować, że komórki monocytarne płynu wykazujące znaczne podobieństwo morfotyczne do monocytów krwi, a różniące się od nich cytoenzymatycznie, mogą być pochodzenia limfoidalnego. Za tym pochodzeniem części komórek monocytarnych płynu m.-rdz. wypowiada się wielu autorów (Olischer, 1966; Olischer, Sayk, 1969; Sörnäs, 1971; Guseo, 1976). Wyniki badań własnych są zgodne z wyżej przytoczonymi danymi i mogą świadczyć, że w warunkach zdrowia, jak również w większości stanów zapalnych etiologii wirusowej i zespołach podrażnienia opon tzw. komórki monocytarne płynu m.-rdz. są pochodzenia limfoidalnego, a nie histomonocytarnego.

#### WNIOSKI

1. W badanych grupach chorych wykazano różnice w występowaniu i stopniu aktywności esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz., przy czym największą aktywność enzymatyczną obserwowano w ropnym zapaleniu opon w ostrej fazie choroby.

2. Wykazano równoległość między wyższą aktywnością esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz. a ciężkością choroby, zarówno u chorych na bakteryjne, ropne zapalenie opon, jak i na zapalenie wirusowe.

3. Stwierdzono różnice w występowaniu i aktywności esterazy nieswoistej w komórkach monocytarno-retikularnych płynu m.-rdz. mogą wskazywać na różne pochodzenie tych komórek zależnie od fazy choroby, jak również w pewnym stopniu, od charakteru czynnika chorobotwórczego.

4. W warunkach zdrowia komórki monocytarne płynu m.-rdz. nie wykazują obecności esterazy nieswoistej, co różni je od monocytów krwi.



К. Кухарска-Демчук

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭСТЕРАЗА МОНОЦИТАРНО-РЕТИКУЛЯРНЫХ  
КЛЕТОК ЦЕРЕБРО-СПИНАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ ПРИ ВОСПАЛЕНИЯХ  
И РАЗДРАЖЕНИЯХ ЦЕРЕБРО-СПИНАЛЬНЫХ ОБОЛОЧЕК

Резюме

Представлены результаты исследования активности неспецифической эстеразы моноцитарно-ретикулярных клеток cerebro-спинальной жидкости у 94 больных гнойным бактериальным или вирусным воспалением cerebro-спинальных оболочек, а также у больных с синдромом раздражения оболочек в ходе бактериальных и вирусных инфекций и у 10 пациентов без органических заболеваний мозга.

Показаны различия в проявлении и степени активности неспецифической эстеразы моноцитарных клеток cerebro-спинальной жидкости в отдельных группах больных, тогда как во всех контрольных жидкостях наблюдали отрицательную реакцию. Наибольшую ферментативную активность наблюдали в острой фазе гнойного воспаления, наименьшую — при синдромах раздражения оболочек. Из анализа обнаруженных изменений следует, что существует некоторый параллелизм между повышенной активностью неспецифической эстеразы в моноцитарно-ретикулярных клетках жидкости и фазой и тяжестью заболевания у больных как гнойным бактериальным воспалением, так и вирусным воспалением.

K. Kucharska-Demczuk

NONSPECIFIC ESTERASE IN THE MONOCYTIC RETICULAR CELLS OF THE  
CEREBRO-SPINAL FLUID IN MENINGITIS AND MENINGISMUS

Summary

The study concerns the activity of nonspecific esterase of monocytic reticular cells in the cerebro-spinal fluid in 94 patients with bacterial purulent or viral meningitis, in patients with meningismus in the course of bacterial or viral infection and in 10 patients without neurological organic disease.

The authors presented the differences in appearance and intensity of the non-specific esterase activity of monocytic cells from cerebro-spinal fluid in each group of patients, whereas in all control fluids the reaction was negative. The highest enzymatic activity was observed in acute period of the bacterial purulent meningitis, the lowest in meningismus. Evaluation of changes points out, that there exists some parallelism between high activity of nonspecific esterase in monocytic reticular cells of cerebro-spinal fluid and the period and severity of illness in both groups of patients either with bacterial purulent or with viral meningitis.

PIŚMIENNICTWO

1. Bischoff A.: Liquorocytodiagnostik. Dtsch. Med. Wschr., 1971, 96, 1881—1883.
2. Braunstëiner H.: Esterase in leukocytes. J. Histochem. Cytochem., 1959, 7, 202—206.

3. Dyken P.: Cerebrospinal fluid cytology. *Neurology*, 1975, 25, 210—217.
4. Guseo A.: Morphological signs as indications of function of cells in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol.*, 1976, 212, 159—170.
5. Kaplow L.: A. histochemical procedure for localizing and evaluating leucocyte alkaline phosphatase activity on smears of blood and marrow. *Blood*, 1955, 10, 1023—1027.
6. Kolar O., Zeman W.: Spinal fluid cytomorphology. *Arch. Neurol.*, 1968, 18, 44—51.
7. Kucharska-Demczuk K.: Nowy wzór komory osadowej do badań cytologicznych płynu mózgowo-rdzeniowego. *Pol. Tyg. Lek.*, 1974, 29, 2283—2285.
8. Kucharska-Demczuk K.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w niektórych wirusowych zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 121—135.
9. Kucharska-Demczuk K.: Zmiany w płynie mózgowo-rdzeniowym w zespole podrażnienia opon w przebiegu niektórych ostrych infekcji dróg oddechowych. *Pol. Tyg. Lek.*, 1977, 32, 103—106.
10. Oehmichen M., Grüniger H.: Cytokinetic studies on the origin of cells of the cerebrospinal fluid, with a contribution to the cytogenesis of the leptomeningeal mesenchyme. *J. Neurol Sci.*, 1974, 22, 165—176.
11. Oehmichen M.: Characterization of mononuclear phagocytes in human CSF using membrane markers. *Acta Cytologica.*, 1976, 20, 548—552.
12. Olischer R.: Verschiedene Zellreaktionen im Liquor cerebrospinalis. W: Symposium über die Zerebrospinalflüssigkeit. G. Fischer, Jena, 1966, 63—76.
13. Olischer R., Sayk J.: Zur Differenzierung „atypischer“ Zellen im Liquor cerebrospinalis durch verschiedene zytologische Methoden. *Wissenschaftl. Zschr. DDR Universität Rostock*, 1969, 18, 599—605.
14. Olischer R.: Der Nachweis der unspezifischen Esteraze in Liquor-Zellen. Eine cytodagnostische Zusatzuntersuchung. *Z. Neurol.*, 1971, 200, 61—69.
15. Peiffer J., Schwarze E.: Beitrag zur Enzymohistochemie der Liquor und Lepotomeningealzellen. *Nervenarzt.*, 1971, 42, 267—269.
16. Rozensztajn L., Marshak G., Efrati P.: Acid phosphatase activity in normal human blood and bone marrow cells as demonstrated by the azo-dye method. *Acta Haemat.*, 1963, 30, 310—314.
17. Sayk J.: *Cytologie der Cerebrospinalflüssigkeit*, G. Fischer, Jena, 1960.
18. Sörnäs R.: Transformation of mononuclear cells in cerebrospinal fluid. *Acta Cytologica*, 1971, 15, 545—552.
19. Sörnäs R.: The cytology of the normal cerebrospinal fluid. *Acta neurol. scandinav.*, 1972, 48, 313—320.

Adres autorki: Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych Pomorskiej Akademii Medycznej, ul. Arkońska 4, 71-455 Szczecin.



TREŚĆ

H. Kroh, A. Luciani: Wpływ etylnitrozomocznika zastosowanego przezłożyskowo na ultrastrukturę mózgu dorosłej myszy. I. Komórka nerwowa . . . . .	449
B. Gajkowska, A. Danielewicz, J. Borowicz: Ultrastruktura układu podwzgórzowo-przysadkowego szczura zatrawanego morfiną w okresie rozwoju . . . . .	461
A. Loesch, A. Danielewicz, J. Borowicz: Obraz mikroskopowo-elektronowy układu neurosekrecyjnego w zaburzeniach osmotycznych u szczura . . . . .	473
D. Sitkiewicz, M. Skonieczna, E. Orłowska, W. Bicz: Wpływ fosforoorganicznych insektycydów na procesy utleniania w mitochondriach mózgu szczura. Badania porównawcze chlorfenwinofosu i jego chemicznych analogów . . . . .	487
L. Dydyk, A. Piekarczyk, T. Szreter, J. Prokopczyk: Wpływ normobarycznej hiperoksji na zawartość glikogenu w dojrzewającym mózgu królika . . . . .	497
M. J. Mossakowski, R. Gadamski: Zaburzenia mikrokrążenia mózgowego u chomików mongolskich ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej . . . . .	507
A. Koelichen-Sudzilowska, J. Kwiatkowska, M. Beskid: Histochemiczna ocena mózgu szczura w toku skojarzonego stosowania etanolu z pirazolem . . . . .	519
Z. S. Herman, Z. Szczurek, C. Ważna-Boguńska, H. I. Trzeciak: Zmiany neuropatologiczne w mózgach szczurów po długotrwałym podawaniu neuroleptyków, oksazepamu i protryptyliny . . . . .	533
J. B. Zelman, D. Serokowa: Zmiany patomorfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym jako kryterium atenuacji wirusa wścieklizny pasażowanego na hodowli tkankowej . . . . .	547
M. Dąbska, B. Schmidt-Sidor: Rodzinna dziecięca glioneuronalna dystrofia gąbczasta . . . . .	563
D. Markiewicz, Z. Adamczewska-Gonczewicz, I. B. Zelman, J. Dymecki, J. Bieniasz: Przypadek leukodystrofii metachromatycznej o przewlekłym przebiegu (Badanie kliniczno-morfologiczno-biochemiczne) . . . . .	575
E. Tarnowska-Dzidusko: Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowatego w przewlekłym alkoholizmie . . . . .	587
K. Kucharska-Demczuk: Esteraza nieswoista komórek monocytarno-retikularnych płynu mózgowo-rdzeniowego w zapaleniach i podrażnieniach opon mózgowo-rdzeniowych . . . . .	599
Oceny . . . . .	472, 532

## СО Д Е Р Ж А Н И Е

Х. Крох, А. Люциани: Влияние этилнитрозомочевины, введенной трансплацентарно, на ультраструктуру мозга взрослой мыши. I. Нервная клетка . . . . .	449
Б. Гайковска, А. Данелевич, Е. Борович: Ультраструктура гипофизарно-гипоталамусной системы крысы, отравленной морфием в период развития . . . . .	461
А. Лоех, А. Данелевич, Е. Борович: электронно-микроскопическая картина нейросекреторной системы при осмотических нарушениях у крысы . . . . .	473
Д. Ситкевич, М. Сконечна, Е. Орловска, В. Бич: Влияние фосфоорганических инсектицидов на процессы окисления в митохондриях мозга крысы. Сравнительные исследования хлорфенвинфоса и его химических аналогов . . . . .	487
А. Дыдык, А. Пекарчык, Т. Шретер, Я. Прокопчык: Влияние нормобарической гипероксии на содержание гликогена в созревающем мозгу кролика . . . . .	497
М. Я. Моссаковски, Р. Гадамски: Нарушения мозгового микрокровообращения у монгольских хомяков ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) после односторонней перевязки общей сонной артерии . . . . .	507
А. Коелихен-Судзиловска, И. Квятковска, М. Бескид: Гистохимическая оценка мозга крысы в ходе совместного применения этанола и пиразола . . . . .	519
З. С. Герман, З. Щурек, Ц. Важна-Богуньска, Х. И. Тшечак: Нейропатологические изменения в мозгу крысы после длительного введения нейролептических средств, оксазепам и протриптилина . . . . .	533
И. Б. Зельман, Д. Серокова: Патоморфологические изменения в центральной нервной системе как критерий аттенуирования вируса бешенства, пассажированного на культуре ткани . . . . .	547
М. Домбска, Б. Шмидт-Сидор: Наследственная детская глионевральная губчатая дистрофия . . . . .	563
Д. Маркевич, З. Адамчевска-Гонцежевич, И. Б. Зельман, Е. Дымецки, Е. Беньш: Случай хронической метахроматической лейкодистрофии . . . . .	575
Е. Тарновска-Дзидушко: Инволюционный процесс коры гиппокампа и комплекса миндалевидного ядра при хроническом алкоголизме . . . . .	587
К. Кухарска-Демчук: Неспецифическая эстераза моноцитарно-ретикулярных клеток церебро-спинальной жидкости при воспалениях и раздражениях церебро-спинальных оболочек . . . . .	599
Рецензии . . . . .	472, 532



## CONTENTS

H. Kroh, A. Luciani: The effect of transplacental ethylnitrosourea on the fine structure of the adult mouse brain. I. Nerve cell . . . . .	449
B. Gajkowska, A. Danielewicz, J. Borowicz: Ultrastructure of hypophyseo-hypothalamic system of the rat treated with morphine during development . . . . .	461
A. Loesch, A. Danielewicz, J. Borowicz: Electron microscopic picture of neurosecretory system of the rat during osmotic disturbances . . . . .	473
D. Sitkiewicz, M. Skonieczna, E. Orłowska, W. Bicz: The effect of organophosphorus insecticides on the oxidative processes in rat brain mitochondria. Comparative studies of Chlorfenwinphos and its chemical analogs . . . . .	487
L. Dydyk, A. Piekarczyk, T. Szyreter, J. Prokopczyk: The effect of normobaric hyperoxia on the glycogen content in developing rabbit brain . . . . .	497
M. J. Mossakowski, R. Gadamski: Cerebral microcirculation disorders in mongolian gerbils ( <i>meriones unguiculatus</i> ) after unilateral common carotid artery ligation . . . . .	507
A. Koelichen-Sudzilowska, J. Kwiatkowska, M. Beskid: Histochemical evaluation of rat brain in the course of coupled ethanol-pyrazole administration . . . . .	519
Z. S. Herman, Z. Szczurek, C. Ważna-Boguńska, H. I. Trzeciak: Neuropathological changes in rats brain after long-term treatment with neuroleptics, oxazepam and protryptiline . . . . .	533
I. B. Zelman, D. Serokowa: Pathomorphological changes in the central nervous system as a criterion of attenuation of rabies virus strain . . . . .	547
M. Dąbska, B. Schmidt-Sidor: Familial infantile spongy glio-neuronal dystrophy (Progressive cerebral poliodystrophy) . . . . .	563
D. Markiewicz, Z. Adamczewska-Goncerzewicz, I. B. Zelman, J. Dymecki, J. Bieniasz: A case of metachromatic leukodystrophy with a chronic course (clinical-morphological-biochemical study) . . . . .	575
E. Tarnowska-Dziduszko: Involution process in ammonal cortex and amygdaloid complex in chronic alcoholism . . . . .	587
K. Kucharska-Demczuk: Nonspecific esterase in the monocytic-reticular cells of the cerebro-spinal fluid in meningitis and meningismus . . . . .	599
Books review . . . . .	472, 532

SPIS PRAC ZAMIESZCZONYCH W KWARTALNIKU  
NEUROPATHOLOGIA POLSKA TOM XVI — 1978 ROK

Adamczewska Z.: Myelin lipids in the developing rat brain . . . . .	11
Alexianu M., Macovei-Patrichi A., Petrovici A.: Ultrastructural alterations in the muscle in diabetic amyotrophy . . . . .	117
Arendt A.: Zur Klassifikation der Sarkome des Zentralnervensystems . . . . .	281
Beskid M., Koelichen A., Kwiatkowska J.: Ultrastrukturalna ocena komór- rek kory mózgowej szczura w toku skojarzonego stosowania etanolu z pirazolem . . . . .	361
Borowska-Lechman J., Nyka W.: Przewlekła białaczka szpikowa o obrazie kliniczno-morfologicznym <i>polyganglioradiculoneuritis</i> . . . . .	135
Borowska-Lehman J., Kopacka B., Kuklińska D.: Zmiany morfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym u myszy szczepionych zawiesiną <i>bor- detella petrusis</i> . . . . .	317
Broniszewska-Ardelt B.: Regulacja aktywności glikolitycznej mózgu pod- czas niedotlenienia . . . . .	437
Chmielewski H., Mądry K., Cukrowska H., Maciejek Z.: Zaburzenia rów- nowagi kwasowo-zasadowej krwi i płynu mózgowo-rdzeniowego u chorych ze stwardnieniem rozsianym . . . . .	233
Dąbska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelina- tion of some structures of rabbit brain . . . . .	203
Dąbska M., Schmidt-Sidor B.: Familial infantile spongy glio-neuronal dys- trophy (progressive cerebral poliodystrophy) . . . . .	563
Dydyk L., Piekarczyk A., Szreter T., Prokopczyk J.: Wpływ normobarycznej hiperoksji na zawartość glikogenu w dojrzewającym mózgu królika . . . . .	497
Gadamski R.: Obraz włókien adrenergicznych w oponie miękkiej szczura i chomika mongolskiego w niedotlenieniu hipoksyjnym, niedokrwie- niu i odnerwieniu . . . . .	385
Gadamski R., Szumańska G., Borkowski M., Wesołowski J., Ratyński B.: Zmiany aktywności acetylocholinesterazy w rdzeniu kręgowym psów po czasowym zaciśnięciu aorty piersiowej . . . . .	191
Gajkowska B., Danielewicz A., Borowicz W.: Ultrastruktura układu pod- wzróżowo-przysadkowego szczura zatrawanego morfiną w okresie rozwoju . . . . .	461
Hager H., Metz R.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Regeneration markhaltiger Nervenfasern in autologen und homologen Nerventransplantaten . . . . .	37
Herman Z. S., Szczurek Z., Ważna-Boguńska C., Trzeciak H. I.: Zmiany neuropatologiczne w mózgach szczurów po długotrwałym podawaniu neuroleptyków, oksazepamu i protryptyliny . . . . .	533
Holzhausen H. J.: Elektronenmikroskopische Befunde bei Tierexperimen- tellen Nerventumoren der Ratte . . . . .	259
Jedrzejska-Iwanowska A., Gabryelewicz M. B.: Morfologiczny obraz mózgu w zawałach mięśnia serca . . . . .	181
Jędrzejewska-Iwanowska A., Gabryelewicz M. B., Niedek T., Puławska G.: Postać mózgowa <i>lupus erythematoses disseminatus</i> . Opis przypadku . . . . .	431
Jędrzejewska H.: Rodzaje demielinizacji występujące w nerwach obwodo- wych w polineuropatiach . . . . .	97



Koelichen-Sudzilowska A., Kwiatkowska J., Beskid M.: Histochemiczna ocena mózgu szczura w toku skojarzonego stosowania etanolu z pirazolem	519
Kozik M. B., Wojciechowski K., Wigowska-Sowińska J.: Przepuklina oponowa o niezwykłych rozmiarach	143
Kraśnicka Z., Przybylski A.: Poanoksyjne zmiany potencjału spoczynkowego komórek nerwowych i osłonkowych ze zwojów kręgowych hodowanych <i>in vitro</i>	65
Kroh H., Luciani A.: The effect of transplacental ethylnitrosourea on the fine structure of adult mouse brain. I. Nerve cell	449
Kucharska-Demczuk K.: Esteraza nieswoista komórek monocytarno-retikularnych płynu mózgowo-rdzeniowego w zapaleniach i podrażnieniach opon mózgowo-rdzeniowych	599
Kulczycki J., Majdecki T.: Die akut verlaufende Panencephalitis	413
Lehman J.: Zur Klinik und Pathologie der myatrophischen Lateralsklerose	127
Lessel W., Dietzmann K.: Untersuchungen am monoaminergen Bluthirnschrankenmechanismus mit der Falck-Hillarp- und der Glyoxylsäuremethode. Ein Methodenvergleich	375
Loesch A., Danielewicz A., Borowicz J.: Obraz mikroskopowo-elektronowy układu neurosekrecyjnego w zaburzeniach osmotycznych u szczura	473
Łazarewicz J.: Wapń — transport i rola w metabolizmie komórek mózgu	285
Majtényi K.: A female case of Marchiafava-Bignami syndrome	241
Markiewicz D., Dymecki J.: Dynamika zmian morfologicznych w mózgu myszy z padaczką audiogenną po wywołanych doświadczalnie napadach drgawkowych	73
Markiewicz D., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Zelman I. B., Dymecki J., Bieniasz J.: A case of metachromatic leukodystrophy with a chronic course (clinical-morphological-biochemical study)	575
Maślińska D., Thomas E.: Histochemical study of myelin degeneration in the sciatic nerve severed by coagulation	45
Mossakowski M. J.: Morfologia i histochemia uszkodzeń gleju wywołanych cyjankiem sodu w hodowli tkankowej	53
Mossakowski M. J., Gadamski R.: Zaburzenia mikrokrążenia mózgowego u chomików mongolskich ( <i>Meriones unguiculatus</i> ) po jednostronnym podwiązaniu tętnicy szyjnej wspólnej	507
Mossakowski M. J., Ostenda M., Pronaszko-Kurczyńska A.: Obraz mikroskopowo-elektronowy naczyń włosowatych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej	327
Osetowska E., Kozyrka A., Afek-Kamińska M.: Procesy zapalne „neuronobójcze” i neuronotropowe	305
Rap Z. M.: Morfologiczna ocena funkcji podwzgórzowo-przysadkowego układu neurosekrecyjnego w nadciśnieniu wewnątrzczaszkowym	293
Renkawek K.: A case of panencephalitis with extensive degenerative changes	421
Schreiber D., Jänisch W., Zimmermann K.: Die Frequenz von Metastasen im Zentralnervensystem (ZNS) in Abhängigkeit von Tumorarten und Lebensalter	269
Sitkiewicz D., Skonieczna M., Orłowska E., Bicz W.: The effect of organophosphorus insecticides on the oxidative processes in rat brain mitochondria. Comparative studies of Chlorfenvinphos and its chemical analogs	487
Szczech J.: Mielinizacja układu limbicznego w rozwoju ontogenetycznym szczura	25
Szczech J.: Zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w korze amonalnej szczura w przebiegu zatrucia octanem fenylortęciowym	347
Szydłowska H., Śmiałek M., Sikorska M.: Wpływ kwasu tioktanowego i pirofosforanu tiaminy na zawartość glikogenu i aktywność $\alpha$ -4-glukozylotransferazy UDPglukoza—glikogen w mózgu szczura po zatruciu tlenkiem węgla	173
Tarnowska-Dziduszko E.: Proces inwolucyjny kory amonalnej i ugrupowań jądra migdałowatego w przewlekłym alkoholizmie	587
Tarnowska-Dziduszko E., Kahl-Kunstetter J.: Przypadek bąblowca o niezwykłym przebiegu klinicznym i obrazie morfologicznym	249

Tarnowska-Dziduszko E., Markiewicz D., Szemis L.: Morfologia śródmiażdżowych naczyń krwionośnych mózgu w przewlekłym alkoholizmie . . .	399
Wender M., Kozik M. B.: Enzyme histochemistry of the neuroglia in demyelinating diseases . . .	211
Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy . . .	153
Wender M., Petrescu A., Filipek-Wender H., Stanisławska J.: Cholesteryl esters in demyelinating lesions in the light of histochemical and biochemical correlations . . .	83
Wender M., Piechowski A., Sędzik J., Mularek O., Talkowska D.: Myelin proteins after transplacental intoxication with ethylnitrosourea . . .	339
Wender M., Stanisławska J., Filipek-Wender H.: Cerebral cholesteryl esters in cyanide encephalopathy . . .	163
Zelman I. B., Serokowa D.: Zmiany patomorfologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym jako kryterium atenuacji wirusa wścieklizny pasażowanego na hodowli tkankowej . . .	547
Zgorzalewicz B., Neuhoff V., Waehneltd T. V.: Protein composition of peripheral myelin during ontogenesis of the rat . . .	1
Zhabotinsky J. M., Konovalov H. V., Fedorova L. A., Chumàsov E. I.: Some fundamental questions of morpho- and pathogenesis of demyelinating diseases of the nervous system . . .	219



## ALFABETYCZNY SPIS AUTORÓW

- Adamczewska-Goncerzewicz Z. 11, 153, 575  
 Afek-Kamińska M. 305  
 Alexianu M. 117  
 Arendt A. 281  
  
 Beskid M. 361, 519  
 Bicz W. 487  
 Bieniasz J. 575  
 Borkowski M. 191  
 Borowicz J. 461, 473  
 Borowska-Lehman J. 135, 317  
 Broniszewska-Ardelt B. 437  
  
 Chmielewski H. 233  
 Chumàsov E. I. 219  
 Cukrowska H. 233  
  
 Danielewicz-Kotowicz A. 203, 461, 473  
 Dąbska M. 203, 563  
 Dietzmann K. 375  
 Dydyk L. 497  
 Dymecki J. 73, 575  
  
 Fedorova L. A. 219  
 Filipek-Wender H. 83, 163  
  
 Gabryelewicz M. B. 181, 431  
 Gadamski R. 191, 385, 507  
 Gajkowska B. 461  
  
 Hager H. 37  
 Herman Z. S. 533  
 Holzhausen H. J. 259  
  
 Jänisch W. 269  
 Jędrzejewska-Iwanowska A. 181, 431  
 Jędrzejowska H. 97  
  
 Kahl-Kunstetter J. 249  
 Koelichen-Sudzilowska A. 361, 519  
 Konowałow H. V. 219  
 Kopacka B. 317  
 Kozik M. B. 143, 211  
 Kozyska A. 305  
 Kraśnicka Z. 65  
 Kroch H. 449  
 Kucharska-Demczuk K. 599  
 Kuklińska D. 317  
 Kulczycki J. 413  
 Kwiatkowska J. 361, 519  
  
 Lehmann J. 127  
 Lessel W. 375  
 Loesch A. 473  
 Luciani A. 449  
  
 Łazarewicz J. 285  
  
 Maciejek Z. 233  
 Macovei-Patrichi A. 117  
 Majdecki T. 413  
 Majtényi K. 241  
  
 Markiewicz D. 73, 399, 575  
 Maślińska D. 45  
 Mądry K. 233  
 Metz R. 37  
 Mossakowski M. J. 53, 327, 507  
 Mularek O. 339  
  
 Neuhoff V. 1  
 Niedek T. 431  
 Nyka W. 135  
  
 Orłowska E. 487  
 Osetowska E. 305  
 Ostenda M. 327  
  
 Pankrac J. 153  
 Petrescu A. 83  
 Petrovici A. 117  
 Piechowski A. 399  
 Piekarczyk A. 497  
 Prokopczyk A. 497  
 Pronaszko-Kurczyńska A. 327  
 Przybylski A. 65  
  
 Rap Z. M. 293  
 Ratyński B. 191  
 Renkawek K. 421  
  
 Schmidt-Sidor B. 563  
 Schreiber D. 269  
 Serokowa D. 547  
 Sędzik J. 339  
 Sikorska M. 173  
 Sitkiewicz D. 487  
 Skonieczna M. 487  
 Stanisławska J. 83, 163  
 Szczech J. 25, 347  
 Szczurek Z. 533  
 Szemis L. 399  
 Szreter T. 497  
 Szumańska G. 191  
 Szydłowska H. 173  
  
 Śmiałek M. 173  
  
 Talkowska D. 339  
 Tarnowska-Dziduszko E. 249, 399, 587  
 Thomas E. 45  
 Trzeciak H. I. 533  
  
 Waehneltd T. V. 1  
 Wajgt A. 153  
 Ważna-Boguńska C. 533  
 Wender M. 83, 153, 163, 211, 339  
 Wesolowski J. 191  
 Wigowska-Sowińska J. 143  
 Wojciechowski K. 143  
  
 Zelman I. B. 547, 575  
 Zgorzalewicz B. 1  
 Zhabotiński J. M. 219  
  
 Zimmermann K. 269



#### 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, 00-953 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**