

ISSN 0028-3894

EQZ 2

STOWARZYSZENIE NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

R. 105

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM XIX

1981

ZESZ. 2

WARSZAWA

725,-

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

Tom XIX

KWIECIEŃ—CZERWIEC

Nr 2

KOMITET REDAKCYJNY

Jolanta Borowska-Lehman, Maria Dąbbska, Jerzy Dymecki, Andrzej Gonczycki, Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Tadeusz Majdecki, Mirosław J. Mossakowski, Janina Rafałowska, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: *Mirosław J. Mossakowski*

Sekretarz Redakcji: *Halina Weinrauder*

ADRES REDAKCJI

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

Wydawca

PAŃSTWOWY ZAKŁAD WYDAWNICTW LEKARSKICH



ANDRZEJ LOESCH

ZIO-IMPREGNATED BOUTONS IN NEUROPILE OF SUPRAOPTIC AND PARAVENTRICULAR NUCLEI OF THE RAT

Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish
Academy of Sciences, Warszawa
Head: Prof. J. W. Borowicz

One of the best known neuroendocrine systems in the mammals is the hypothalamo-neurohypophyseal neurosecretory tract. Its neurones, situated in the supraoptic and paraventricular hypothalamic nuclei, take part in the synthesis, transport and release of the hormones: vasopressin and oxytocin (Bargmann, Scharrer, 1951).

The activity of secretory neurones of the supraoptic and paraventricular nuclei is mediated either by chemical substances in the vascular system or by some neuronal centres of the C.N.S. (Schadé, 1970). Synaptic terminals penetrating into these nuclei release neurotransmitters which, like chemical substances circulating with the blood, may exert a stimulatory or inhibitory effect on the secretory neurones. Oshima and Gorbman (1969) and Scharrer (1972) have expressed the opinion that these synaptic terminals control the processes related to the excretion of neurohormones rather than their synthesis. Nevertheless, the fact is known that the supraoptic nucleus is reasonably homogeneous with respect to the neurones, while paraventricular nucleus is certainly not, as it contains numerous non-secretory neurones including parvicellular neurones (Clementi, Ceccarelli, 1970). Therefore, the input of neuron pathways controlling the specific neurones is rather complicated and difficult to estimate. However, axo-dendritic, axo-somatic and axo-axonic contacts were morphologically identified in these nuclei (Polenov, Senchik, 1966; Eneström, 1967; Rechartd, 1969; Korfmeier, 1970; Clementi, Ceccarelli, 1970; Morris, 1974).

Histochemical data indicate that AChE (which is one of the chemical components typical for cholinergic fibres) is present in the rat, in moderate concentrations, in supraoptic and paraventricular neurones and their axons, and in the adjacent presynaptic fibres (Koelle, 1954). Electron microscopic

observations of AChE-positive fibres round the secretory neurones of supraoptic nucleus in the rat (Rechardt, 1969) also suggest that at least some neurosecretory cells are innervated by cholinergic fibres. By means of fluorescent methods in both these hypothalamic nuclei an abundant amount of noradrenergic fibres has been detected (Carlsson et al., 1962; Fuxe, 1965; Fuxe, Hökfelt, 1967). According to Fuxe and Hökfelt (1970) this indicates that their role in controlling the release of vasopressin and oxytocin is significant. In both hypothalamic nuclei of the rat, besides ACh and NA, such compounds as: dopamine, 5-hydroxytryptamine and histamine have also been found (Brownstein et al., 1974; Brownstein, 1975). However, according to Fuxe and Hökfelt (1967), dopaminergic and serotonergic endings are not demonstrable by the fluorescence technique. Moreover, Fujimoto (1977) postulates that angiotensin II and glutamic acid might also play role of neurotransmitters involved in the release of vasopressin. This author also suggests that prostaglandin E₂, which is an important chemical component in the central regulation of water balance may, at the same time, act as a neurotransmitter, influencing the secretory neurones. The presence of the P substance in the hypothalamus may be of similar significance (Elde, Hökfelt, 1978). Thus it can be concluded that at least a few kinds of neurotransmitters may affect the hypothalamic secretory neurones and are involved in their synaptic control. It has been understood, however, that the activity of these neurones is essentially determined by the balance of cholinergic (excitatory) and noradrenergic (inhibitory) synaptic input (Mcoss et al., 1972).

According to general observations of Uchizono (1975) the nervous activities may be correlated with the activities of the synapses. A correlation between the structure and function of synapses has been suggested, in that the synapses which contain clear spheroid synaptic vesicles (S-type bouton) are excitatory, while the synapses which contain clear flattened vesicles (F-type bouton) are inhibitory in nature.

In the hypothalamo-neurohypophyseal system the S and F type boutons were found in frog, toad and rabbit (Uchizono, Sakai, 1970; Uchizono, 1975) and also in rat, in the supraoptic and paraventricular nuclei (Loesch, 1980).

In the present paper the results of the study on ZIO-impregnated presynaptic boutons in the neuropile of supraoptic and paraventricular nuclei are presented with special consideration given to the S-type boutons, containing spheroid synaptic vesicles.

MATERIAL AND METHODS

The investigations of 14 Wistar female rats, 3 months old, were confined to the boutons in supraoptic and paraventricular nuclei. Both these nuclei were fixed after decapitation of animals. Two fixation methods were used:

1. Conventional fixation (Glut.). The specimens from 7 rats were placed in 2,5% glutaraldehyde in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) for 2 h at 4° C, and they were subsequently postfixed in 1% OsO₄ in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) for 1 h at 4° C. Ethanol was used for dehydration. The specimens were embedded in Epon.

2. Fixation for zinc-iodide-osmium impregnation (ZIO). The specimens from 7 rats were placed in 4% paraformaldehyde in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.4) for 20 min. The specimens were then rinsed in stock buffer and placed in 6.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) for 2 h. Double fixation was continued at 4° C. After fixation the specimens were washed three times for 5 min. in Tris buffer solution (pH 6.2) which consisted of the following components: 3.3 g NaCl, 0.06 g CaCl₂, 0.03 g Mg Cl₂.6 H₂O, 0.605 g "Trizma-Base" tris (hydroxymethyl)aminomethane (Sigma Chemical Co.) and 100 ml distilled water. The specimens were then incubated for 16 h at 4° C, in ZIO mixture prepared according to Kawana et al. (1969). After incubation the specimens were rinsed in Tris buffer solution and next they were dehydrated in ethanol and embedded in Epon.

In both methods the ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and subsequently examined in JEM-7A electron microscope.

Measurements

The quantitative analysis was performed on sectioned profiles of the ZIO-impregnated boutons, containing spheroid synaptic vesicles in supraoptic and paraventricular nuclei. The series of random pictures were taken at different levels of the specimens, at magnification of 18.000 and, in order to obtain the micrographs, they were further magnified three times. This was made in order to estimate the areas of sectioned profiles of boutons as well as the total number of spheroid synaptic vesicles and the relative number (%) of ZIO-positive vesicles, per bouton area; the areas of boutons in sections were measured using planimeter. These variables were compared between the supraoptic and paraventricular nuclei by means of the Chi² test.

RESULTS

General features of boutons

The axon boutons, in both supraoptic and paraventricular nuclei contain mainly clear synaptic vesicles (Fig. 1) but some of them — also a few dense-cored vesicles (Fig. 2). They correspond to chemical synapses, which are characterised by a typical pattern of pre- and post-synaptic components, separated by the 20—30 nm synaptic cleft (Figs 3, 4). Two types of these

boutons have been identified here, according to the shape of clear synaptic vesicles: the S-type containing spheroid vesicles of 40–50 nm and F-type containing flattened vesicles of 60×30 nm (Fig. 5). Both these types occur on the dendrite (Fig. 5) as well as on the perikaryon of secretory neurones (Figs. 1, 6).

After ZIO treatment, the product of reaction have been encountered in spheroid and flattened vesicles in boutons of S and F type, respectively (Figs 7, 8). The size of impregnated vesicles in S-type boutons remains, on the average, the same as after the conventional fixation (Fig. 9), although in the F-type, some vesicles of an extremely flat discs appearance, of 90×20 nm can occasionally be found (Fig. 10).

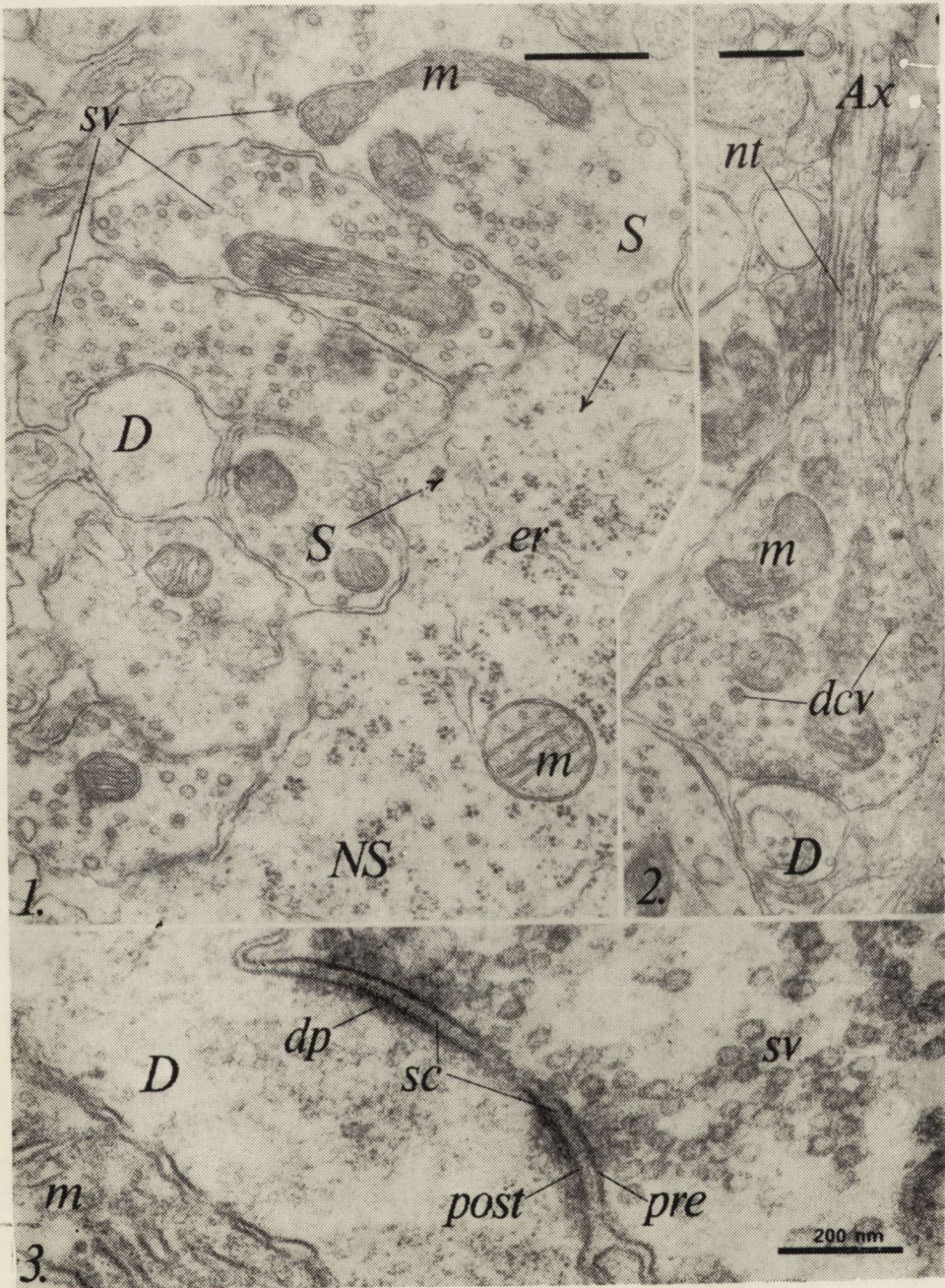
ZIO-impregnated boutons in supraoptic nucleus. Numerous axodendritic synapses represented mainly by the S-type boutons are shown in Figs 11–14. Moreover, the S and F type boutons synapsing on the surface of perikaryon of the secretory neurones are exemplified by Figs 15 and 16.

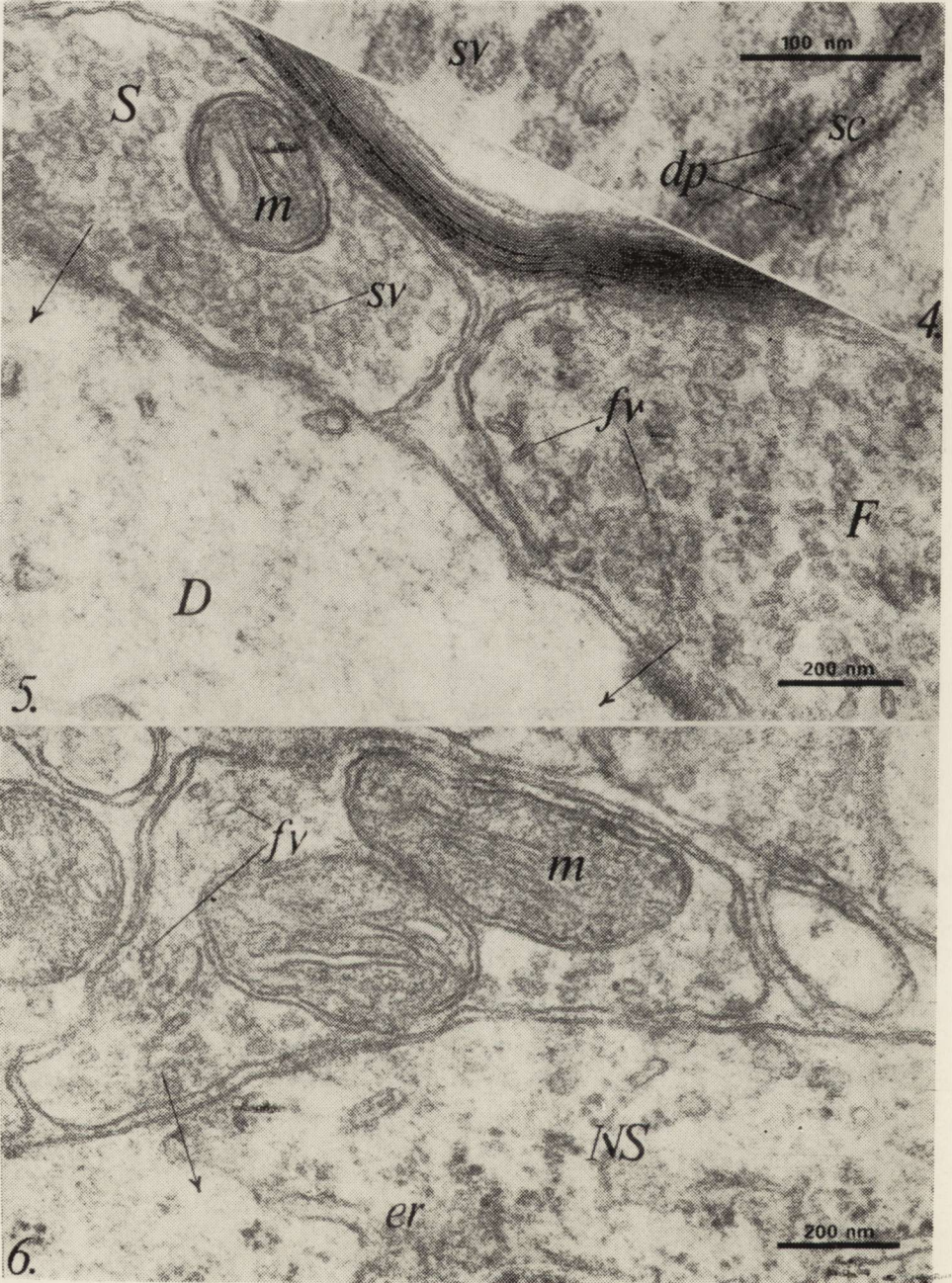
ZIO-impregnated boutons in paraventricular nucleus. Like in the supraoptic nucleus, the S and F type boutons have been found on the surface of perikaryon of the secretory neurones, as shown in Figs 17 and 18. In this nucleus several F-type boutons adjacent to the axons containing spheroid synaptic vesicles have also been encountered (Fig. 19). Numerous axodendritic synapses formed by S-type boutons are exemplified by Figs 20 and 21. An example of the bouton which contain ZIO-positive flattened synaptic vesicles and ZIO-negative dense-cored vesicles is presented in Fig. 22.

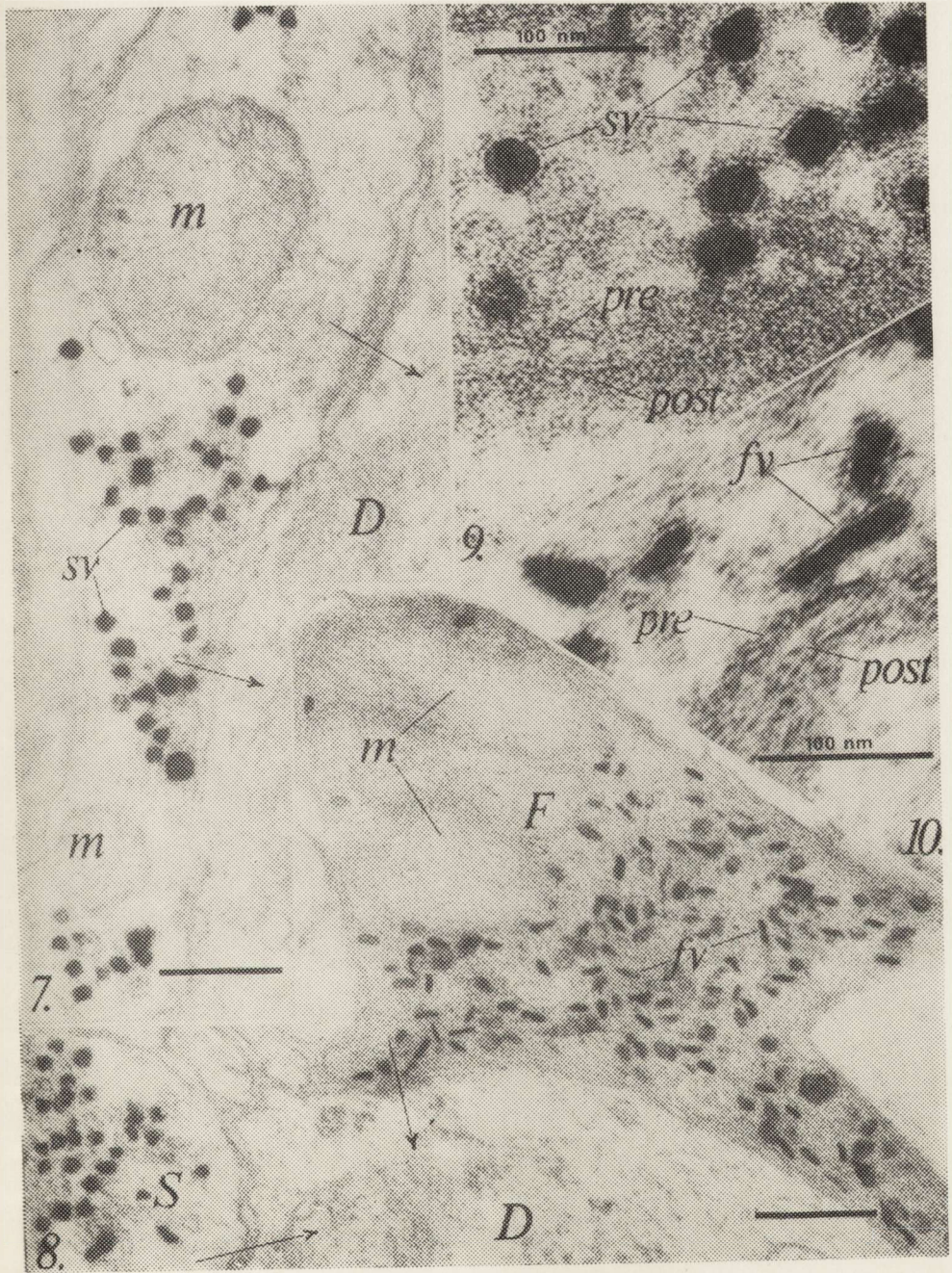
Measurements

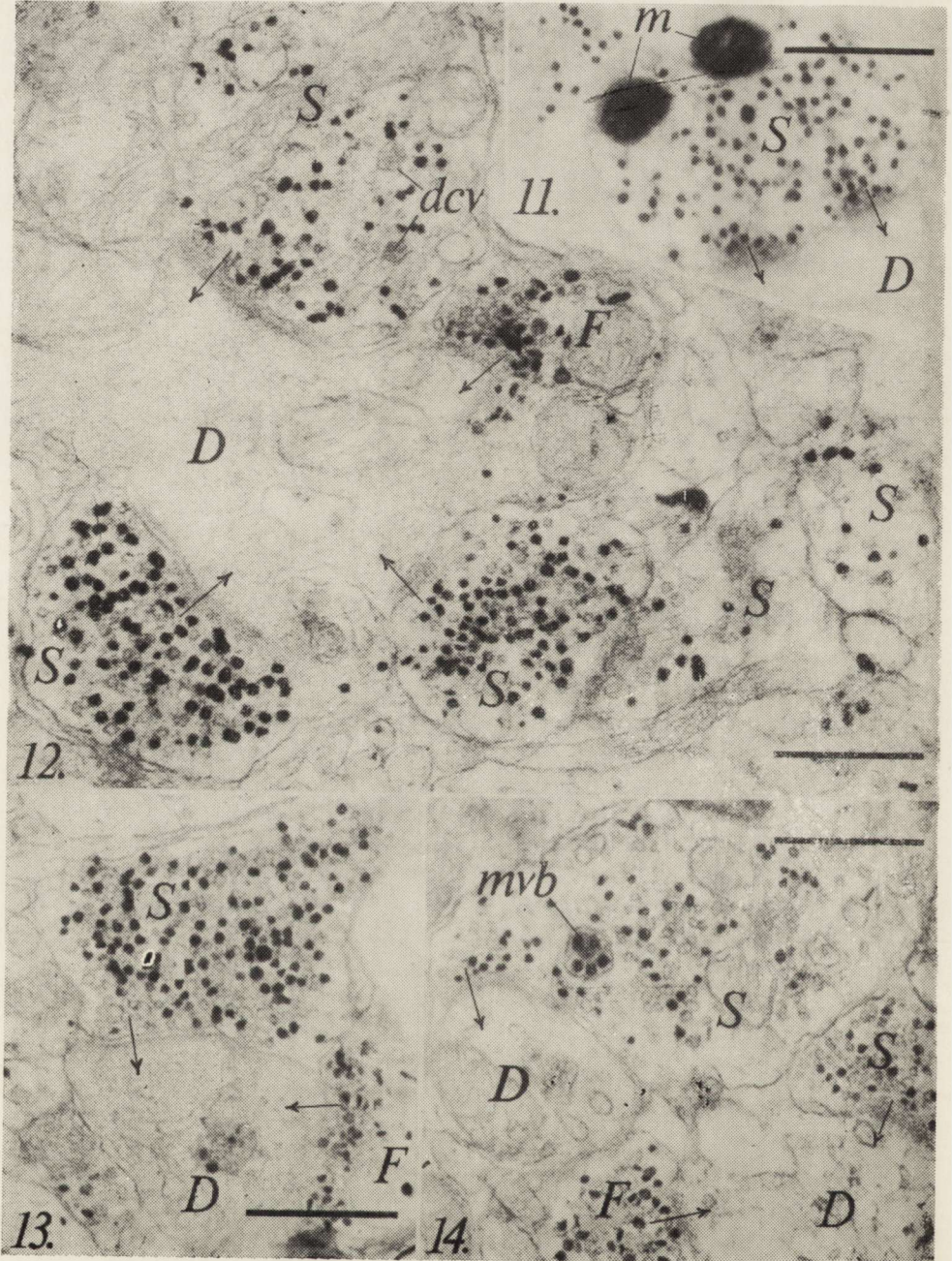
Some of the results of morphometric analysis are presented in a diagrammatic form; while the results of statistical comparison are summarized in Table 1.

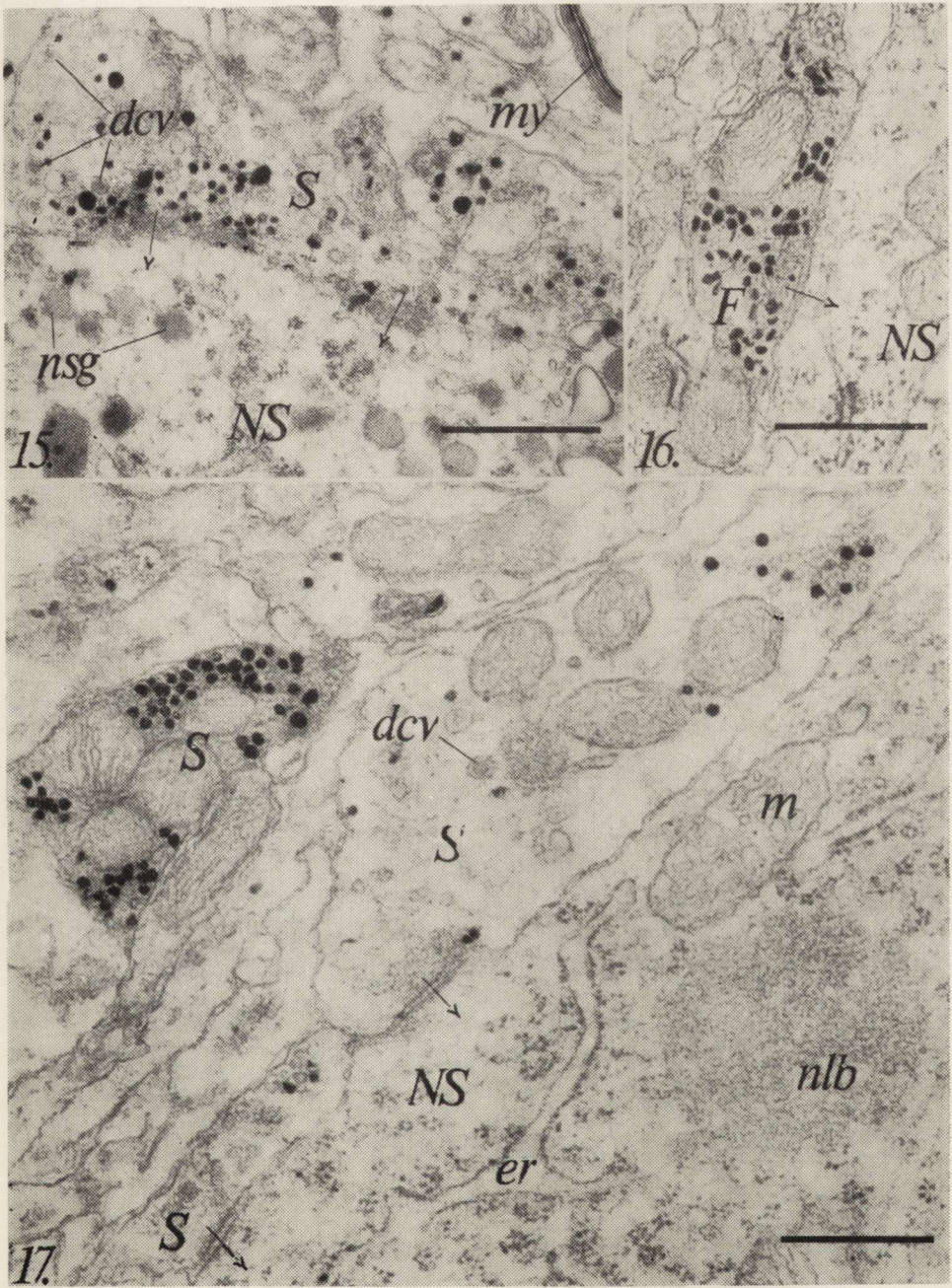
Comparison between boutons of the S-type in supraoptic and paraventricular nuclei with respect to the areas of their profiles, as well as the total number of spheroid synaptic vesicles and relative number (%) of ZIO-positive vesicles, per bouton area, revealed no significant differences (Table 1). The relationship between the bouton area and the total number of spheroid synaptic vesicles is diagrammatically presented in Fig. 23; the supraoptic and paraventricular nuclei are similar in this respect. At the same time, it is evident from Fig. 24 that there is no close relationship between the bouton area and the relative number (%) of ZIO-positive vesicles, in either supraoptic or paraventricular nucleus. The interrelationship between the frequency of occurrence of S-type boutons and the relative number (%) of ZIO-positive synaptic vesicles in both nuclei is diagrammatically presented in Fig. 25. Although the shape of either of those two distributions is not appreciably different from normality, they slightly differ from one another.

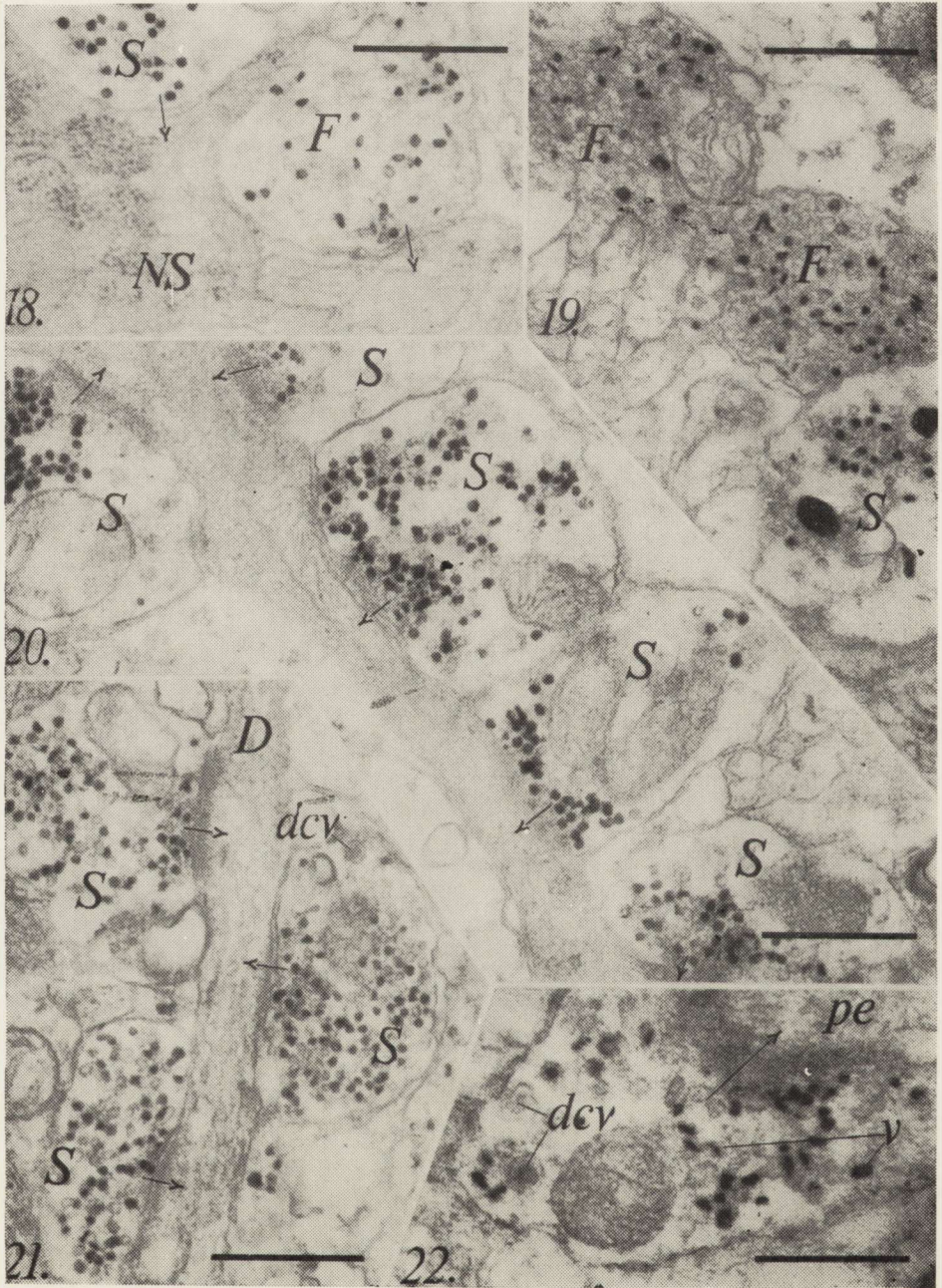












FIGURES

Fig. 1. The axons containing clear synaptic vesicles (sv); two boutons (S) synapsing (arrows) on surface of secretory neuron (NS); D — dendrite, m — mitochondria, er — granular endoplasmic reticulum. Glut. Scale bar: 0,5 μ m.

Ryc. 1. Aksony zawierające jasne pęcherzyki synaptyczne (sv); dwie kolbki (S) tworzą synapsy na powierzchni neuronu sekretoryjnego (NS); m — mitochondria, er — ziarnista siateczka śródplazmatyczna. Glut. Linia podziałki: 0,5 μ m.

Fig. 2. An axon (Ax) boutonning on spine dendrite (D) which contains clear and dense-cored (dev) vesicles; m — mitochondria, nt — neurotubules. Glut. Scale bar: 0.5 μ m.

Ryc. 2. Akson (Ax) tworzący kolbkę na koleku dendrytu (D) zawiera pęcherzyki jasne i z gęstym rdzeniem (dev); m — mitochondria, nt — neurotubule. Glut. Linia podziałki: 0,5 μ m.

Fig. 3. Fragment of synaptic contact presenting presynaptic (pre) and postsynaptic (post) membranes, synaptic cleft (sc) and dense projection (dp); sv — synaptic vesicles, m — mitochondrion, pe — postsynaptic element. Glut. Scale bar: 0.2 μ m.

Ryc. 3. Fragment kontaktu synaptycznego przedstawia błonę presynaptyczną (pre) i postsynaptyczną (post), szczelinę synaptyczną (sc) i gęstą projekcję (dp); sv — pęcherzyki synaptyczne, m — mitochondrium, pe — element postsynaptyczny. Glut. Linia podziałki 0,2 μ m

Fig. 4. Fragment of synaptic contact demonstrating pre- and postsynaptic dense projection (dp) separated by synaptic cleft (sc); sv — synaptic vesicles. Glut. Scale bar: 100 nm.

Ryc. 4. Fragment kontaktu synaptycznego przedstawia pre- i postsynaptyczną gęstą projekcję (dp) oddzieloną szczeliną synaptyczną (sc); sv — pęcherzyki synaptyczne. Glut. Linia podziałki: 100 nm.

Fig. 5. S-type (S) and F-type (F) boutons containing spheroid (sv) and flattened (fv) vesicles, respectively, synapsing on dendrite (D); m — mitochondrion. Glut. Scale bar: 0.2 μ m.

Ryc. 5. Kolbki typu S (S) i typu F (F) zawierające odpowiednio, okrągłe (sv) i spłaszczone (fv) pęcherzyki, tworzą synapsy na dendrycie (D); m — mitochondrium. Glut. Linia podziałki: 0,2 μ m.

Fig. 6. F-type bouton synapsing on surface of secretory neuron (NS); fv — flattened synaptic vesicles, m — mitochondria, er — granular endoplasmic reticulum. Glut. Scale bar: 0.2 μ m.

Ryc. 6. Kolbka synaptyczna typu F na powierzchni neuronu sekretoryjnego (NS); fv — spłaszczone pęcherzyki synaptyczne, m — mitochondria, er — ziarnista siateczka śródplazmatyczna. Glut. Linia podziałki: 0,2 μ m.

Fig. 7. ZIO-positive spheroid synaptic vesicles (sv) within S-type bouton synapsing on dendrite (D); m — mitochondria. ZIO. Scale bar: 0.2 μ m.

Ryc. 7. ZIO-dodatnie okrągłe pęcherzyki synaptyczne (sv) w obrębie kolbki typu S tworzące synapsę z dendrytem (D); m — mitochondria. ZIO. Linia podziałki: 0.2 μ m.

Fig. 8. F-type (F) and S-type (S) boutons synapsing on dendrite (D); fv — ZIO-positive flattened synaptic vesicles, m — mitochondria. ZIO. Scale bar: 0.2 μ m.

Ryc. 8. Kolbki typu-F (F) i typu-S (S) tworzące synapsy na dendrycie (D); fv — ZIO-dodatnie spłaszczone pęcherzyki synaptyczne, m — mitochondria. ZIO. Linia podziałki: 0,2 μ m.

Fig. 9. Fragment of S-type synapse demonstrating ZIO-positive spheroid synaptic vesicles (sv) and presynaptic (pre) and postsynaptic (post) membranes. ZIO. Scale bar: 100 nm.

Ryc. 9. Fragment synapsy typu-S przedstawia ZIO-dodatnie okrągłe pęcherzyki synaptyczne (sv) i błonę presynaptyczną (pre) oraz postsynaptyczną (post). ZIO. Linia podziałki: 100 nm.

Fig. 10. Fragment of F-type synapse; fv — ZIO-positive flattened synaptic vesicles, pre — presynaptic membrane, post — postsynaptic membrane. ZIO. Scale bar: 100 nm.

Ryc. 10. Fragment synapsy typu-F; fv — ZIO-dodatnie spłaszczone pęcherzyki synaptyczne, pre — błona presynaptyczna, post — błona postsynaptyczna. ZIO. Linia podziałki. 100 nm.

Fig. 11. S-type bouton synapsing on dendrite (D); m — impregnated mitochondria. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Rys. 11. Kolbka synaptyczna typu S na dendrycie (D); m — impregnowane mitochondria. ZIO. Linia podziałki 0,5 μm .

Fig. 12. A few S-type boutons (S) and one F-type (F); some of them synapsing on dendrite (D); dev — dense-cored vesicles. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 12. Kilka kolbek typu S (S) i jedna typu F (F); niektóre z nich tworzą synapsy na dendrycie (D); dev — pęcherzyki z gęstym rdzeniem. ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 13. On dendrite (D) S and F type boutons. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 13. Na dendrycie (D) kolbki typu S i F. ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 14. S and F type boutons synapsing on dendrites (D); mvb — ZIO-positive multivesicular body. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 14. Kolbki synaptyczne typu S i F na dendrytach (D); mvb — ZIO-dodatnie ciało wielopęcherzykowe. Linia podziałki 0,5 μm .

Fig. 15. S type bouton synapsing on surface of secretory neuron (NS); dev — dense-cored vesicles, nsg — neurosecretory granules, my — impregnated myelin sheath. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 15. Kolbka synaptyczna typu S na powierzchni neuronu sekrecyjnego (NS); dev — pęcherzyki z gęstym rdzeniem, nsg — ziarnistości neurosekrecyjne, my — impregnowana osłonka mielinowa. ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 16. F type bouton synapsing on surface of secretory neuron (NS). ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 16. Kolbka synaptyczna typu F na powierzchni neuronu sekrecyjnego (NS). ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 17. S type boutons; two of them synapsing on surface of secretory neuron (NS); dev — dense-cored vesicles, m — mitochondria, er — granular endoplasmic reticulum, nlb — nucleolus-like body. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 17. Kolbki typu S; dwie z nich tworzą synapsy na powierzchni neuronu sekrecyjnego (NS); dev — pęcherzyki z gęstym rdzeniem, m — mitochondria, er — ziarnista siateczka śródplazmatyczna, nlb — ciało jąderkopodobne. ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 18. S type and F type boutons synapsing on surface of secretory neuron (NS). ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 18. Kolbki synaptyczne typu S i F na powierzchni neuronu sekrecyjnego (NS). ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 19. F type bouton (F) containing flattened vesicles, lying adjacent to the axon (S) which contain spheroid vesicles. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 19. Kolbka typu F (F) zawierająca spłaszczone pęcherzyki, przylega do aksonu (S), który posiada pęcherzyki okrągłe. ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 20. Numerous S type boutons synapsing on dendrite (D). ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 20. Liczne kolbki synaptyczne typu S na dendrycie (D). ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 21. Boutons of S type synapsing on dendrite (D). ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 21. Kolbki typu S tworzące synapsy na dendrycie (D). ZIO. Linia podziałki: 0,5 μm .

Fig. 22. Within the F type bouton ZIO-positive flattened vesicles (fv) and ZIO-negative dense-cored vesicles; pe — postsynaptic element. ZIO. Scale bar: 0.5 μm .

Ryc. 22. W obrębie kolbki typu F ZIO-dodatnie spłaszczone pęcherzyki i ZIO-ujemne pęcherzyki z gęstym rdzeniem; pe — element postsynaptyczny. ZIO. Linia podziałki 0,5 μm .

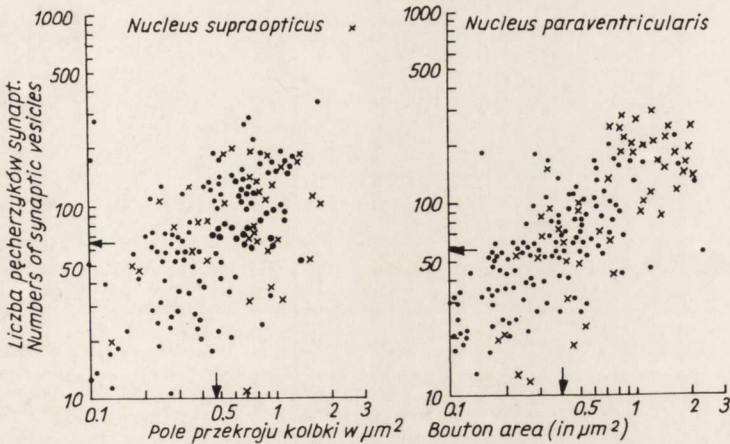


Fig. 23. Scatter of the points in both diagrams indicates association between the area of the S-type bouton profiles and the total number of spheroid synaptic vesicles (amount ZIO-positive and ZIO-negative); dots represent the values for boutons which contain only spheroid vesicles, and crosses — the values for boutons additionally contain dense-cored vesicles. Arrows point to the positions of the median.

Ryc. 23. Rozkład punktów w obu diagramach wskazuje na związek pomiędzy polem profilu kolbki typu S i ogólną liczbą okrągłych pęcherzyków synaptycznych (suma ZIO-dodatnich i ZIO-ujemnych); kropki reprezentują wartości dla kolbek, które zawierają okrągłe pęcherzyki, natomiast krzyżyki — wartości dla kolbek, które dodatkowo zawierają pęcherzyki z gęstym rdzeniem. Strzałki wskazują pozycję mediany.

Table 1. Comparative evaluation of the S-type boutons in neuropile of supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei

Tabela 1. Porównawcza ocena kolbek synaptycznych typu-S w neuropilu jądra nadwzrokowego (SON) i przykomorowego (PVN)

Variables Zmienne	Nucleus Jądro	n	Me	Ra	Chi ²	p <
Bouton area in μm ²	SON	176	0,47	0,02—2,60	1,773	0,250
Powierzchnia przekroju kolbki w μm ²	PVN	194	0,39	0,03—2,34		
Total No. of spheroid vesicles per bouton area	SON	176	67	2—770	1,262	0,500
Ogólna liczba okrągłych pęcherzyków w polu przekroju kolbki	PVN	194	57	2—257		
% of ZIO-positive vesicles per bouton area	SON	176	41,1	5,1—98,2	1,831	0,250
% ZIO-dodatnich pęcherzyków w polu przekroju kolbki	PVN	194	40,0	11,1—81,8		

n — number of observations
liczba obserwacji

Chi² — result of statistical calculation
oszacowanie wartości pomiędzy jądrem SON i PVN

Me — value of the median
wartość mediany

p — probability
poziom prawdopodobieństwa

Ra — range
zakres

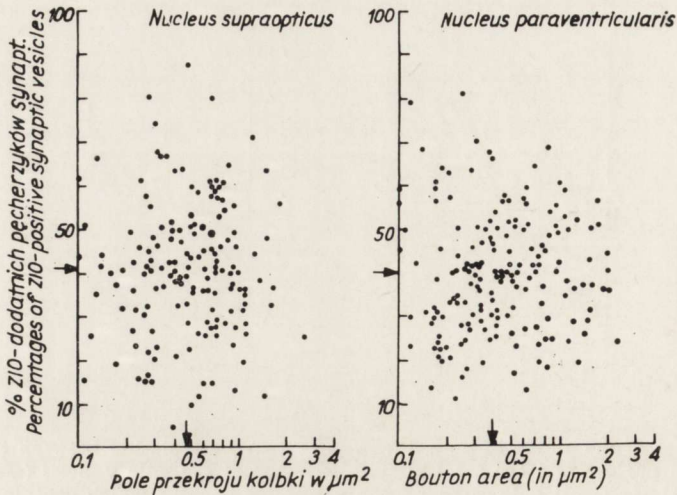


Fig. 24. Scatter of the points in both diagrams indicates that there is no relationship between the boutons area and the relative number (%) of ZIO-positive synaptic vesicles. Arrows point to the position of the median.

Ryc. 24. Rozkład punktów w obu diagramach wskazuje, że brak jest wyraźnej współzależności pomiędzy polem kolbek i względną liczbą (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych. Strzałki wskazują pozycję mediany.

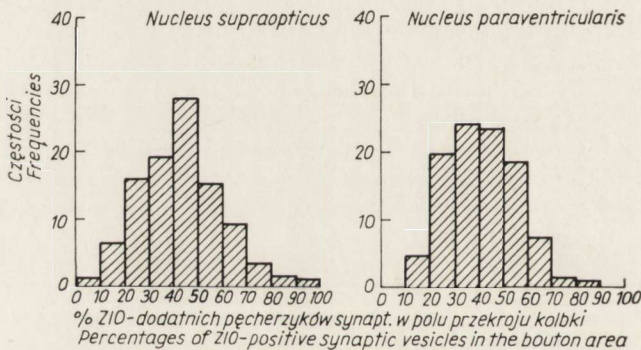


Fig. 25. Frequency distributions of the occurrence of S-type boutons in relation to percentages of ZIO-positive synaptic vesicles.

Ryc. 25. Histogram częstości występowania kolbek typu-S w zależności od względnej liczby (%) ZIO-dodatnich pęcherzyków synaptycznych.

DISCUSSION

The results of the present investigations indicate that there are two basic types of synaptic vesicles related to the presynaptic boutons of the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat, namely: clear spheroid vesicles with an average diameter of 40–50 nm and flattened vesicles with an average

diameter of 60×30 nm. Boutons encountered here, which have been identified as S or F type, besides the characteristic spheroid or flattened vesicles, respectively, also may contain a few dense-cored vesicles. These dense-cored vesicles might contain NA (Pellegrino De Iraldi et al., 1963). At the same time the present data has shown that, in either of the two investigated hypothalamic nuclei, boutons are morphologically similar and they form axodendritic and axo-somatic synapses. The S and F boutons may, according to the results obtained here, occur in either of the two varieties of distinguished synaptic contacts. The presence of the S and F type presynaptic boutons in both these nuclei might be, in agreement with the general statement of Uchizono (1975), responsible for the origin of the excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) and inhibitory postsynaptic potentials (IPSPs), respectively.

The results of quantitative analysis, performed in this study, have revealed a considerable morphological and histochemical (after ZIO treatment) similarity of the S-type boutons, occurring either in supraoptic or paraventricular nucleus, with respect to their areas, total number of spheroid synaptic vesicles or relative number (%) of ZIO-positive vesicles. On the other hand, in both these nuclei, the interrelationship has been found between the bouton area and the total number of spheroid vesicles; while no such relationship has been encountered between the areas of these boutons and the relative number (%) of ZIO-impregnated vesicles. It is not yet sufficiently understood why, in boutons only some proportion of vesicles gets impregnated by ZIO mixture. According to Kawana et al. (1969), differences in vesicle membrane permeability and vesicular content must be considered. They also concluded that such differences in ZIO reactivity are related to changes in physiological or biochemical state rather than to technical failure. This view finds an indirect support in recent investigations of Pellegrino De Iraldi and Cardoni (1979) on the effects of drugs inhibiting the synthesis of 5-HT and NA, on the ZIO reaction in synaptic vesicles in rat pineal nerves. These studies have shown that the effect of this reaction is related to changing accessibility of -SH groups in vesicle proteins. On the basis of morphological studies, presented above, it is difficult to associate the distinct types of the synaptic vesicles with the specific neurotransmitters, the more that in the examined hypothalamus area a great variety of neurotransmitters was observed (see: Introduction). Consequently, it does not seem possible, either from the obtained results or from the literature data (Maillet, 1963; Joó et al., 1973; Osborne, Thornhill, 1974; Akert, Sandri, 1975) to relate a positive ZIO impregnation of some proportion of synaptic vesicles to any specific neurotransmitter or any other chemical substance that they contain. However, Gilloteaux and Naud (1979) have expressed the opinion that ZIO impregnation technique might be useful in revealing some Ca^{++} storage sites in subcellular structures.

On the basis of the present data it can thus be concluded that, in normal female rat, the same types of presynaptic boutons, that is S and F containing spheroid and flattened vesicles respectively, occur in both supraoptic and paraventricular nuclei. At the same time the results of the measurements indicate that after ZIO treatment there are no appreciable differences between these nuclei in respect of the boutons containing spheroid synaptic vesicles. It seems that the morphometrical results from single bouton profiles may reflect the individual heteromorphy and provide a detailed information about the complex functional changes in a given bouton type. Notwithstanding some deficiencies, the application of ZIO impregnation technique in the comparative evaluation of the boutons in supraoptic and paraventricular nuclei may be of some significance in better understanding of their role in the processes related to the neurosecretion.

Acknowledgement.

The author is grateful to dr Danuta Loesch for comments and help in preparing this manuscript.

A. Loesch

ZIO-IMPREGNOWANE KOLBKI SYNAPTYCZNE W NEUROPILU JĄDRA NADWZROKOWEGO I PRZYKOMOROWEGO SZCZURA

Streszczenie

Kolbki synaptyczne w neuropilu jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura były badane. Dwa typy kolbek zidentyfikowano, zarówno przy użyciu konwencjonalnego utrwalania aldehydem glutarowym jak i techniki ZIO. Są to: kolbki typu S, zawierające okrągłe pęcherzyki synaptyczne i kolbki typu F, zawierające spłaszczone pęcherzyki synaptyczne. Stwierdzono, że produkt reakcji ZIO impregnuje zarówno okrągłe jak i spłaszczone pęcherzyki synaptyczne. Wyniki badań morfometrycznych, przeprowadzonych na ZIO-impregnowanych kolbkach typu S wskazują, że nie ma istotnych różnic pomiędzy jądrem nadwzrokowym i przykomorowym pod względem wielkości powierzchni przekroju kolbek oraz ogólnej liczby pęcherzyków synaptycznych i względnej liczby (%) pęcherzyków ZIO-dodatnich przypadających na powierzchnię danej kolbki. Jednocześnie stwierdzono ścisłą współzależność pomiędzy wielkością powierzchni przekroju kolbek typu S i ogólną liczbą okrągłych pęcherzyków synaptycznych, zarówno w jądrze nadwzrokowym jak i przykomorowym. Natomiast nie stwierdzono wyraźnego związku pomiędzy wielkością powierzchni przekroju kolbek a względną liczbą (%) pęcherzyków synaptycznych wybarwionych produktem reakcji ZIO.

A. Леш

ЗИО-ИМПРЕГНИРОВАННЫЕ СИНАПТИЧЕСКИЕ КОЛБОЧКИ В НЕЙРОПИЛЕ СУПРАОПТИЧЕСКОГО И ПЕРИВЕНТРИКУЛЯРНОГО ЯДЕР КРЫСЫ

Резюме

Исследовались синаптические колбочки в нейропиле супраоптического и перивентрикулярного ядер у крысы. Были обнаружены два типа колбочек, так при использовании конвенциональной техники фиксации глутаральдегидом, как

и техники ЗИО. Это: колбочки типа S, содержащие круглые синаптические пузырьки и колбочки типа F, содержащие сплюснутые синаптические пузырьки. Результаты морфометрических исследований, проведенных на ЗИО-импрегнированных колбочках типа S, указывают на то, что нет существенных различий между супраорбитальным и перивентрикулярными ядрами относительно величины поверхности разреза колбочек, а также общего числа синаптических пузырьков и относительного числа (‰) ЗИО-положительных пузырьков, приходящихся на поверхность данной колбочки. Одновременно обнаруживалась тесная зависимость между величиной поверхности разреза колбочек типа S и общим числом круглых синаптических пузырьков, как в супраорбитальном так и в перивентрикулярном ядрах. Не обнаруживается же отчетливая связь между величиной поверхности разреза колбочек и относительным числом (‰) синаптических пузырьков, окрашенных продуктом реакции ЗИО.

REFERENCES

1. Akert K., Sandri C.: Significance of the Maillet method for cytochemical studies of synapses. In: Golgi Centennial Symposium, Proceedings, Ed. M. Santini, Raven Press, New York 1975, 387—399.
2. Bargmann W., Scharrer E.: The site of origin of the hormones of the posterior pituitary. *Am. J. Sci.* 1951, 39, 255—259.
3. Brownstein M.: Biogenic amine content of the hypothalamic nuclei. In: *Anatomical Neuroendocrinology*. Eds. W. E. Stumpf, L. D. Grant, Karger, Basel 1975, 393—396.
4. Brownstein M., Saavedra J. M., Palkovits M., Axelrod J.: Histamine content of hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Res.* 1974, 77, 151—156.
5. Carlsson A., Falck B., Hillarp N. Å.: Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 1962, 196, 1—28.
6. Clementi F., Ceccarelli B.: The fine structure of rat hypothalamic nuclei. In: *The Hypothalamus*. Eds. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini, Academic Press, New York 1970, 17—44.
7. Elde R., Hökfelt T.: Distribution of hypothalamic hormones and other peptides in the brain. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 5 Eds. W. F. Ganong, L. Martini, Raven Press, New York 1978, 1—33.
8. Eneström S.: Nucleus supraopticus. A morphological and experimental study in the rat. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Suppl. 1967, 186, 1—99.
9. Fujimoto S.: The hypothalamo-neurohypophysial system and anti-diuretic hormone. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, Kyoto 1977, 73, 257—266.
10. Fuxe K.: Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol. Scand.*, Suppl. 64, 1965, 247, 39—85.
11. Fuxe K., Hökfelt T.: The influence of central catecholamine neurons on the hormone secretion from the anterior and posterior pituitary. In: *Neurosecretion*. Ed. F. Stutinsky, Springer Berlin 1967, 165—176.
12. Fuxe K., Hökfelt T.: Central monoaminergic systems and hypothalamic function. In: *The Hypothalamus*, Eds. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini, Academic Press, New York 1970, 123—138.
13. Gilloteaux J., Naud J.: The zinc iodide-osmium tetroxide staining-fixative of Maillet. Nature of the precipitate studied by X-ray microanalysis and detection of Ca^{2+} -affinity subcellular sites in a tonic smooth muscle. *Histochemistry* 1979, 63, 227—243.

14. Joó F., Halász N., Párducz A.: Studies on the fine structural localization of zinc-iodide-osmium reaction in the brain. I. Some characteristics of localization in the perikarya of identified neurons. *J. Neurocyt.* 1973, 2, 393—405.
15. Kawana E., Akert K., Sandri C.: Zinc iodide-osmium tetroxide impregnation of nerve terminals in the spinal cord. *Brain Res.* 1969, 16, 325—331.
16. Koelle G. B.: The histochemical localization of cholinesterases in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1954, 100, 211—235.
17. Korfsmeier K.: Ultrastrukturelle Veränderungen in der neurosekretorischen Zentren des Hypothalamus und der Eminentia mediana nach Behandlung mit Cyproteronazetat (Antandrogen). *Z. Zellforsch.* 1970, 110, 600—610.
18. Loesch A.: Morphometric studies of the synapses in the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat. *Acta Med. Pol.* 1980, 21, 373—374.
19. Maillet M.: Le reactif au tetraoxycycle de osmium-iodure du zinc. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 1963, 70, 397—425.
20. Morris J. F.: A quantitative analysis of synaptic terminals in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *J. Anat. Proc.* 1974, 117, 213.
21. Moss R. L., Urban I., Cross B. A.: Microelectrophoresis of cholinergic and aminergic drugs on paraventricular neurons. *Am. J. Physiol.* 1972, 223, 310—318.
22. Osborne M. P., Thornhill R. A.: The zinc-iodide-osmium reactive sites in the sensory epithelia of the frog labyrinth. *J. Neurocyt.* 1974, 3, 459—470.
23. Oshima K., Gorbman A.: Pars intermedia: unitary electrical activity regulated by light. *Science* 1969, 163, 195—197.
24. Pellegrino De Iraldi A., Cardoni R.: ZIO staining in synaptic vesicles in the rat pineal nerves after inhibition of serotonin and noradrenaline synthesizing enzymes. *Cell Tiss. Res.* 1979, 200, 91—100.
25. Pellegrino De Iraldi A., Guggan H. F., De Robertis E.: Adrenergic synaptic vesicles in the anterior hypothalamus of the rat. *Anat. Rec.* 1963, 145, 521—531.
26. Polenov A. L., Senchik J. I.: Synapses on neurosecretory cells of the supra-optic nucleus in white mice. *Nature* 1966, 211, 1423—1424.
27. Rechardt L.: Electron microscopic and histochemical observations of the supraoptic nucleus of normal and dehydrated rats. *Acta Physiol. Scand., Suppl.* 1969, 329, 1—79.
28. Schade J. P.: A system analysis of some hypothalamic function. In: *The Hypothalamus*, Eds. L. Martini, M. Motta, F. Fraschini, Academic Press., New York 1970, 69—82.
29. Scharrer B.: Neuroendocrine communication (neurohormonal, neurohumoral and intermediate). *Progr. Brain Res.* 1972, 38, 7—18.
30. Uchizono K.: Excitation and inhibition: synaptic morphology. *Igaku Shoin, Tokyo* 1975.
31. Uchizono K., Sakai T.: Synaptic organization of neurosecretory cells. In: *Microscopic Electronique*. Ed. P. Favard, Societé Francaise de Microscopie Electronique, Paris 1970, 3, 703—704.

Author's address: Laboratory of the Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa str., 00-784 Warszawa.

LUBOMIRA DYDYK, MIECZYSLAW JUSTYNA

WPLYW ENFLURANU NA SYNAPSY W KORZE RUCHOWEJ KRÓLIKA W OKRESIE ROZWOJU

BADANIA MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWE METODĄ RUTYNOWĄ I PO IM-
PREGNACJI ZIO

Pracownia Neuropatologii Rozwojowej Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
Kierownik: prof. dr M. Dąbska
Oddział Anestezjologii i Reanimacji Instytutu Gruźlicy
Ordynator: doc. dr M. Justyna

Enfluran (2-chloro-1,1,2-trójfluoroetylo-dwufluorometyloeter) został po raz pierwszy użyty do narkozy w klinikach angielskich w 1966 roku. Jest anestetykiem wzięwnym wydalonym głównie przez płuca. Jako związek rozpuszczalny w tłuszczach pobudza aktywność enzymów mikrosomalnych wątroby i w wyniku ich działania przechodzi w związki rozpuszczalne w wodzie (Berman i wsp. 1976). Metabolity enfluranu są wydalane przez przewód pokarmowy i nerki (Hitt i wsp. 1977).

Badania nad wpływem enfluranu na ustrój zwierzęcy wykazały, że poziom noradrenaliny w surowicy krwi obniża się proporcjonalnie do wzrostu jego stężenia w powietrzu wdychanym (Rosenberg, Klinge 1974). Ponadto stwierdzono, że zapobiega on powstawaniu częstoskurczu komorowego, do którego może dojść w następstwie nagłego i znacznego wzrostu poziomu noradrenaliny i adrenaliny we krwi (Inoue i wsp. 1976). W związku z powyższym enfluran został uznany jako anestetyk z wyboru do operacji guza chromochłonnego nadnerczy (Kreul i wsp. 1976).

Badano również działanie enfluranu na ośrodkowy układ nerwowy. Wyniki pracy Dydyk i wsp. (1979a), poświęconej badaniu wpływu enfluranu na poziom amin katecholowych w korze mózgu młodych królików sugerowały, że zmiany poziomu katecholamin mogą być zależne przede wszystkim od niedoboru tlenu, spowodowanego zmianami hemodynamicznymi. Badania Ngai i wsp. (1978) wykazały, że podczas narkozy enfluranowej poziom acetylocholin i cholin we wszystkich strukturach mózgu nie ulega zmianie, nato-

miast po narkozie szybkość przemian acetylocholino maleje wyłącznie w korze mózgu. Maślińska i wsp. (1979) stwierdzili, że bezpośrednio po narkozie w korze mózgu dochodzi do znamienego statystycznie spadku aktywności acetylocholinoesterazy.

Wyniki powyższych badań, a także częste stosowanie enfluranu w anestezji dziecięcej, skłoniły nas do podjęcia badań, których bezpośrednim celem była ocena wpływu enfluranu na synapsy w dojrzewającej korze mózgu królika. Biorąc pod uwagę, że poszczególne warstwy i okolice kory mózgu dojrzewają w różnym czasie, badania mikroskopowo-elektronowe prowadzono wyłącznie na trzeciej warstwie kory ruchowej. Stan synaps oceniano przy użyciu rutynowej metody badania ultrastrukturalnego i metody cynkowo-jodowo-osmowej (ZIO).

MATERIAŁ I METODY

Pracę wykonano na 12 królikach, które w zależności od wieku (1, 4, 16 i 32 dzień życia) podzielono na cztery grupy doświadczalne. Grupy kontrolne stanowiły króliki w tym samym wieku (przebywające w standardowych warunkach hodowlanych), które zostały użyte do badań nad rozwojem synaps w trzeciej warstwie kory ruchowej (Dydyk, Juraniec 1980).

Zwierzęta doświadczalne poddawano narkozie enfluranowej trwającej 60 minut. Stosowano stężenie 1,5—2%, które odpowiadało tzw. minimalnemu stężeniu pęcherzykowemu (MAC), opracowanemu przez Egera i wsp. (1967).

Doświadczenia prowadzono w przezroczystej komorze, z ciągłym przepływem powietrza. Dokładny opis zestawu używanego do doświadczeń opisano poprzednio (Dydyk i wsp. 1979b). Przez komorę przepuszczano powietrze z parami enfluranu. Tlenu nie podawano, aby wyeliminować wpływ hiperoksji na niedojrzały mózg (Dydyk 1976). Wobec braku parownika do enfluranu, zgodnie z instrukcją wytwórni produkującej ten związek (Airce Ohio USA), a także zgodnie z praktyką wielu anestezjologów, do odparowywania anestetyka używano parownik halotanowy Fluotec Mark 3.

Wycinki z kory ruchowej pobierano bezpośrednio po doświadczeniu, w narkozie eterowej, przyżyciowo. Utrwalono je w 2% roztworze czterotlenku osmu w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,4 przez 1 godz., a następnie w roztworze 4% aldehydu glutarowego w tym samym buforze przez 2 godz. w temp. 4° C. Utrwalony materiał dzielono na dwie części. Wycinki przeznaczone do impregnacji cynkowo-jodowo-osmowej płukano trzykrotnie rozcieńczonym buforem Tris-aminomethan-HCl o pH 7,4 w temp. pokojowej. Impregnację wykonywano według metody opisanej przez Kawaną i wsp. (1969). Materiał poddany impregnacji i materiał nie impregowany odwadniano w roztworach alkoholu o wzrastającym stężeniu, zatapiano w Eponie 812 i skrawano na ultramikrotomie LKB. Półcienkie skrawki barwiono błęki-

tem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Ultracienkie skrawki zawierające trzecią warstwę kory ruchowej dobarwiano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu i oglądano oraz wykonywano dokumentację w mikroskopie elektronowym JEM 7A.

WYNIKI

Wyniki badań ultrastrukturalnych z użyciem metody ZIO, które prowadzono na trzeciej warstwie kory ruchowej królików w 1, 4, 16 i 32 dniu życia w warunkach hodowlanych, opisano w pracy Dydyk i Juraniec (1980), poświęconej badaniu rozwoju synaps. Zostały one wykorzystane w niniejszej pracy jako badania kontrolne.

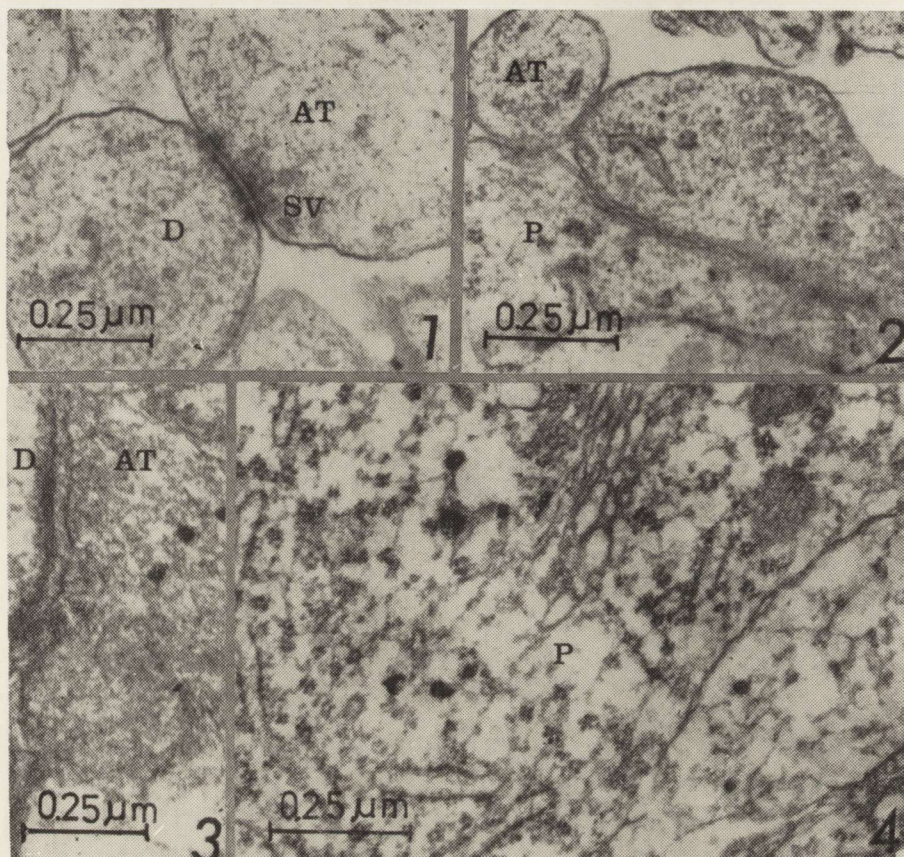
W pierwszym dniu życia obrazy mikroskopowo-elektronowe synaps w korze mózgu królików poddanych działaniu enfluranu, nie różniły się od obrazów synaps w korze mózgu królików kontrolnych.

W zależności od umiejscowienia zakończeń aksonalnych w stosunku do wypustek nerwowych, można było wyróżnić synapsy aksokolewce i akso-dendrytyczne (ryc. 1). Zakończenia aksonalne umiejscowione przy błonie cytoplazmatycznej komórek nerwowych nie tworzyły połączeń synaptycznych z perikarionami tych neuronów (ryc. 2). Przekroje poprzeczne zakończeń aksonalnych były najczęściej okrągłe lub owalne, rzadziej wydłużone (ryc. 1, 2). Zawierały one pojedyncze, okrągłe pęcherzyki synaptyczne (ryc. 1, 2.) Wśród obserwowanych synaps większość stanowiły synapsy z dobrze widocznym zagęszczeniem postsynaptycznym tj. synapsy asymetryczne czyli typu I (ryc. 1, 3). Wyjątkowo spotykano synapsy bez wyraźnego zagęszczenia cytoplazmy wzdłuż części postsynaptycznej. Były to synapsy symetryczne czyli typu II. Opisane synapsy były przeważnie jednoogniskowe tj. posiadały tylko jedną strefę czynną (ryc. 1). Synapsy wieloogniskowe, posiadające kilka stref czynnych, spotykano rzadko.

Po impregnacji ZIO wszystkie pęcherzyki synaptyczne zachowywały okrągły kształt, natomiast tylko niektóre z nich zawierały elektronowo-gęsty dodatni produkt reakcji (ryc. 3). Pęcherzyki te były otoczone wąskim „halo”, które oddzielało wewnątrz pęcherzyka z elektronowo-gęstą zawartością od jego błony. Pozostałe pęcherzyki były przejrzyste dla elektronów (ryc. 3).

W cytoplazmie perykarionów komórek nerwowych, w pobliżu struktur układu Golgiego często stwierdzano obecność okrągłych pęcherzyków, zawierających produkt reakcji ZIO (ryc. 4). Niekiedy spotykano je również w aksonach.

W 4 dniu życia obrazy ultrastrukturalne synaps w korze mózgu królików doświadczalnych (podobnie jak w 1 dniu) nie różniły się od obrazów synaps królików kontrolnych.



Ryc. 1. 1 dzień życia. Synapsa aksodendrytyczna typu asymetrycznego. Zakończenie aksonalne (AT) zawierające nieliczne pęcherzyki synaptyczne (SV). D — dendryt. Barw. octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Fig. 1. 1st day of life. Axodendritic synapse of asymmetrical type. Axon terminal (AT) containing few synaptic vesicles (SV). D — dendrite. Stained with uranyl acetate and lead citrate.

Ryc. 2. 1 dzień życia. Zakończenie aksonalne (AT) leżące w pobliżu perykarionu (P) komórki nerwowej. Barw. octanem uranylu i cytrynianem ołowiu,

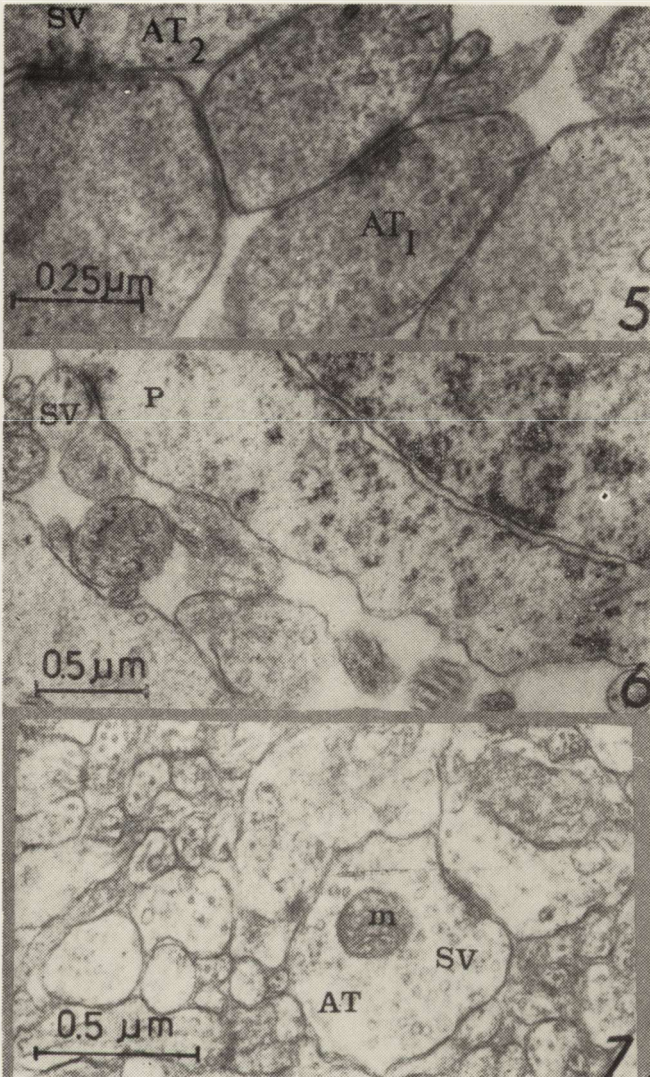
Fig. 2. 1st day of life. Axon terminal (AT) lying in vicinity of neuronal perikaryon (P). Stained with uranyl acetate and lead citrate.

Ryc. 3. 1 dzień życia. Synapsa aksodendrytyczna typu asymetrycznego. W zakończeniu aksonalnym (AT) widoczne są nieliczne pęcherzyki synaptyczne z produktem reakcji ZIO. D — dendryt. Impregnacja ZIO.

Fig. 3. 1st day of life. Axodendritic synapse of asymmetrical type. Inside the axon terminal (AT) few synaptic vesicles with product of ZIO reaction are visible. D — dendrite. ZIO impregnation.

Ryc. 4. 1 dzień życia. Liczne pęcherzyki z dodatnim produktem reakcji leżące w pobliżu układu Golgiego. P — perykarion komórki nerwowej. Impregnacja ZIO.

Fig. 4. 1st day of life. Numerous vesicles with positive reaction visible in vicinity of Golgi apparatus. P — perikaryon of neuron. ZIO impregnation.



Ryc. 5. 4 dzień życia. Dwie synapsy aksodendrytyczne typu asymetrycznego. W zakończeniu aksonalnym (AT_1) jednej z nich liczne pęcherzyki synaptyczne. W drugim zakończeniu (AT_2) pojedyncze pęcherzyki synaptyczne (SV). Barw. octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

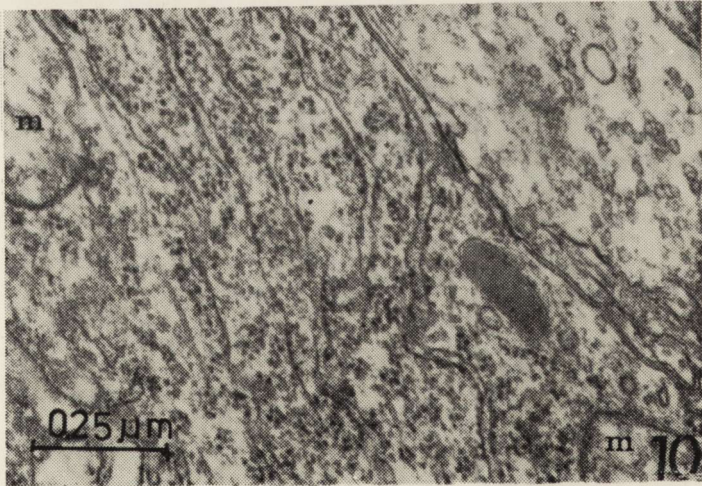
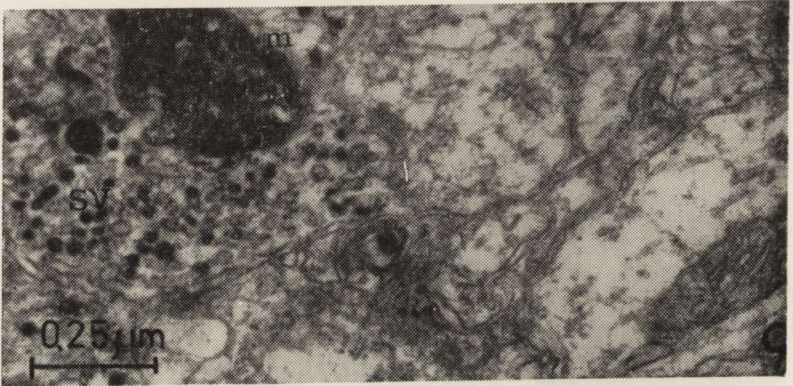
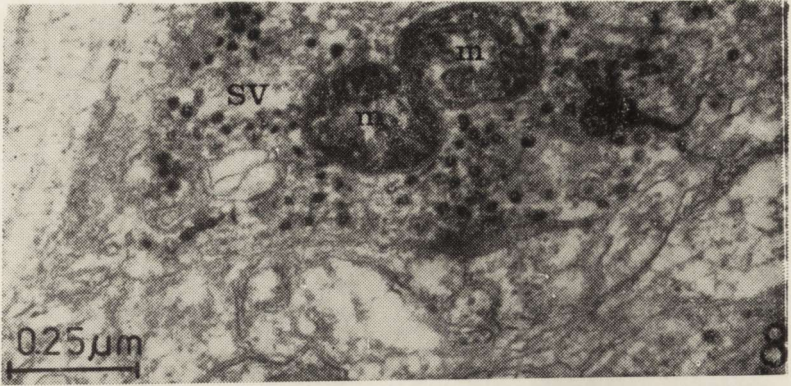
Fig. 5. 4th day of life. Two axodendritic synapses of asymmetrical type. In axon terminal (AT_1) one of them numerous synaptic vesicles. In the second axon terminal (AT_2) single synaptic vesicles (SV). Stained with uranyl acetate and lead citrate.

Ryc. 6. 4 dzień życia. Synapsa aksosomatyczna z pojedynczymi pęcherzykami synaptycznymi (SV). P — perykarion. Barw. octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Fig. 6. 4th day of life. Axosomatic synapse with few synaptic vesicles (SV). P — perikaryon. Stained with uranyl acetate and lead citrate.

Ryc. 7. 16 dzień życia. Synapsa aksodendrytyczna typu asymetrycznego. W zakończeniu aksonalnym (AT) liczne pęcherzyki synaptyczne (SV) i mitochondrium (m). Barw. octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Fig. 7. 16 th day of life. Axodendritic synapse of asymmetrical type. In axon terminal (AT) numerous synaptic vesicles (SV) and mitochondrium (m). Stained with uranyl acetate and lead citrate.



Prawie wyłącznie obserwowano synapsy aksokolcowe i aksodendrytyczne. W ich aksonach terminalnych widoczne były mniej lub bardziej liczne, okrągłe pęcherzyki synaptyczne (ryc. 5). Niekiedy obserwowano pojedyncze mitochondria. Uwzględniając strukturę styków, wyróżniano synapsy asymetryczne, które stanowiły większość, oraz pojedyncze synapsy symetryczne. Synapsy obu typów były przeważnie jednoogniskowe (ryc. 5). Bardzo rzadko spotykano synapsy aksosomatyczne. Ich zakończenia aksonalne nie zawierały wcale pęcherzyków synaptycznych lub tylko pojedyncze (ryc. 6). Po impregnacji ZIO, wszystkie pęcherzyki synaptyczne były okrągłe. Część z nich zawierała produkt reakcji w postaci homogennej elektronowo-gęstej substancji. W cytoplazmie perykarionów komórek nerwowych, w pobliżu struktur układu Golgiego oraz w aksonach, rzadziej niż w 1 dniu życia, stwierdzano pojedyncze pęcherzyki z produktem reakcji ZIO.

W 16 i 32 dniu życia obrazy ultrastrukturalne synaps były jednakowe. W korze mózgu królików doświadczalnych, w porównaniu z królikami kontrolnymi, zaznaczały się zmiany w mitochondriach i w pęcherzykach synaptycznych.

Wśród obserwowanych synaps, stwierdzano synapsy aksokolcowe i aksodendrytyczne (ryc. 7, 8, 9) oraz aksosomatyczne (ryc. 10). Zakończenia aksonalne zawierały liczne okrągłe pęcherzyki synaptyczne (ryc. 7), niekiedy różnej wielkości oraz mniej lub bardziej liczne mitochondria (ryc. 7, 8) często z cechami spęcznienia. W pojedynczych kolbkach synaptycznych spotykano duże mitochondria o nieregularnych kształtach. Podobne mitochondria obserwowano w perykarionach komórek nerwowych (ryc. 10). Synapsy wieloogniskowe, w porównaniu z 1 i 4 dniem życia występowały częściej.

Po impregnacji ZIO, w zakończeniach aksonalnych widoczne były liczne okrągłe pęcherzyki z dodatnim produktem reakcji i liczne, również okrągłe, przeziernie dla elektronów (ryc. 8, 9, 11). Wśród pęcherzyków wypełnionych

Ryc. 8. 16 dzień życia. Fragment zakończenia aksonalnego. Spęczniałe mitochondria (m), których macierz ogniskowo zawiera produkt reakcji ZIO. SV — pęcherzyki synaptyczne. Impregnacja ZIO.

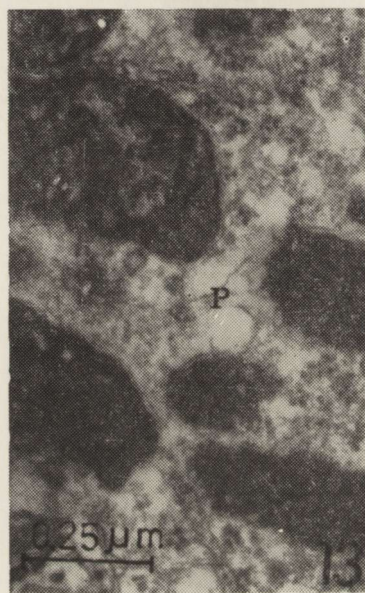
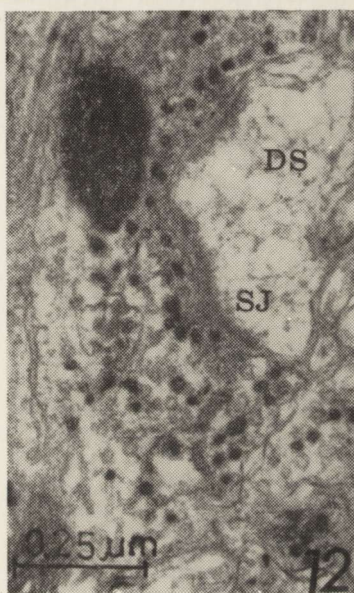
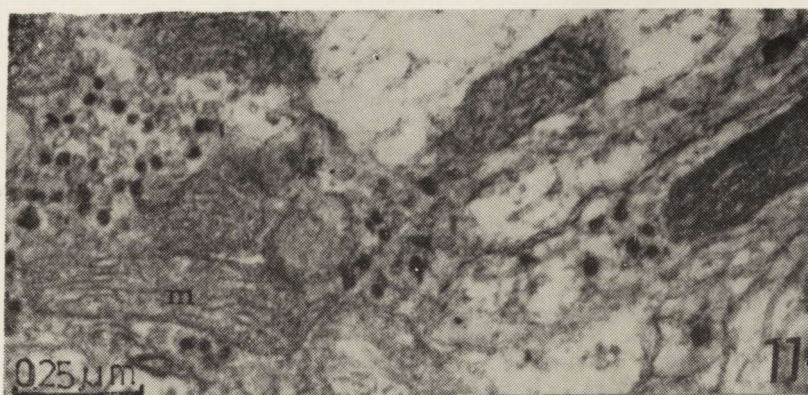
Fig. 8. 16th day of life. Part of axon terminal. Swollen mitochondria (m) with matrix focally containing product of reaction ZIO. SV — synaptic vesicles. ZIO impregnation.

Ryc. 9. 16 dzień życia. Fragment zakończenia aksonalnego. Mitochondrium (m), którego macierz zawiera produkt reakcji ZIO. Liczne pęcherzyki synaptyczne (SV). Impregnacja ZIO.

Fig. 9. 16th day of life. Part of axon terminal. Mitochondrium (m) with matrix containing product of reaction ZIO. Numerous synaptic vesicles (SV). ZIO impregnation.

Ryc. 10. 32 dzień życia. Synapsa aksosomatyczna. W zakończeniu aksonalnym liczne pęcherzyki synaptyczne i mała torbielka. W perykarionie komórki nerwowej spęczniałe mitochondria (m). Barw. octanem uranylu i cytrynianem ołowiu.

Fig. 10. 32nd day of life. Axosomatic synapse. In axon terminal numerous synaptic vesicles and small vacuole. In neuronal perikaryon swollen mitochondria (m). Stained with uranyl acetate and lead citrate.



Ryc. 11. 32 dzień życia. Fragment zakończenia aksonalnego. Jeden duży i liczne małe pęcherzyki synaptyczne oraz liczne mitochondria (m). Impregnacja ZIO.

Fig. 11. 32nd day of life. Part of axon terminal. One large and numerous small synaptic vesicles and numerous mitochondria (m). ZIO impregnation.

Ryc. 12. 32 dzień życia. Synapsa aksokolecowa. Mitochondrium zawierające produkt reakcji ZIO SJ — styk, DS — kołec dendrytyczny. Impregnacja ZIO.

Fig. 12. 32nd day of life. Axospinal synapse. Mitochondrion containing product of reaction ZIO. SJ — synaptical junction, DS — dendritic spine. ZIO impregnation.

Ryc. 13. 32 dzień życia. Perykarion neuronu (P). Liczne duże i różnego kształtu mitochondria których macierz zawiera produkt reakcji ZIO. Impregnacja ZIO.

Fig. 13. 32nd day of life. Perikaryon of neuron (P). Numerous large mitochondria of various shape, with matrix containing product of reaction ZIO. ZIO impregnation.

elektronowo-gęstym produktem reakcji ZIO spotykano pojedyncze nieco większe od pozostałych (ryc. 11). Dodatni produkt reakcji stwierdzano również w mitochondriach spęczniałych, z ogniskowymi przejaśnieniami macierzy (ryc. 8) i w dużych mitochondriach o nieregularnych kształtach (ryc. 9). Niektóre mitochondria, wypełnione homogennym produktem reakcji ZIO, były podobne do ciał gęstych (ryc. 12). W perykarionach komórek nerwowych również obserwowano mitochondria, których macierz zawierała dodatni produkt reakcji (ryc. 13). W cytoplazmie pojedynczych komórek, w pobliżu struktur układu Golgiego, spotykano małe, okrągłe pęcherzyki, zawierające produkt reakcji ZIO. W porównaniu z królikami w 1 i 4 dniu życia, stwierdzano je rzadziej.

OMÓWIENIE

Opisane obrazy mikroskopowo-elektronowe należy odnieść do rozwoju synaps, wpływu impregnacji ZIO oraz działania enfluranem. W naszych badaniach w 1 i 4 dniu życia królika występują prawie wyłącznie synapsy aksokolewowe i aksodendrytyczne, natomiast w 16 i 32 dniu życia są obecne również synapsy aksosomatyczne. Opisana kolejność występowania tych trzech rodzajów synaps jest zgodna z prawidłowo przebiegającym ich rozwojem (Voeller i wsp. 1963; Bodian 1966).

Z rozwojem synaps wiąże się również częstsze występowanie synaps jednoogniskowych u królików młodszych, i wielogniskowych u królików starszych (Aghajanian, Bloom 1967; Johnson, Armstrong-James 1970). Ważnym wykładnikiem rozwoju synaps jest wzrost liczby pęcherzyków synaptycznych i mitochondriów w zakońzeniach aksonalnych (Armstrong-James, Johnson 1970; Gonatas i wsp. 1971). Wzrost ten zaznacza się wyraźnie przy porównywaniu obrazów mikroskopowo-elektronowych zakończeń aksonalnych w 1 i 4 oraz w 16 i 32 dniu życia królika.

Na szczególną uwagę zasługuje występowanie pęcherzyków wypełnionych produktem reakcji ZIO w cytoplazmie perykarionów komórek nerwowych w pobliżu struktur układu Golgiego oraz w aksonach. W naszym materiale występowały one często u królików młodszych i rzadziej u królików starszych. Podobne wyniki badań prowadzonych na komórkach nerwowych rdzenia kręgowego uzyskał Stelzner (1971), który w 2 dniu życia szczura obserwował w perykarionach komórek nerwowych i w aksonach liczne pęcherzyki zawierające produkt reakcji ZIO, natomiast w 21 dniu stwierdził w tych strukturach tylko pojedyncze pęcherzyki z dodatnim produktem reakcji. Badania Vrensena i De Groota (1974), Matsuura i wsp. (1976) oraz badania własne wykazały, że przy użyciu metody ZIO mogą wybarwiać się również mitochondria i inne organelle komórkowe. W związku z powyższym nie wiadomo czy obserwowane przez Stelznera, a także przez nas, pęcherzyki zawierające

produkt reakcji ZIO są pęcherzykami synaptycznymi. Wyniki naszych badań nie wyjaśniają tego, ale zbieżność obserwacji Stelznera i naszych odnośnie zmniejszania się liczby pęcherzyków w rdzeniu i w korze mózgu zwierząt starszych, może sugerować zależność omawianego zjawiska od rozwoju ośrodkowego układu nerwowego.

Po impregnacji ZIO kształt opisanych przez nas pęcherzyków synaptycznych jest okrągły. Podobne wyniki uzyskała Juraniec i wsp. (1974) badając przedmurze kota i stosując imersyjne utrwalanie wycinków w mieszaninie aldehydowo-osmowej. Według Lunda i Westruma (1966) oraz Walberga (1966) utrwalacze aldehydowe stosowane na drodze perfuzji spłaszczają pęcherzyki synaptyczne. Można więc przypuszczać, że opisane przez nas występowanie wyłącznie pęcherzyków kształtu okrągłego jest związane z przyżyciowym pobieraniem materiału, bez stosowania perfuzji z paraformaldehydu.

W przedstawionym materiale, obok pęcherzyków zawierających produkt reakcji ZIO, występują mniej lub bardziej liczne pęcherzyki, bez dodatniego produktu reakcji. Zjawisko to było również interpretowane i nadal jest przedmiotem dyskusji. Vrensen i De Groot (1974) wykazali, że impregnacja metodą Kawany i wsp. (1969) daje w pełni pozytywne wyniki (wszystkie pęcherzyki zawierają produkt reakcji ZIO) jedynie przy niskich pH w granicach 3,5—4,5. Obecność licznych nie wybarwionych pęcherzyków w naszych badaniach może być zatem tłumaczona wysokim pH (6,25—7,4) użytych roztworów.

U królików poddanych działaniu enfluranu w 16 i 32 dniu życia w zakończeniach i w perykarionach pojedynczych komórek nerwowych występują zmiany ultrastrukturalne, których nie stwierdza się u królików kontrolnych. Na plan pierwszy wysuwają się zmiany w mitochondriach. Wśród tych zmian, do najczęściej spotykanych należy spęcznienie. Zaznacza się ono występowaniem ogniskowych przejaśnień macierzy z zepchnięciem na obwód grzebieni. Są to zmiany odwracalne i nieswoiste, które występują w różnych stanach patologicznych, między innymi również w niedotlenieniu. Biorąc pod uwagę brak w naszym materiale zmian ultrastrukturalnych u królików poddanych działaniu enfluranu w 1 i 4 dniu życia, tj. u zwierząt, których zapotrzebowanie energetyczne kory mózgu i jej wrażliwość na niedotlenienie są małe, obserwowane spęcznienie mitochondriów można wiązać z zaburzeniami hemodynamicznymi, wywołanymi przez enfluran (Horan i wsp. 1977). Drugi, rzadziej spotykany w naszym materiale zespół zmian stanowi wzrost objętości mitochondriów połączony ze zmianą ich kształtu, Jones i Rockel (1971) obserwowali wzrost objętości mitochondriów w wyrodnijących kolbkach synaptycznych, ale był on połączony ze zmianą kształtu grzebieni. W niektórych mitochondriach, zarówno w zakończeniach nerwowych, jak i w perykarionach komórek nerwowych stwierdza się obecność produktu reakcji ZIO. Badania nasze wykazały, że zjawisko to jest obserwowane przede

wszystkim u zwierząt poddanych działaniu enfluranu, natomiast bardzo rzadko występuje u zwierząt kontrolnych. Ibata i wsp. (1973), badając wyrodnijące zakończenia aksonalne stwierdzili, że oprócz pęcherzyków synaptycznych produkt reakcji ZIO zawierają mitochondria i cytoplazma kolbek synaptycznych. Próby wyjaśnienia patomechanizmu tego zjawiska są przedmiotem licznych prac. Wśród nich na szczególną uwagę zasługuje praca Matsuury i wsp. (1976), którzy sugerują, że w impregnacji metodą ZIO nie wybarwiają się transmitery, lecz jakaś inna, nie zidentyfikowana dotąd substancja.

W badanym materiale, w niektórych zakończeniach aksonalnych występują pojedyncze większe pęcherzyki synaptyczne. W oparciu o prace Cuenoda (1970) oraz Akerta i wsp. (1971), pojawienie się różnej wielkości pęcherzyków stanowi najwcześniejszy objaw wyrodnienia kolbek synaptycznych.

Autorzy składają podziękowanie Pani dr Jolancie Juraniec-Kubasikowej za współudział w wykonaniu części elektronogramów i Pani doc. dr Teresie Żawrockiej-Wrzółkowej za umożliwienie ich wykonania w Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Biologii Medycznej AM w Gdańsku.

Л. Дыдык, М. Юстына

ВЛИЯНИЕ ЭНФЛУРАНА НА СИНАПСЫ В МОТОРНОЙ КОРЕ КРОЛИКА В ПЕРИОД ИХ РАЗВИТИЯ

Исследование обычным методом в электронном микроскопе и после импрегнации ЗИО

Резюме

Работа была проведена на кроликах, подвергаемых воздействию энфлурана на 1, 4, 16 и 32 день жизни. Исследования проводились на 3 зоне моторной коры. Материал для исследований брали непосредственно после опыта, прижизненно, в эфирном наркозе. Импрегнация ЗИО проводилась методом Каваны (1969). Электронно-микроскопическое исследование, проведенное у кроликов, подвергаемых наркозу на 16 и 32 день жизни, обнаруживало неспецифические изменения в митохондриях и синаптических пузырьках. Полученные результаты указывают на то, что энфлурановый наркоз вызывает переходящую гипоксию коры мозга.

L. Dydyk, M. Justyna

INFLUENCE OF ENFLURANE ON THE MOTOR CORTEX SYNAPSES IN RABBIT IN THE PERIOD OF DEVELOPMENT

Electron-microscopic studies by the routine method and after impregnation with ZIO.

Summary

For the examination, rabbits exposed to the action of enflurane on the 1st, 4th, 16th and 32nd day of life were used. The third motor cortex layer was investigated. The material for examination was collected immediately after exposure, under ether anesthesia intravitally.

For ZIO impregnation the method of Kawana et al. (1969) was applied. Electron microscopic studies demonstrated in rabbits subjected to enflurane anesthesia on the 16th and 32nd day of life, nonspecific changes in the mitochondria and synaptic vesicles. The results obtained suggest that enflurane causes transient hypoxia of the cerebral cortex.

PIŚMIENNICTWO

1. Aghajanian G. K., Bloom F. G.: The formation of synaptic junctions in developing rat brain. A quantitative electron microscopic study. *Brain Res.* 1967, 6, 716—727.
2. Akert K., Cuenod M., Moor H.: Further observations on the enlargement of synaptic vesicles in degenerating optic nerve terminals of avian tectum. *Brain Res.* 1971, 25, 255—263.
3. Armstrong-James M., Johnson R.: Quantitative studies of postnatal changes in synapses in rat superficial motor cerebral cortex. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1970, 110, 559—568.
4. Berman M. L., Green O. C., Calverley R. K., Smith N. T., Eger E. I.: Enzyme induction by enflurane in man. *Anesthesiology* 1976, 44, 496—500.
5. Bodian D.: Development of fine structures of spinal cord in monkey fetuses. *Bull. J. Hopkins Hosp.* 1966, 119, 129—149.
6. Cuenod M., Sandri C., Akert K.: Enlarged synaptic vesicles as an early sign of secondary degeneration in the optic nerve terminals of the pigeon. *J. Cell Sci.* 1970, 6, 605—613.
7. Dydyk L.: Wpływ hiperoksji na ustrój niedojrzały. *Pol. Przegl. Chirug.* 1976, 48, 669—681.
8. Dydyk L., Wańkiewicz B., Justyna M., Prokopeczyk J.: Wpływ enfluranu na poziom katecholamin w korze mózgu noworodka królika. *Anest. Reanim. Intens. Terap.* 1979a, 11, 149—155.
9. Dydyk L., Hilgier W., Justyna M., Śmialek M.: Aktywność oksydazy cytochromowej w mitochondriach mózgu noworodka królika po narkozie halotanowej. *Neuropat. Pol.* 1979b, 17, 113—121.
10. Dydyk L., Juraniec J.: Development of synapses in rabbit motor cortex studied with application of the zinc-iodide-osmium tetroxide method, *Acta Med. Pol.* 1980, 21, 321—322.
11. Eger E. I., Saidman L. J., Bransteter B.: Minimum alveolar concentration: a standard of anesthetic potency. *Anesthesiology* 1967, 26, 756—761.
12. Gonatas N. K., Gambetti L. A., Gambetti P., Shafer B.: Morphological and biochemical changes in rat synaptosome fractions during neonatal development. *J. Cell Biol.* 1971, 51, 484—498.
13. Hitt B.A., Mazze R.I., Beppu W. J., Stevens W.C., Eger E. I.: Enflurane metabolism in rats and man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1977, 203, 193—202.
14. Horan B. F., Prys-Roberts C., Hamilton W. K., Roberts J. G.: Haemodynamic responses to enflurane anaesthesia and hypovolemia in the dog, and their modification by propranolol. *Brit. J. Anaest.* 1977, 49, 1189—1196.
15. Ibata J., Matsuura T., Nojyo J., Inoue T.: ZIO staining for degenerating terminals of rat spinal cords after transection. *Acta histochem. cytochem.* 1973, 6, 267—272.
16. Inoue T., Nozaki H., Suzuki H., Oknaki A.: Effect of enflurane on the circulatory system. *Jap. J. Anesth.* 1976, 25, 852—857.
17. Johnson R., Armstrong-James M.: Morphology of superficial postnatal cerebral cortex with special references to synapses. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1970, 112, 540—558.
18. Jones E. G., Rockel A. J.: The synaptic organization in the medial geniculate body of afferent fibres ascending from inferior colliculus. *Z. Zellforsch.* 1971, 113, 44—66.
19. Juraniec J., Wrzolkowa T., Narkiewicz O.: Types of synapses in the claustrum of the cat. *Acta Neurobiol. Exp.* 1974, 34, 233—252.

20. Kawana E., Akert K., Sandri C.: Zinc iodide-osmium tetroxide impregnation of nerve terminals in the spinal cord. *Brain Res.* 1969, 16, 325—331.
21. Kreul J. F., Dauchot P. J., Anton A. H.: Hemodynamic and catecholamine studies during pheochromocytoma resection under enflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1976, 44, 265—268.
22. Lund R. D., Westrum L. E.: Synaptic vesicle differences after primary formalin fixation. *J. Physiol. (Lond.)* 1966, 185, 7—9.
23. Maślińska D., Justyna M., Dydyk L., Maśliński S.: Wpływ narkozy etranowej na aktywność acetylocholinoesterazy w mózгах młodych królików. *Anest. Reanim. Intens. Terap.* 1979, 11, 157—163.
24. Matsuura T., Ibata J., Sano J.: The zinc iodide-osmium tetroxide (ZIO) reaction on nerve endings in the median eminence of the rat under normal and experimental conditions. *Cell Tiss. Res.* 1976, 173, 279—286.
25. Ngai S. H., Cheney D. L., Finsk A. D.: Acetylcholine concentrations and turnover in rat brain structures during anesthesia with halothane, enflurane and ketamine. *Anesthesiology* 1978, 48, 4—10.
26. Rosenberg P. H., Klinge E.: Some effects of enflurane anaesthesia on biogenic monoamines in the brain and plasma of rats. *Brit. J. Anaesth.* 1974, 46, 708—713.
27. Stelzner D. J.: The relationship between synaptic vesicles, Golgi apparatus and smooth endoplasmic reticulum. A developmental study using the zinc iodide-osmium technique. *Z. Zellforsch.* 1971, 120, 332—345.
28. Walberg F.: Elongated vesicles in terminal boutons of the central nervous system, a result of aldehyde fixation. *Acta Anat.* 1966, 65, 224—235.
29. Voeller K., Pappas G. D., Purpura D. P.: Electron microscope study of cat superficial neocortex. *Exp. Neurol.* 1963, 7, 107—130.
30. Vrensen G., De Groot D.: Osmium-zinc iodide staining and the quantitative study of central synapses. *Brain Res.* 1974, 74, 131—142.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W dniach 5 i 6 maja 1980 r. odbyło się w Wiedniu kolejne posiedzenie Rady Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego. Uczestniczyli w nim z ramienia Polski prof. M. Mossakowski, Vice-Prezydent Towarzystwa oraz prof. M. Wender i prof. J. Dymecki — członkowie Rady.

Zebrani minutą ciszy uczcili zmarłych w ostatnim okresie prof. J. Balo z Węgier, prof. M. Polaka z Argentyny i prof. Horia Radu z Rumunii.

Po złożeniu sprawozdań przez Prezydenta, Sekretarza Generalnego i Skarbnika odbyły się wybory nowych członków Komitetu Wykonawczego, na miejsce tych, których kadencja w bieżącym roku wygasła. Po wyborach skład Komitetu Wykonawczego przedstawia się następująco:

Prezydent:	— Dr J. A. N. Corsellis	— Wielka Brytania,
Były prezydent:	— Dr F. Seitelberger	— Austria,
Vice-prezydenci:	— Dr M. Finlayson	— Kanada,
	Dr G. Gosztanyi	— Węgry,
	Dr K. Jellinger	— Austria,
	Dr H. de F. Webster	— USA,
Sekretarz Generalny:	— Dr J. H. Adams	— Wielka Brytania,
Redaktor Newsletter:	— Dr D. Balentine	— USA,
Skarbnik:	— Dr J. Ulrich	— Szwajcaria,
Członkowie:	— Dr A. Escobar	— Meksyk,
	Dr R. Escourolle	— Francja,
	Dr M. Haltia	— Skandynawia,
	Dr W. Wechsler	— Republika Federalna Niemiec,
	Dr S. Aronson	— USA,
	Dr T. Horner	— Rumunia,
	Dr E. Reske-Nielsen	— Dania

W skład Rady Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego w r. 1980 wchodzi następujący delegaci towarzystw krajowych:

Argentyna	— vacat
Austria	— Dr K. Jellinger
Belgia	— Dr J. Flament-Durand
Bulgaria	— vacat
Kanada	— Dr S. Ludwin
Czechosłowacja	— Dr S. Jirasek
Francja	— Dr S. Brion, Dr Jean-Jacques Hauw
NRD	— Dr H. Schulze, Dr G. W. Kreutzberg
RFN	— Dr P. Kleihues
Wielka Brytania	— Dr Betty Brownell, Dr B. E. Tomlinson
Węgry	— Dr L. Leel-Össy
India	— Dr D. K. Dastur
Italia	— Dr A. Allegranza, Dr N. Rizzuto, Dr. O. Bugiani
Japonia	— Dr H. Shiraki, Dr T. Yonezawa
Holandia	— Dr F. C. Stam
Polska	— Dr J. Dymecki, Dr M. Wender
Rumunia	— Dr T. Horner, Dr A. Kreindler
Skandynawia	— Dr E. Reske-Nielsen, Dr A. Torvik
Hiszpania	— Dr J. Escaloma
Szwajcaria	— Dr Rabinowicz
USA	— Dr S. M. Aronson, Dr M. Bornstein, Dr N. Gonatas, Dr E. P. Richardson, Dr H. de F. Webster.

MIROSLAW OWSIANOWSKI, MIECZYSLAW WENDER

INCORPORATION OF [2- 14 C] DL — MEVALONIC ACID INTO BRAIN CHOLESTEROL IN EXPERIMENTAL ALLERGIC ENCEPHALOMYELITIS (EAE)*

Department of Neurology, Academy of Medicine, Poznań
Head of the Department: Prof. dr M. Wender

Deviations of the cholesterol metabolism seem to play key role in pathological processes leading to injuries of the central myelin. The cholesterol content has been shown to decrease in both, spontaneous and experimental demyelinating diseases (Wender et al., 1974, 1979). At the same time esterification processes of free cholesterol become enhanced.

Smith (1966) has shown that encephalomyelitic processes do affect not only myelin but also other membranes of the nervous tissue. The same author (1965), when investigating this very problem on the model of EAE have found that most cerebral lipids, are synthesized at higher rates during this experimental disease. Contrary to that, the incorporation of [14 C] — glucose into cerebral cholesterol was unaltered or even decreased. However, labelled glucose or acetate are not the specific metabolic precursors of cholesterol, hence their incorporation rates may not be indicative of the cholesterol metabolism in pathological states. We have therefore used intracerebral administration of labelled mevalonate, the natural specific precursor of cholesterol for investigating turnover of cerebral cholesterol in EAE.

MATERIAL AND METHODS

Adult Wistar rats of either sex, weighing 200—250 g, were used as experimental animals. The animals were immunized according to Paterson (1960) by a single intradermal injection of 0.1 ml of encephalitogenic mixture applied into the pads of animals hind legs. The encephalitogenic mixture was prepared

* The investigations were supported by NIH PL 480 Research Agreement No 05-092.

as follows: a 40% fresh homogenate of guinea pig spinal cord was emulsified *ana partes* with the complete adjuvant, containing Bayol F, Arlachel A and a solution of *Mycobacterium tuberculosis* H37RV/4 mg/ml).

The experiments were conducted on animals comprising two different stages of the induced disease: 7 days after administration of the pathogenic mixture, i.e. during the preparalytic stage, and 14 days after immunization, i.e. at the time of fully developed pathological symptoms. In the latter group, only such brains, which developed a strong inflammatory reaction, i.e. brains which showed numerous fields of infiltration as well as those which had a disseminated or diffuse inflammatory reaction in each field of vision at small microscopic magnification were selected and evaluated.

Biochemical methods. The sodium salt of [$2\text{-}^{14}\text{C}$] DL-mevalonic acid (specific activity 30.6 mC/mM) purchased from C.E.A., Paris, France, was used as the cholesterol precursor. An aqueous solution of the isotope (50 $\mu\text{Ci}/1.2\text{ ml}$) was injected intracerebrally (0.03 ml/100 g of body weight) according to the technique of Nicholas and Thomas (1959). In order to achieve good precision of intracerebral injection a stereotaxic apparatus was used for introduction of the cholesterol precursor. The apparatus was constructed according to technical indications of Chevallier and Gautheron (1969). The experimental animals were killed by decapitation at different periods after intracerebral injection, i.e. after 1, 6, 12, 24 and 48 hours. The biochemical assays were performed on brains of 10 animals in each of these periods.

Cholesterol and cholesterol esters of the cerebral white matter were separated by means of thin layer chromatography according to Svennerholm (1964). The separated compounds were quantitated after Sperry and Webb (1950). Radioactivity was determined in the Nuclear Enterprises scintillation spectrometer.

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

RESULTS

Clinical observations. The immunized animals did not develop diffuse encephalomyelitis until the 12th day after inoculation.

Morphological studies. Histological slices demonstrated an inflammatory reaction mainly in the perivascular and subependymal region with prevalence of pathological changes in the brain stem. Marked inflammatory changes were seen in the choroid plexus. Perivascular demyelination appeared only occasionally.

Biochemical findings. The cholesterol content in the cerebral white matter was decreased in both experimental groups by about 20%, in early and in the

late experimental period. In both groups significantly increased amounts of esterified cholesterol were found. These results are presented in table 1.

Table 1. Cholesterol and cholesterol esters in white matter of brain in EAE (g/100 g of dry weight)
Tabela 1. Cholesterol i estry cholesterolu w istocie białej mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (g/100 g suchej masy tkanki)

	Cholesterol Cholesterol	Cholesterol esters Estry cholesterolu
Control animals Zwierzęta kontrolne	12.2 ± 0.23	traces ślady
7 days after inoculation 7 dni po szczepieniu	10.1 ± 0.29*	0.3 ± 0.08*
14 days after inoculation 14 dni po szczepieniu	9.6 ± 0.32*	0.6 ± 0.21*

Mean ± S.E.

Średnia ± średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

* Differences significant at the level of $p < 0.05$

* Różnice istotne przy poziomie $p < 0,05$

The radioactivities incorporated into cholesterol are presented in table 2. The data obtained in normal rats showed that the injected radioactive mevalonic acid was actively incorporated into cholesterol of the white matter. The specific activity of cholesterol increased over a period of 48 hrs from 1089 cpm/mg 1 hour after injection till almost 4000 cpm/mg after 48 hrs. This indicates that in normal rats, an active uptake and incorporation of the radioactive precursor of cholesterol continued over the whole period of investigation.

In animals injected with the isotope during the preparalytic stage of the experimental disease, an entirely different pattern of incorporation rates was observed. In these rats, the specific radioactivity reached by cholesterol during the first six hours was about 70% higher than in control animals. During the following 6 hrs, the specific radioactivity of cholesterol dropped considerably to remain at an almost unchanged level till 48 hrs after injection of the radioactive precursor. However, in comparison with the respective time — matched control brains, significantly lower specific radioactivities were found in white matter cholesterol of the immunized rats examined 24 and 48 hrs after administration of the cholesterol precursor.

The specific radioactivities reached by the white matter cholesterol in rats injected with the labelled precursor during the paralytic stage of EAE were comparable to those observed in the control group but only during the

Table 2. Cholesterol specific radioactivity (cpm \times mg $^{-1}$) in white matter of brain after intracerebral injection of 14 C mevalonate in EAE

Tabela 2. Radioaktywność właściwa cholesterolu (cpm \times mg $^{-1}$) w istocie białej mózgu po domózgowym wstrzyknięciu 14 C mewalonianu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia

Time (hrs) after intracerebral injection Czas (godz.) po wstrzyknięciu domózgowym	Control animals Zwierzęta kontrolne	7 days after inoculation 7 dni po szczepieniu	14 days after inoculation 14 dni po szczepieniu
1	1089 \pm 48	1879 \pm 91*	1204 \pm 132
6	1421 \pm 74	2319 \pm 135*	1467 \pm 170
12	1956 \pm 52	1898 \pm 46	1362 \pm 136
24	3059 \pm 70	1996 \pm 139*	1777 \pm 201*
48	3901 \pm 79	2452 \pm 161*	2496 \pm 127*

Mean \pm S.E.

Średnia \pm średni błąd średniej

Number of animals in each group: 10

Liczba zwierząt w każdej grupie: 10

* Differences significant at the level of $p < 0.05$

* Różnice istotne przy poziomie $p < 0,05$

first 12 hours after administration of the label. The white matter cholesterol examined 24 and 48 hrs after injection of C^{14} -mevalonate showed significantly lower specific radioactivities than the cholesterol of control brains.

DISCUSSION

Decreased contents of cholesterol in the white matter of brains affected by EAE are well documented. However, this does not mean that the reduction reflects losses of cholesterol from the sheaths. Our earlier studies (Wender et al., 1975) indicated that cholesterol itself constitutes the most stable myelin lipid component.

Smith (1966) who investigated the rates on *in vitro* incorporation of labelled glucose C^{14} into white matter cholesterol of rats with EAE concluded that in contrary to other lipid components of the white matter cholesterol synthesis was below normal in the acute, paralytic EAE animals, then rose to above normal, during the recovery period.

Our result on the *in vitro* incorporation of mevalonate, the immediate precursor of cholesterol, indicate that in the sensitized rat examined during the preparalytic stage of EAE, the white matter cholesterol pool showed a significantly increased turnover rate of cholesterol as indicated by the significantly increased (73 and 64%) specific radioactivities of cholesterol during the first 6 hours after intracerebral injection of the labelled precursor,

and by the significantly lower specific radioactivities of this compound 12, 24 and 48 hours following administration of mevalonate.

The same conclusion suggesting an increased turnover of the white matter cholesterol holds true for the acute, paralytic stage of EAE, despite of the fact, that the early synthetic rates (1, 6 hrs after injection of the labelled precursor) were comparable to those observed in normal rats, and this because in that experimental group the newly synthesized, labelled cholesterol did not accumulate during the forthcoming period of investigation at rates comparable to those observed in control animals.

The most likely explanation for the results obtained in our study, where the blood brain barrier has been eliminated by the experimental conditions is, that the pathological process of EAE (immunization) could have relieved the normally functioning inhibitory controls with the effect that more rapid turnover rates of the white matter cholesterol would result. Inflammation followed by demyelination, even if morphologically not outstanding, can function as a means that remove final or intermediate products of cholesterol metabolism thus paving the way for increased metabolic rates.

Our results and implication are apparently in contradiction to those reported by Smith (1965, 1966). The author used C^{14} glucose as the possible metabolic precursor for cholesterol. This compound however is only a poor precursor of cholesterol synthesis in the brain. The experimental approach used by Smith (1966) — *in vitro* incorporation into brain slices incubated for 2 hrs with the labelled precursor did not give an account of turnover rates of the synthesized metabolites.

The results presented herewith, as well as those reported in the literature on the metabolism of Nitrogen compounds, micro- as well as macromolecular ones, and on the deviated activities of various enzymes (Tursky, 1968; Wajda et al., 1969; Wender, Zgorzalewicz, 1972) show evidently that many metabolic routes of the nervous tissue are severely affected by the immunologically evoked inflammatory process. These alterations become evident during the early, preparalytic stage of the disease, during which morphological exponents of the inflammatory process are lacking. A similar situation as far as the cholesterol metabolism is concerned, has been observed as well in the course of TET induced brain edema and in cyanide encephalopathy (Owsianowski, 1975a, b).

M. Owsianowski, M. Wender

WBUDOWYWANIE [^{14}C] DL — KWASU MEWALONOWEGO DO CHOLESTEROLU MÓZGU W DOŚWIADCZALNYM ALERGICZNYM ZAPALENIU MÓZGU I RDZENIA

Streszczenie

U dorosłych szczurów rasy Wistar wywoływano doświadczalne alergiczne zapalenie mózgu i rdzenia (EAE) przy pomocy techniki Patersona (1960). Immunizowanym zwierzętom poda-

wano domózgowo [$2\text{-}^{14}\text{C}$] DL — kwas mewalonowy w ilości 0,03 ml/100 g wagi ciała, a następnie oznaczano radioaktywność w wyizolowanym chromatograficznie cholesterolu.

1. W przedporażonym okresie EAE stwierdza się znamienne podwyższony obrót metaboliczny cholesterolu istoty białej mózgu.

2. W ostrym, porażonym okresie EAE szybkość syntezy cholesterolu istoty białej mózgu ze znakowanego prekursora nie różni się znamienne od zwierząt kontrolnych, jednak akumulacja piętna izotopowego jest znamienne niższa w porównaniu ze zdrowymi zwierzętami.

3. Proces patologiczny EAE wydaje się obniżać fizjologiczne bariery, hamujące metabolizm cholesterolu w istocie białej mózgu.

4. Zaburzenia metaboliczne cholesterolu istoty białej w EAE wyprzedzają uchwytne morfologicznie wykładniki procesu zapalnego.

M. Овсяновски, М. Вендер

ВСТРОИВАНИЕ [$2\text{-}^{14}\text{C}$]DL — МЕВАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ
В ХОЛЕСТЕРОЛ МОЗГА
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛЛЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ ГОЛОВНОГО
МОЗГА И СПИННОГО МОЗГА

Резюме

У взрослых крыс породы Вистар вызывали экспериментальное аллергическое воспаление головного и спинного мозга (ЕАЕ) при помощи техники Патерсона (1960). Иммунизированным животным вводили внутрь мозга [$2\text{-}^{14}\text{C}$]DL — мевалоновую кислоту в количестве 0,03 мл/100 г веса тела, а затем определяли в хроматографически изолированном холестероле радиоактивность.

1. В период до выступления паралича обнаруживается достоверно повышенный метаболический оборот холестерина белого вещества мозга.

2. В острый период ЕАЕ паралича скорость синтеза холестерина белого вещества мозга из меченного прекурсора не отличается достоверно от скорости этого процесса у контрольных животных, однако аккумуляция изотопной метки является досоверно низшая по сравнению с контрольными животными.

3. Патологический процесс ЕАЕ, как кажется, снижает физиологические барьеры тормозящие метаболизм холестерина в белом веществе мозга.

4. Метаболические нарушения холестерина белого вещества в ЕАЕ опережают морфологически наблюдаемые показатели воспалительного процесса.

REFERENCES

1. Chevallier F., Gautheron C.: Method for study of cholesterol biosynthesis in the central nervous system. Incorporation of [$2\text{-}^{14}\text{C}$] mevalonic lactone after intraperitoneal, intracisternal and intraventricular administration in the rat. *J. Neurochem.* 1969, 16, 323—331.
2. Nicholas H., Thomas B.: The metabolism of cholesterol and fatty acids in the central nervous system. *J. Neurochem.* 1959, 4, 42—49.
3. Owsianowski M.: Cholesterol metabolism in rat brain during experimental cyanide encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1975a, 13, 423—431.
4. Owsianowski M.: Cholesterol biosynthesis by rat brain in triethyl tin intoxication. *Neuropat. Pol.* 1975b, 13, 433—440.
5. Paterson P.: Transfer of experimental allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J. Exp. Med.* 1960, 111, 119—136.

6. Smith M.: Lipid biosynthesis in the central nervous system in experimental allergic-encephalomyelitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1965, 122, 95—103.
7. Smith M.: In vitro synthesis of myelin in normal and demyelinating rats. *Nature (Lond.)* 1966, 209, 1031.
8. Sperry M., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* 1950, 187, 97—106.
9. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.* 1964, 11, 839—859.
10. Turský T.: Asparaginase in experimental allergic encephalomyelitis. VII. The rise of asparaginase and proteosynthesis. *Fol. Facult. Med. Univ. Com. Bratisl.* 1968, 6, 7—36.
11. Wajda J., Lee J., Neidle A.: Transglutaminase levels in brain and reticuloendothelial cells during allergic encephalomyelitis determined by a radiochemical method. *J. Neurochem.* 1969, 16, 655—663.
12. Wender M., Zgorzalewicz B.: Activity of sRNA amino acyl synthetases in the brain during experimental allergic encephalomyelitis. *Z. Neurol.* 1972, 203, 235—244.
13. Wender M., Adameczewska Z.: Lipidveränderungen im Gehirn bei Krankheiten, die mit Myelinschädigung verbunden sind, in „Neue Forschungsergebnisse des Hirnstoffwechsels und der Entmarkungsenzephalomyelitis“. Hrsg. R. Schmidt, Halle-Wittenberg, 1974, 248—255.
14. Wender M., Adameczewska Z.: Cerebral lipids in cases of postcomatous encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 119—128.
15. Wender M., Adameczewska Z., Pankrac J., Goncerzewicz A.: Myelin lipids in experimental allergic encephalomyelitis. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 209—217.
16. Wender M., Adameczewska-Goncerzewicz Z., Goncerzewicz A.: Myelin lipids in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. *Exp. Path.* 1979, 17, 334—339.

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

c. d. ze str. 188

Reprezentant grupy
krajów nie mają-
cych swych stałych
przedstawicieli — Dr A. Escobar

Funkcję Archiwisty Towarzystwa po ustąpieniu Dr M. Moora przyjął Dr K. Earle (USA).

Następnie omówiono sprawę organizacji kolejnych międzynarodowych kongresów neuropatologicznych, które planowane są:

- IX Kongres w r. 1982 w Wiedniu (przewodniczący Komitetu Organizacyjnego — prof. F. Seitelberger),
- X Kongres w r. 1986 w Sztokholmie (przewodniczący Komitetu Organizacyjnego — prof. P. Sourander),
- XI Kongres w r. 1990 — w Japonii. Szczegóły zostaną ustalone w terminie późniejszym.

Datę następnego posiedzenia Rady wyznaczono na 5.IX.1982 r. w Wiedniu.

Szczegółowe informacje dotyczące IX Międzynarodowego Kongresu Neuropatologicznego przedstawił prof. F. Seitelberger. Odbędzie się on w okresie od 5 do 10 września 1982 w salach Hofburgu, w Wiedniu.

Na Sekretarza Generalnego Komitetu Organizacyjnego powołany został dr H. Lassmann, na Skarbnika prof. H. Tschabitscher, na Koordynatora Naukowego prof. K. Jellinger. Kongres odbędzie się pod auspicjami Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego oraz Austriackiego Towarzystwa Neuropatologicznego.

Struktura programu obejmuje sesje plenarne, sympozja tematyczne, konferencje okrągłego stołu, sesje posterowe, seminaria poświęcone dyskusji nad preparatami oraz wykłady zaproszonych gości.

Ustalono wstępnie, że głównymi tematami Kongresu będą:

- uraz i regeneracja o. u. n.,
- mechanizmy transportu naczyniowo-mózgowego,
- neuropatologia genetyczna i rozwojowa,
- zapalenie i demielinizacja.

Na zakończenie posiedzenia omówiono budżet Kongresu, kładąc nacisk na to, aby opłata kongresowa nie była zbyt wysoka, co ma znaczenie dla umożliwienia udziału w Kongresie młodym neuropatologom z całego świata.

*

* *

W czasie trwania Pierwszego Europejskiego Kongresu Neuropatologicznego w Wiedniu w dniu 7 maja 1980 r. odbyło się spotkanie Zarządu Międzynarodowego Towarzystwa Neuropatologicznego z przewodniczącym lub reprezentantami towarzystw krajowych, celem powołania Europejskiej Federacji Towarzystw Neuropatologicznych.

Inicjatywa powołania Federacji wyszła od prof. K. Jellingera (Austria), prof. F. Gulotty (RFN) i prof. Mossakowskiego, którzy byli też inicjatorami zorganizowania I Europejskiego Kongresu.

Na spotkaniu tym ustalono, że Prezydentem Federacji będzie każdorazowy Przewodniczący Komitetu Organizacyjnego kolejnego Europejskiego Kongresu Neuropatologicznego. Kongresy będą odbywać się co 4 lata w różnych krajach. Ustalono, że najbliższy Kongres odbędzie się w r. 1984 w Warszawie. Na Przewodniczącego Komitetu Organizacyjnego powołano prof. M. Mossakowskiego. Będzie on więc do r. 1984 jednocześnie Prezydentem Europejskiej Federacji Towarzystw Neuropatologicznych.

Jerzy Dymecki

MARIA SKONIECZNA, MARIA WIERCIAK, IWONA ŚCISŁOWSKA
WŁODZIMIERZ BICZ

INFLUENCE OF CHLORFENVINPHOS AND IPOFOS ON OXIDO- -REDUCING PROCESSES IN THE RAT BRAIN MITOCHONDRIA DURING DEVELOPMENT*

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, Warszawa
Head: Prof. dr W. Bicz

Numerous data indicate that the functional and morphological development of the brain is dependent on increased enzyme activity including the mitochondrial enzymes (Tevari, Bourne, 1962; Salvay et al., 1968; Altman, Das, 1970; Land et al., 1977). The enhancement of activity of the respiratory chain enzymes may depend, on one hand, on their synthesis, and on the other, on the development of membranes which in mature individuals take on the most active conformational form. It is a known fact that enzymic systems engaged in the process of ATP resynthesis are dependent on or regulated by membrane phospholipids (Green, Tzagoloff, 1966; Yu Chang-An, King, 1975). Thus, the increase of cytochrome oxidase, succinate dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase activity observed by numerous authors may be connected with the increasing integration of enzymic proteins in the membranes (Seiler, 1969; Land et al., 1977; Zalewska et al., 1977). The foregoing facts prompted us to investigate the influence of the organophosphorus compounds of Chlorfenvinphos and its structural analogue Ipofofos (IPO-62) on oxidative-reductive processes in mitochondria of the developing rat brain.

It has been earlier established that both these insecticides modify the process of oxidative phosphorylation in mitochondria of the mature rat brain (Sitkiewicz et al., 1978).

The molecular mechanism of this effect has not so far been elucidated, but a number of papers point to the interaction of insecticides with membrane phospholipids (Kiełducka, Sitkiewicz, 1977; Antunes-Madeira, Madeira, 1979). If the hypothesis is correct that the development of mitochondrial

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

enzyme activity is linked with membrane development, significant differences may be expected in the action of insecticides on the mitochondria of rat brain at various periods of development of the individual.

MATERIAL AND METHODS

Animals. White rats of both sexes aged 4, 8, 16, 32, 42 and 56 days were used for the experiments. The animals originated from an inbred culture, and were randomly paired.

Preparation of mitochondrial fraction. The rats were decapitated, the brain hemispheres were isolated and placed in cooled isolation medium consisting of: 225 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5.0 mM tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM K^+ EDTA and then washed twice. The tissue was homogenized in a Potter homogenizer with teflon pestle. The mitochondrial fractions were isolated according to the method of Moore and Jöbsis (1970) at 0°–4° C.

Oxygen uptake measurement. Oxygen uptake was determined at 29° C by the polarographic method with the use of a Clark type oxygen electrode. Oxygen uptake in the presence of potassium succinate (3.5 mM) or potassium glutamate (10 mM) and potassium malate (5 mM) was designated as state 4 of respiration. State 3 of respiration was induced by adding 300 nmoles ADP. The phosphorylation index ADP/O and the ratio respiration control were calculated after Estabrook (1967). Protein was determined by the biuret method (Layne, 1957) after previous solubilization of the mitochondrial fraction with sodium deoxycholate (final concentration 0.5%).

Reagents. Chlorfenvinphos (Birlane) -0,0-diethyl-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) vinylphosphate 94 per cent (Shell). The IPO-62 preparation — 0,0-diethyl-2-bromo-1-(2,4-dichlorophenyl) vinyl phosphate 84 per cent, was received from the Institute of Organic Industry, Warszawa, mannitol was a BDH, L-malic acid a Koch Light, L-glutamic acid and sucrose — Sigma products. The remaining reagents were of pure for analysis grade products of the POCh, Gliwice.

RESULTS

Oxygen uptake in respiration states 3 and 4 by the mitochondrial fraction from the brains of different-aged animals is shown in Fig. 1. The lowest respiratory activity in state 4 was noted in mitochondrial fractions isolated from animals 4 days old. The uptake of oxygen by mitochondrial fractions gradually increased with the age of the animals. The highest activity was recorded on the 32nd day of life. The respiration intensity of the studied fractions slightly decreases in the period between the 32nd and the 56th day of life. Follow-up of the kinetics of changes in mitochondrial respiratory

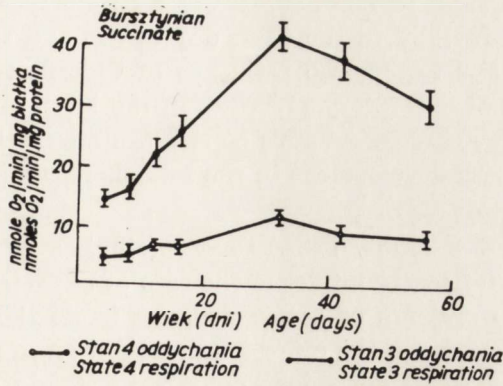


Fig. 1. O₂ uptake by rat brain mitochondria, oxidizing succinate, as a function of age. Data represent mean values from 9–10 experiments. Vertical bars indicate S.E.M.

Ryc. 1. Zużycie tlenu przez mitochondria mózgu, utleniające bursztynian, jako funkcja wieku. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z 9–10 doświadczeń ± średnie odchylenie od średniej arytmetycznej.

activity in state 3 demonstrated a rapid increase in the rate of oxygen utilization in the period between the 8th and 32nd day of life. Brain mitochondrial fractions isolated from 32-day-old animals exhibited the highest respiratory activity (42 nmol O₂ /min/mg protein). It was about three times higher than that in the fraction from 4-days old animals. In later life period (56 days) respiratory activity was depressed by about 25 per cent. A similar dynamics of respiratory activating changes in the process of individual development was observed in the mitochondrial fraction oxidizing glutamate with malate (Fig. 2.)

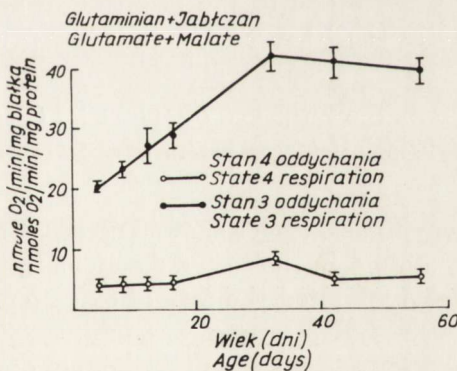


Fig. 2. O₂ uptake by rat brain mitochondria, oxidizing glutamate + malate, as a function of age. Data represent mean values from 9–10 experiments. Vertical bars indicate S.E.M.

Ryc. 2. Zużycie tlenu przez mitochondria mózgu, utleniające glutaminian + jablczan, jako funkcja wieku. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z 9–10 doświadczeń ± średnie odchylenie od średniej arytmetycznej.

The rate of oxidation of these substrates by mitochondria in respiratory state 3 increases markedly to the 32nd day of life and remains unchanged to the 56th day. For testing the influence of Chlorfenvinphos and Ipofos on the mitochondrial respiratory processes in the brain, animals aged 4, 16, 32 and 56 days were chosen. Animals at this age are in the dynamic period of respiratory activity development in the mitochondrial brain fractions and in the period of maturity.

The data in Fig. 3 indicate that Chlorfenvinphos in the concentrations applied did not significantly influence the rate of oxygen uptake in respiratory state 4 in the presence of both substrates in all the tested periods of individual development. On the other hand, inhibition of respiratory state 3 (in the presence of ADP) dependent on the insecticide concentration was observed. The degree of inhibition by Chlorfenvinphos (100 μM) became more severe with the age of the animals amounting to 25 and 55 per cent, respectively in fractions isolated from the brains of rats aged 4 and 32 days, in the presence of glutamate with malate as substrate. Chlorfenvinphos in the highest concentration (500 μM) completely arrested respiration in state 3 of the rat brain mitochondrial fractions from animals aged 16, 32, and 56 days, whereas in fractions from 4-days-old animals ADP stimulated oxygen uptake to a double value. Similar results were obtained with the insecticide if succinate was used as respiratory substrate (Fig. 3B). Inhibition by Chlorfenvinphos (100 μM) of oxygen utilization in respiratory state 3 in the presence of both substrates was associated with a decrease in the value of the phosphorylation index ADP/O. This was statistically significant only for fractions from brains of animals aged 32 days (Table 1). A depression of respiratory control ratio (RCR) was observed parallel with changes in the respiratory activity of the mitochondria due to the pesticide in all the periods of life studied. The decrease in the RCR was most pronounced in fractions from 32-day-old rats.

In further experiments the influence of Ipofos (IPO-62) on the respiratory activity of mitochondria isolated from brains of different-aged animals (Fig. 4) was investigated.

Similarly as Chlorfenvinphos, Ipofos showed no effect on the rate of oxygen uptake in respiratory state 4 in the tested fractions in the presence of both substrates. The pesticide inhibited the rate of oxidation of both respiratory substrate in the presence of ADP (state 3). The mitochondrial brain fractions from animals chosen in certain periods of individual development exhibited different intensities of the changes in respiratory activity. The highest degree of inhibition reaching 69 per cent was noted in the mitochondria isolated from 56-day-old rats when pesticide concentration was 250 μM and the oxidated substrate was glutamate with malate. Under the same experimental

Table 1. The effect of Chlorfenvinphos on oxidative phosphorylation of brain mitochondria derived from rats of different ages

Tabela 1. Wpływ Chlorfenvinfosu na oksydacyjną fosforylację mitochondriów mózgu szczurów w różnym wieku

Age (days) Wiek (dni)	Insecticide concentration (μM) Stężenie insektycydu (μM)	Respiratory substrate Substrat oddechowy			
		Glutamate + malate glutaminian + jabłczan ADP/O RCR		Succinate bursztynian ADP/O RCR	
	Control Kontrola	2.30 ± 0.08	5.78 ± 0.76	1.62 ± 0.04	3.29 ± 0.45
4	50	2.27 ± 0.04	5.32 ± 0.32	1.58 ± 0.06	2.95 ± 0.37
	100	2.25 ± 0.06	4.45 ± 0.31	1.55 ± 0.04	2.72 ± 0.32
	500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Control Kontrola	2.51 ± 0.07	6.39 ± 0.67	1.76 ± 0.11	3.94 ± 0.42
16	50	2.48 ± 0.08	6.00 ± 0.32	1.70 ± 0.04	3.84 ± 0.25
	100	2.35 ± 0.06	4.48 ± 0.56	1.70 ± 0.08	2.95 ± 0.31
	500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Control Kontrola	2.71 ± 0.08	6.79 ± 0.89	1.89 ± 0.06	4.56 ± 0.21
32	50	2.38 ± 0.08	4.98 ± 0.80	1.65 ± 0.10	3.12 ± 0.38
	100	2.26 ± 0.07*	2.47 ± 0.32*	1.60 ± 0.04*	2.54 ± 0.28*
	500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Control Kontrola	2.69 ± 0.08	7.42 ± 0.67	1.67 ± 0.12	3.96 ± 0.30
56	50	2.53 ± 0.04	5.80 ± 0.72	1.57 ± 0.07	3.36 ± 0.22
	100	2.39 ± 0.06	5.30 ± 0.56	1.37 ± 0.08	2.74 ± 0.41
	500	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Results are mean values from 5 experiments \pm S.E.M.

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z 5 doświadczeń \pm średnie odchylenie od średniej arytmetycznej

ADP/O — phosphorylation index
iloraz fosforylacyjny

RCR — respiratory control ratio
stosunek kontroli oddechowej

n.d. — not detectable nieoznaczalne
significantly different at $p \leq 0.05$
x — różnice statystycznie znamienne
 $p \leq 0,05$

conditions inhibition of respiration in state 3 was lower in mitochondria isolated from 4-day-old animals amounting to 55 per cent. Polarographic records illustrating the effect of Ipfos (250 and 500 μM) on oxygen uptake

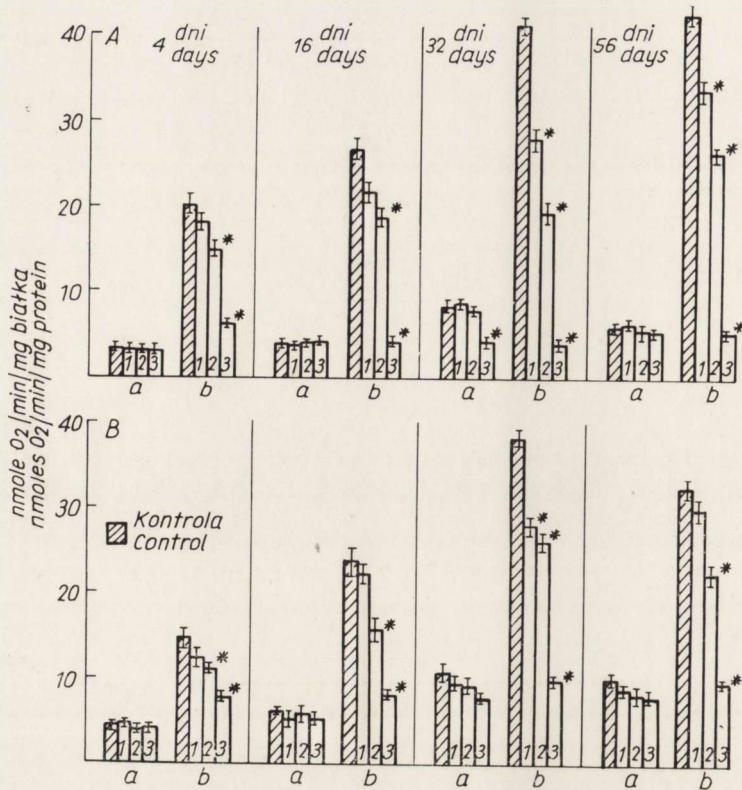


Fig. 3. The effect of Chlorfenwinfos on the respiration of brain mitochondria from rats of different ages. Data represent mean values from 5 experiments. Vertical bars indicate S.E.M. Respiratory substrates: A—glutamine + malate, B—succinate, 1—50 μM Chlorfenwinfos, 2—100 μM Chlorfenwinfos, 3—500 μM Chlorfenwinfos, a—state 4 respiration, b—state 3 respiration, *)—statistically significant differences at $p < 0.05$.

Ryc. 3. Wpływ Chlorfenwinfosu na oddychanie mitochondriów mózgu szczurów w różnym wieku. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne z 5 doświadczeń \pm średnie odchylenie od średniej arytmetycznej. Substraty oddechowe: A—glutaminian + jabłczan, B—bursztynian, 1—50 μM Chlorfenwinfos, 2—100 μM Chlorfenwinfos, 3—500 μM Chlorfenwinfos, a—stan 4 oddychania, b—stan 3 oddychania, *)—różnice statystycznie znaczne z $p < 0,05$.

in the presence of succinate by mitochondrial brain fractions from 4- and 32-day-old animals are shown in Fig. 5.

It results from the course of the records that Ipofos (250 μM) causes, parallel with respiration inhibition in state 3, a depression of the phosphorylation index and of the respiratory control value. The lowest ADP/O values (1.19 ± 0.08 , $n = 5$) were found in the brain mitochondrial fraction from animals 32-day-old in the presence of 250 μM Ipofos, whereas under control conditions ADP/O was 1.89 ± 0.06 ($n = 5$). In all the investigated fractions the pesticide in the highest concentration (500 μM) completely inhibited ADP-stimulated respiration.

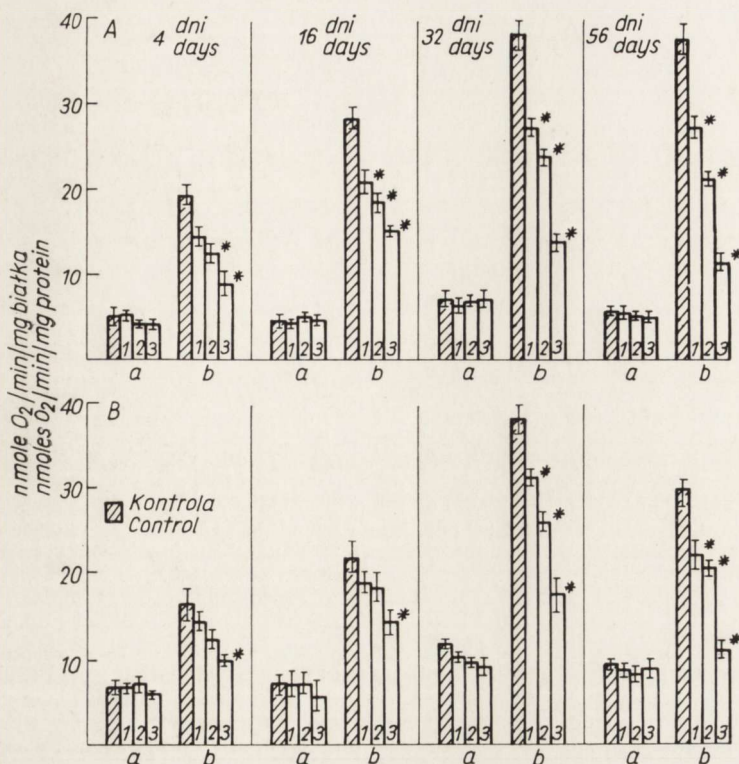


Fig. 4. The effect of Ipofos (IPO—62) on the respiration of brain mitochondria from rats of different ages. All abbreviations as in the legend to Fig. 3 except that 1—50 μM IPO — 62, 2—100 μM IPO—62, 3—250 μM IPO — 62.

Ryc. 4. Wpływ Ipofosu (IPO — 62) na oddychanie mitochondriów mózgu szczurów w różnym wieku. Wszystkie objaśnienia jak w legendzie do ryc. 3, z wyjątkiem: 1 — 50 μM IPO — 62, 2 — 100 μM IPO — 62, 3 — 250 μM IPO — 62.

When glutamate with malate was the oxidated substrate, the pesticide (250 μM) also produced a decrease of the phosphorylation index and of the respiratory control ratio. The control ADP/O values and those in the presence of Ipofos were for the mitochondrial fraction from 4-day-old animals 2.32 ± 0.12 ($n = 5$) and 1.59 ± 0.06 ($n = 5$), respectively, whereas from the fraction isolated from 32-day-old animals they were 2.68 ± 0.08 ($n = 5$) and 1.65 ± 0.04 ($n = 5$), respectively.

DISCUSSION

The development of the central nervous system is associated with an increased activity of numerous enzyme systems (Bennet et al., 1958; Bonavita et al. 1962; Salvay et al., 1968; Lajtha et al., 1979), including the mitochondrial

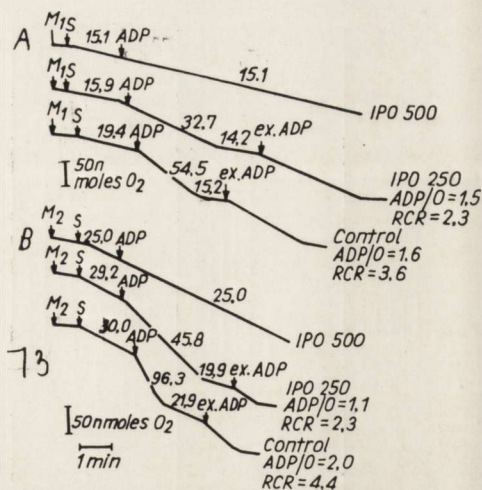


Fig. 5. The effect of Ipofos (IPO — 62) on the respiration of rat brain mitochondria. Mitochondrial fractions (M_1 , M_2), succinate (S) and ADP were added as shown. The numbers next to the traces are rates of respiration in nmol of oxygen/min. 10 μ l ethanolic solutions of insecticide were added to the incubation mixture in final concentrations as shown. A — mitochondria prepared from brains of 4-day-old rats, B — mitochondria prepared from brains of 32-day-old rats, M_1 — 2,74 mg mitochondrial protein, M_2 — 2,45 mg mitochondrial protein.

Ryc. 5. Wpływ Ipofosu (IPO — 62) na oddychanie mitochondriów mózgu szczura. Frakcje mitochondrialne (M_1 , M_2), bursztanian (S) i ADP dodawano jak wskazano na rycinie. Liczby przy liniach oznaczają szybkość oddychania w nmolach tlenu/min. 10 μ l etanolowych roztworów insektycydu dodawano do mieszaniny inkubacyjnej do stężenia końcowego wskazanego na rycinie. A — mitochondria mózgu szczurów 4 dniowych, B — mitochondria mózgu szczurów 32 dniowych. M_1 — 2,74 mg białka mitochondrialnego, M_2 — 2,45 mg białka mitochondrialnego.

enzymes (Tewari, Bourne, 1962; Murphy, Rappoport, 1963; Milstein et al., 1968; Land et al., 1977). The rapid metabolic turnover of proteins, nucleic acids of phospholipids necessitates a constant energy supply. As demonstrated in the present paper, the brain mitochondria of 4-day-old rats are already fully capable of phosphorylating ADP as measured by the phosphorylation index ADP/O. In this period, however, oxygen utilization was much lower in respiratory state 3 (in the presence of ADP) as compared to that in the brain of mature animals. Maximal development of respiratory ability occurred around day 32 of life and did not undergo further up to full maturity. Particularly noteworthy is the fact that, in spite of significant differences in the rate of oxygen uptake in respiratory state 3, in the investigated period between day 4 to day 56 of life, the phosphorylation quotient ADP/O underwent only slight changes, both in the presence of succinate and glutamate with malate as substrates. These results seem to suggest that brain mitochondria of newborn rats (4-day-old) have fully efficient all three sites of coupling of oxidative phosphorylation with electron transport in the respiratory chain, and the activity of the enzymes of the inner mitochondrial membrane is the factor limiting the rate of ATP resynthesis. The enzymes of the respiratory chain

are known to require the presence of phospholipids for developing their full activity (Fleischer, Klonwen, 1961; Lenaz et al., 1970). It is also a known fact that phospholipids are a factor which integrates membranes, this making possible "molecularization" of enzymes into their most active conformation (Green, Tzagoloff, 1966). It seems, therefore, that the observed increase of the activity of the particular enzymes of the respiratory chain (Page et al., 1971; Holtzman, Moore, 1973; Land et al., 1977) and the respiratory capacity consist in building into the not fully developed membrane phospholipid molecules. This leads to an active conformation of the enzymatic systems engaged in energy transfer processes.

The above suggested mechanism of activity increase of the respiratory chain during development finds support in the effect of the organophosphorus compounds Chlorfenvinphos and Ipfos on respiration of mitochondria from brains of different-aged rats of 4, 16, 32, and 56 days. The experiments of Kielducka and Sitkiewicz (1977) indicate that the intensity of action of organophosphorus compounds on cytochrome oxidase activity depends on the quantitative relations between phospholipids and the insecticide applied, and the mechanism of action of the later consists in modifying the protein-phospholipids interaction. According to this hypothesis it may be assumed that the membrane phospholipids constitute a kind of "receptors" for organophosphorus compounds with a high affinity to lipids. Thus, in "young" membranes not yet mature there is a smaller number of receptor sites than in fully developed ones. This suggestion would explain the fact of the weaker effect to both tested insecticides on mitochondrial respiration in the brains of rats aged 4 and 16 days than on that of 32- and 56-day-old animals.

The experiments of Zalewska et al. (1977) indicate, that poisoning of pregnant females with organophosphorus insecticides depresses succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in brain mitochondria of the progeny in the period up to day 16 of life, however according to the suggestions of these authors, this is not the effect of a direct action of the insecticide on the enzymes, but the result of delay in the development of the central nervous system as the consequence of the mother's intoxication.

M. Skonieczna, M. Wierciak, I. Ścisłowska, W. Bicz

WPŁYW CHLORFENWINFOSU I IPOFOSU NA PROCESY OKSYDOREDUKCYJNE W MITOCHONDRIACH MÓZGU SZCZURA PODCZAS ROZWOJU

Streszczenie

Badano aktywność oddechową mitochondriów mózgu szczura w różnym wieku. Stwierdzono, że podczas rozwoju osobniczego następuje wzrost szybkości zużycia tlenu przez frakcje mitochondrialne w obecności glutaminianu z jablczanem oraz bursztynianu jako substratów oddechowych. Najwyższą aktywność oddechową wykazują frakcje mitochondrialne izolowane z mózgu zwierząt 32-dniowych.

Badania wpływu Chlorfenwinfosu i Iprofosu na procesy oddychania i oksydacyjnej fosforylacji przeprowadzono na frakcjach mitochondrialnych mózgu szczurów w wieku 4, 16, 32 i 56 dni. Stwierdzono, że badane pestycydy powodują obniżenie szybkości zużycia tlenu przez mitochondria w stanie 3 oddychania, pogłębiające się wraz ze wzrostem stężenia tych związków oraz z wiekiem zwierząt. Chlorfenwinfos i Iprofos powodował wyższe hamowanie zużycia tlenu we frakcjach mitochondrialnych, pochodzących od zwierząt starszych (32 i 56 dni), w porównaniu do zmian obserwowanych we frakcjach izolowanych od zwierząt młodszych (4-dniowych). Stwierdzono również, że oba pestycydy powodują obniżenie ilorazu fosforylacyjnego ADP/O oraz wartości kontroli oddechowej, wskazujące na zaburzenia w procesach oksydacyjnej fosforylacji. Na uwagę zasługuje fakt, że statystycznie znaczne obniżenie wartości ADP/O obserwowano we frakcjach mitochondrialnych mózgu zwierząt 32-dniowych.

Mechanizm działania badanych pestycydów dyskutowany jest w aspekcie interakcji z fosfolipidami błon mitochondrialnych. W procesie rozwoju osobniczego wzrost zawartości fosfolipidów w błonach, które mogą być receptorami dla pestycydów, następuje równoległe ze zmianami aktywności oddechowej frakcji mitochondrialnych. Różnice w składzie fosfolipidowym błon mitochondrialnych frakcji izolowanych od zwierząt młodych i starszych mogą warunkować różną wrażliwość na badane pestycydy.

М. Сконечна, М. Верцяк, И. Съцисловска, В. Бич

ВЛИЯНИЕ ХЛОРФЕНВИНФОСА И ИПОФОСА НА ОКСИДОРЕДУКЦИОННЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ МОЗГА КРЫСЫ ВО ВРЕМЯ РАЗВИТИЯ

Резюме

Исследовали дыхательную активность митохондрий мозга крысы разного возраста. Было обнаружено, что во время онтогенеза имеет место увеличение скорости потребления кислорода митохондриальными фракциями в присутствии глутамината с малеатом и сукцината в качестве дыхательных субстратов. Самую высокую дыхательную активность обнаруживают митохондриальные фракции, изолированные из мозга у 32-дневных животных.

Исследования влияния Хлорфенвинфоса и Ипрофоса на процессы дыхания и оксидативной фосфорилиции проводились на митохондриальных фракциях мозга крыс возраста 4, 16, 32 и 56 дней. Обнаружено, что исследованные пестициды вызывают снижение скорости потребления кислорода митохондриями в состоянии 3 дыхания углубляющиеся вместе с увеличением концентрации этих соединений и с возрастом животных. Хлорфенвинфос и Ипрофос вызывал более высокое торможение потребления кислорода в митохондриальных фракциях от старших животных (32 и 56 дней) чем во фракциях изолированных от младших (4-дневных) животных. Было обнаружено также, что оба пестициды вызывают снижение фосфорилиционного частного ADP/O и контрольного показателя, что указывает на нарушение процессов оксидативной фосфорилиции. На внимание заслуживает факт, что статистически достоверное снижение величины ADP/O наблюдалось в митохондриальных фракциях мозга 32-дневных животных.

Механизм действия исследованных пестицидов обсуждается в аспекте интеракции с фосфолипидами митохондриальных мембран. В процессе онтогенетического развития увеличение содержания фосфолипидов, которые могут быть рецепторами для пестицидов, идет параллельно с изменениями дыхательной активности митохондриальных фракций. Разницы в фосфолипидном составе митохондриальных фракций, изолированных от молодых и старших животных, могут обуславливать разную чувствительность на исследованные пестициды.

REFERENCES

1. Altman, J., Das, G. D.: Postnatal changes in the concentration and distribution of cholinesterase in the cerebellar cortex of rats. *Exp. Neurol.* 1970, 28, 11—34.
2. Antunes-Madeira, M. C., Madeira, V. M. C.: Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 550, 384—392.
3. Bonavita, V., Ponte, F., Amore, G.: Lactate dehydrogenase isoenzymes in the developing rat brain. *Nature* 1962, 196, 576—577.
4. Bennet, E. L., Krech, D., Rosenzweig, M. R., Karlson, H., Dye, N., Ohlander, A.: Cholinesterase and lactic dehydrogenase activity in the rat brain. *J. Neurochem.* 1958, 3, 153—160.
5. 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.
6. Fleischer, S., Klönwen, H.: The role of soluble lipid in mitochondrial enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1961, 5, 378—383.
7. Green, D. E., Tzagoloff, A.: Role of lipids in the structure and function of biological membranes. *J. Lipid Res.* 1966, 7, 587—602.
8. Holtzman, D., Moore, C.: Oxidative phosphorylation in immature rat brain mitochondria. *Biol. Neonate* 1973, 22, 230—242.
9. Kiełducka, A., Sitkiewicz, D.: Hamowanie aktywności oksydazy cytochromowej przez związki fosforoorganiczne. Rola komponentu lipidowego. XV Zjazd P.T. *Biochem.* 1977, Abstr. Nr Pe-7.
10. Lajtha, A., Dunlop, D., Patlak, C., Toth, J.: Compartments of protein metabolism in the developing brain. *Biochem. Biophys. Acta* 1979, 561, 491—501.
11. Land, J. M., Booth, R. F. G., Berger, R., Clark, J. B.: Development of mitochondrial energy metabolism in rat brain. *Biochem. J.* 1977, 164, 339—348.
12. Layne, E.: Spectrophotometric methods for measuring proteins. In: *Methods in Enzymology*, Eds. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York 1957, 3, 447—454.
13. Lenaz, G., Sechi, A. H., Parenti-Castelli, G., Massoti, L.: Lipid-protein interaction in mitochondria. I. Conditions affecting binding of phospholipids to lipid depleted mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 141, 79—88.
14. Milstein, J. M., White, J. G., Swaiman, K. F.: Oxidative phosphorylation in mitochondria of developing rat brain. *J. Neurochem.* 1968, 15, 411—415.
15. 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.
16. Murthy, M. R., Rappoport, D. A.: Biochemistry of the developing rat brain. II. Neonatal mitochondrial oxidations. *Biochim. Biophys. Acta* 1963, 74, 51—59.
17. Page, M. A., Krebs, H. A., Williamson, D. H.: Activities of enzymes of ketone-body utilization in rat brain and other tissues of suckling rats. *Biochem. J.* 1971, 121, 49—53.
18. Salvay, J. G., Harwood, J. L., Dai, M., White, L., Hawthorne, J. N.: Enzymes of phosphoinositide metabolism during rat brain development. *J. Neurochem.* 1968, 15, 221—226.
19. Seiler, N.: Enzymes. In: *Handbook of Neurochemistry*, Ed. A. Lajtha, Plenum Press, New York, London 1969, 1, 325—467.
20. 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. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 487—495.
21. Tewari, H. B., Bourne, G. H.: Histochemical studies on the distribution of oxidative enzymes in the cerebellum of the rat. *J. Histochem. Cytochem.* 1962, 10, 619—627.

22. Yu Chang-An, L., King, T. E.: Studies on cytochrome oxidase. Interaction of the cytochrome oxidase protein with phospholipids and cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 1353—1392.
23. Zalewska, Z., Wolna, B., Sitkiewicz, D., Bicz, W.: Effect of Dichlorvos on some enzyme activities of the rat brain during postnatal development. II. Oxidoreductases. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 365—372.

Authors address: Department of Drug Metabolism Institute of Biopharmacy, Medical Academy, 1, Banacha str. 02-097 Warszawa.

DARIUSZ SITKIEWICZ, GRAZYNA GIETKA, WŁODZIMIERZ BICZ

EFFECT OF FENCHLORPHOS INTOXICATION ON THE RESPIRATION OF BRAIN MITOCHONDRIA OF RATS AT DIFFERENT AGE*

Department of Drug Metabolism, Institute of Biopharmacy, Medical Academy, Warszawa
Head: Prof. dr W. Bicz

Our earlier studies were concentrated on the influence of organophosphorus compounds on carbohydrates and energy metabolism in the brain of adult rats aged 2 months (Sitkiewicz, Zalewska, 1975; Biczowa et al., 1976; Sitkiewicz et al., 1977; Sitkiewicz et al., 1978). The results of these investigations indicated that insecticides derivatives of phosphoric acid are capable of modifying energy conservation processes (Sitkiewicz, 1975; Sitkiewicz et al., 1978) in contrast to thiophosphate and phosphonate derivatives (Zalewska et al., 1977; Sitkiewicz et al., 1980).

More and more data, however, indicate that the process of ageing is associated with significant changes in energy metabolism of the mitochondria of various tissues including the brain (Weinbach, Garbus, 1956; Menzis, 1971; Patel, 1977; Nohl, Hegner, 1978; Murfitt, Sanadi, 1978; Sylvia, Rosenthal, 1979).

The molecular mechanism of these changes consists probably in modification of the phospholipid component of mitochondrial membranes (Grinna, Barber, 1972; Nohl, Hegner, 1978; Nohl et al., 1978).

Organophosphorus compounds which have a high affinity to lipids exhibit a similar line of action (Kielducka, Sitkiewicz, 1977; Antunes-Madeira, Madeira, 1979). In the light of the facts it seemed of interest to establish the influence of poisoning with Fenchlorphos on oxidative phosphorylation in mitochondria of different-aged rats: 2 months (young) and 18 months (old). Fenchlorphos, a derivative of thiophosphoric acid, does not affect oxido-reducing processes (Sitkiewicz, 1975), but one of its metabolite, the oxygen analogue, proved *in vitro* to be a strong uncoupling agent of oxidative phosphorylation in mitochondrial fractions of liver and brain (Sitkiewicz, 1975), as

* The work was supported by Polish Academy of Sciences. Research Programme No. 10:4. 2.02.3.4.

well as in synaptosomes (Sitkiewicz et al., 1980). The toxic effect of Fenchlorphos would, therefore, be dependent on one hand, on the rate of oxidative metabolism of the thio-compound, and on the other on the susceptibility of the phospholipid "receptors" in the mitochondrial membranes.

MATERIAL AND METHODS

Animals and intoxication model. Female white Wistar rats aged 2 and 18 months, weighing about 160 and 350 g respectively were used for the experiments. Fenchlorphos was administered through gastric probe dissolved in rape oil in a dose of 50 per cent. DL_{50} : 1315 mg/kg body weight (Malinowski, Śledziewski, 1967). The animals were decapitated 2 h after poisoning.

Preparation of mitochondria. After decapitation both brain hemispheres were placed in ice-cold isolation medium consisting of: 0.3 M mannitol, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4, 0.2 mM K^+ EDTA and then washed twice. The tissue was homogenized in a Potter homogenizer with teflon pestle. The mitochondrial fractions were isolated according to the procedure of Moore and Jöbsis (1970) at 0° – 4° C.

Oxygen uptake and oxidative phosphorylation measurements. Oxygen uptake was determined by the polarographic method with the use of an oxygen Clark type electrode. Oxygen utilization in the presence of potassium succinate (4 mM) or potassium glutamate (10 mM) and potassium malate (2 mM) was designated as respiratory state 4. Respiratory state 3 was induced by addition of 200 nmoles ADP. The phosphorylation index ADP/O and the respiratory control ratio (RCR) were calculated after Estabrook (1967).

Reagents. Fenchlorphos (Ronnel) 0,0-dimethyl-0-0(2,4, 5-trichlorophenyl) thiophosphate, 99 per cent, produced by "Chemipan" Warszawa was received from the Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences, Mannitol from BDH, L (–) malic acid from Koch-Light, L-glutamic acid from Sigma. The remaining reagents were of pure for analysis grade products of POCH, Gliwice.

RESULTS

The rate of oxygen uptake in states 4 and 3 of respiration by brain mitochondria of different-aged rats in the presence of glutamate + malate and succinate as substrates is shown in Fig. 1. Mitochondria isolated from the brain of animals aged 18 months show a reduced respiratory ability in the presence of both substrates used, the differences being wider in state 3 than in state 4. Noteworthy is the fact of unchanged phosphorylation index ADP/O

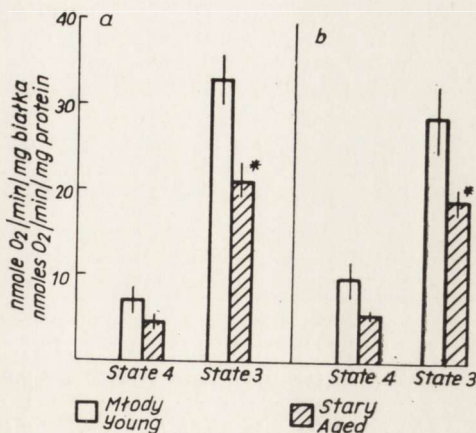


Fig. 1. Respiration of brain mitochondria of young, adult and aged rats. Data represent mean values from 4—5 experiments. Vertical bars indicate S.E.M. *) — statistically significant differences at $p < 0.05$. A. glutamate + malate; B — succinate.

Ryc. 1. Oddychanie mitochondriów mózgu szczurów w różnym wieku. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm S.E.M. z 4—5 doświadczeń. *) — różnice statystycznie znamienne z $p < 0.05$. A. glutaminian + jabłczan; B — bursztynian.

which for "young" mitochondria were 2.89 and 1.84 respectively, and for the "old" ones 3.09 and 1.64, respectively, in the presence of glutamate and malate or succinate as substrates (Table 1).

The data indicate that the resynthesis of ATP in brain mitochondria of rats aged 18 months remains quantitatively unchanged. The rate of phosphorylation, of ADP to ATP, however is reduced. In an experiment serving as an example, in the presence of glutamate and malate as substrates the phosphorylation rate of ADP was 135.89 nmol ADP/min/mg protein and 114.22 nmol ADP/min/mg protein for young and old mitochondria, respectively. When succinate was used as respiratory substrate, the phosphorylation rate was lower, amounting to 75.498 and 63.02 nmol ADP/min/mg protein, respectively, for young and old mitochondria.

In the next step the influence of Fenchlorphos intoxication in a dose of 50 per cent of DL_{50} on respiration or oxidative phosphorylation in the brain mitochondria of rats aged 2 and 18 months was investigated. The results are summarized in Fig. 2 and Table 1. These results indicate that in young rats Fenchlorfos poisoning caused a significant depression of the rate of oxygen utilization in respiratory states 4 and 3 in the presence of both substrates used. The changes of respiratory rate were associated with a decrease of the phosphorylation index ADP/O from 2.89 to 2.21 for glutamate and malate and from 1.84 to 1.43 for succinate as substrates. Differences in the respira-

Table 1. The effect of Fenchlorphos intoxication on oxidative phosphorylation of brain mitochondria of young adult and aged rats

Tabela 1. Wpływ zatrucia fenchlorfosem na oksydacyjną fosforylację w mitochondriach mózgu szczurów w różnym wieku

Age (months) Wiek (m-ce)	Substrate Substrat	Phosphorylation index Iloraz fosforylacyjny ADP/O		Respiratory control ratio Stosunek kontroli oddechowej RCR	
		Control Kontrola	Intoxicated Zatrute	Control Kontrola	Intoxicated Zatrute
2	G + M	2.89 ± 0.18 (4)	2.21 ± 0.17 (4)*	3.06 ± 1.08 (4)	3.39 ± 0.36 (4)
	Succ.	1.84 ± 0.18 (4)	1.43 ± 0.14 (4)*	2.30 ± 0.9 (5)	2.54 ± 0.71 (4)
18	G + M	3.09 ± 0.33 (4)	2.19 ± 0.23 (4)*	2.79 ± 0.49 (4)	3.75 ± 1.39 (4)
	Succ.	1.64 ± 0.28 (6)	1.34 ± 0.005 (4)*	2.07 ± 0.41 (6)	2.10 ± 0.07 (4)

Results are mean values ± S.E.M. Number of experiments in parentheses. *) significantly different at $p \leq 0.05$.

G + M — glutamate + malate; Succ. — succinate.

Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± S.E.M. W nawiasach liczba doświadczeń *) różnice statyst. znamienne $p \leq 0.05$. G + M — glutaminian + jabłczan; Succ. — bursztynian.

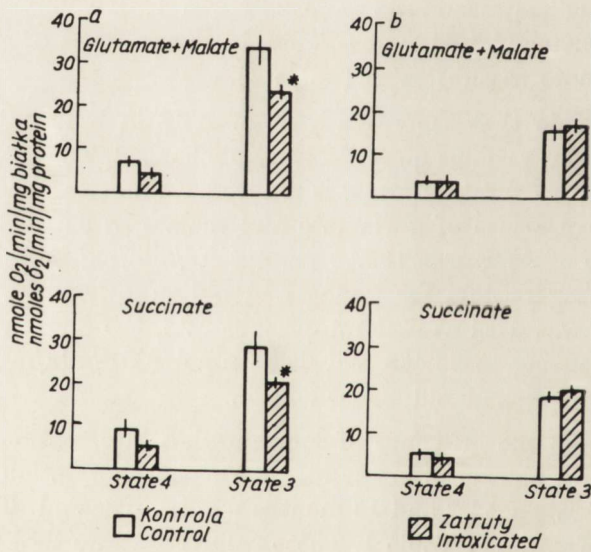


Fig. 2. Effect of Fenchlorphos intoxication on the respiration of brain mitochondria of young adult and aged rats. Data represent mean values. Vertical bars indicate S.E.M. of 4 experiments. *) — statistically significant differences at $p \leq 0.05$. a. young; b. aged.

Ryc. 2. Wpływ zatrucia Fenchlorfosem na oddychanie mitochondriów mózgu szczurów w różnym wieku. Wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne ± S.E.M. z 4 doświadczeń. *) różnice statystycznie znamienne z $p \leq 0.05$. a. młody; b. stary.

tory control values RCR as consequence of Fenchlorphos intoxication were not observed.

Poisoning with Fenchlorphos of animals aged 18 months did not produce any changes in the rate of oxygen uptake by brain mitochondria, either in respiratory state 4 or 3. These observations concern both succinate and glutamate + malate oxidation. Similarly as in young rats the depression of the phosphorylation quotient ADP/O was noted from 3.09 to 2.19 for glutamate and from 1.64 to 1.34 for succinate as substrates.

DISCUSSION

The presented results distinctly point at the existence of age-dependent changes in the functioning of the inner mitochondrial membranes in rat brain. The changes observed consisted in a reduced oxidation rate of both glutamate with malate and succinate and in the phosphorylation of ADP to ATP.

The molecular mechanism of the changes is unknown. One of the causes may be age-dependent modifications of the phospholipid membrane component. The increase in content of unsaturated fatty acids in the phospholipids of mitochondrial membranes from hearts of rats aged 23 months was observed by Nohl and Hegner (1978) as the result of peroxidation of these acids. Changes of molecular species of mitochondrial phospholipids may, therefore, be responsible for structural changes in the membranes, leading to modification of their energy generation function.

A change in the phospholipid membrane component in the course of ageing may also occur as the consequence of phospholipid metabolism disturbances. Brunetti et al. (1977) reported a decrease in the rate of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine synthesis in about 35 and 50 per cent in brains from rats aged 18 months, as compared with that in adult animals aged 2 months. These fact suggest that the ageing process changes may bring in the molecular species of phospholipids as well as quantitative shifts in the particular phospholipid classes.

The enzymatic systems bound with the inner mitochondrial membrane and engaged in energy generation processes require or are regulated by the membrane lipids (Fleischer, Klonwen, 1961; Green, Tzagoloff, 1966; Lenaz et al., 1970, Yu Chng-An, King, 1975). Thus, lipid modification may lead to conformational changes in the membrane and in consequence to disturbances of bioenergetis processes.

Very interesting seems the finding that Fenchlorphos intoxication lead in young rats to changes in the respiration rate similar to those noted in old animals and that the mitochondria modified owing to ageing do not respond to poisoning by the effect of depressed oxygen uptake. In both cases in young

and old animals a lowered phosphorylation ability measured by the ADP/O quotient, was found as the consequence of Fenchlorphos intoxication. This effect may be connected with the formation of oxygen analogue of Fenchlorphos which, as previously demonstrated, causes uncoupling of oxidative phosphorylation (Sitkiewicz, 1975; Sitkiewicz et al., 1980).

The decrease in the phosphorylation index, ADP/O, however, was correlated with the reduced respiration in the presence of ADP, this suggesting another mechanism leading to the observed effects. In a previous paper Rakowska et al. (1976) found, as the consequence of Fenchlorphos intoxication of young rats a decrease of succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase activities in brain mitochondria. This may indicate disturbances in electron transport in the respiratory chain and in oxidative phosphorylation which is coupled with it.

Another possibility suggested by the results of Antunes-Madeira and Madeira (1979) demonstrating that organophosphorus compounds modify the permeability of membranes by interacting with the carrier, are disturbances in substrate, ADP or inorganic phosphate transport and these factors are indispensable to normal respiration and oxidative phosphorylation.

D. Sitkiewicz, G. Gietka, W. Bicz

WPLYW ZATRUCIA FENCHLORFOSEM NA ODDYCHANIE MITOCHONDRIÓW MÓZGU SZCZURÓW W RÓŻNYM WIEKU

Streszczenie

W pracy badano wpływ zatrucia Fenchlorfosem w dawce 50% DL₅₀ na oddychanie i oksydacyjną fosforylację w mitochondriach mózgu szczurów w wieku 2 i 18 miesięcy.

Stwierdzono, że mitochondria mózgu 18-miesięcznych szczurów wykazują zmniejszoną aktywność oddechową w obecności glutaminianu i jabłczanu oraz bursztynianu jako substratów w porównaniu do mitochondriów zwierząt młodszych (2-miesięcznych). Zdolność fosforylacji oksydacyjnej mierzona stosunkiem ADO/O była niezmieniona w obu grupach zwierząt.

W następstwie zatrucia Fenchlorfosem obserwowano obniżenie szybkości zużycia tlenu w stanach 4 i 3 oddychania jedynie w mitochondriach mózgu zwierząt młodszych. W obu grupach natomiast w obecności stosowanych substratów następowało obniżenie ilorazu fosforylacyjnego ADP/O.

Uzyskane wyniki są dyskutowane w aspekcie możliwości modyfikacji komponentu fosfolipidowego błon mitochondrialnych, jako przyczyny, zależnych od wieku, zmian metabolizmu energetycznego oraz zmniejszonej wrażliwości na toksyczne działanie insektycydu.

Д. Ситкевич, Г. Гетка, В. Бич

ВЛИЯНИЕ ОТРАВЛЕНИЯ ФЕНХЛОРФОСОМ НА ДЫХАНИЕ МИТОХОНДРИЕВ МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Резюме

В работе исследовали влияние отравления Фенхлорфосом в дозе 50% LD₅₀ на дыхание и оксидативную фосфорилизацию в mitochondриях мозга крыс возраста 2 и 18 месяцев.

Обнаружено, что митохондрия мозга 18 месячных крыс характеризуются меньшей активностью дыхания в присутствии глутамата и малеата а также сукцината в качестве субстрата по сравнению с митохондриями младших животных (2-месячных).

Способность оксидативной фосфорилиции, измеряема соотношением ADP/O не менялась в обеих опытных группах животных.

Вследствие отравления Фенхлорфосом наблюдалось снижение скорости потребления кислорода в состояниях 4 и 3 дыхания лишь в митохондриях мозга младших животных. В обеих же группах в присутствии применяемых субстратов имело место снижение фосфорилиционного частного ADP/O.

Полученные результаты обсуждаются в аспекте возможности модификации фосфолипидного компонента митохондриальных мембран как причины, зависящих от возраста, изменений энергетического метаболизма и сниженной чувствительности на токсическое действие инсектицидов.

PIŚMIENNICTWO

1. Antunes-Madeira, M. C., Madeira, V. M. C.: Interaction of insecticides with lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1979, 550, 384—392.
2. Biczowa, B., Sikorska, M., Zalewska, Z., Biez, W.: Effect of thiophosphoric insecticide — Fenchlorphos on the glycogen level, glycolysis and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in rat brain. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 381—388.
3. Brunetti, M., Gaiti, A., Binaglia, L., Porcellati, G.: Differences in brain and liver phospholipid metabolism in rats of different ages. *Ital. J. Biochem.*, 1977, 26, 365—366.
4. 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.
5. Fleischer, S., Klonwen, H.: The role of soluble lipid in mitochondrial enzyme system. *Biochim. Acta* 1961, 5, 378—383.
6. Green, D. E., Tzagoloff, A.: Role of lipids in the structure and function of biological membranes. *J. Lipid Res.* 1966, 7, 587—602.
7. Grinna, L. S., Barber, A. A.: Age-related changes in membrane lipid content and enzyme activities. *Biochim. Biophys. Acta* 1972, 288, 347—353.
8. Lenaz, G., Sechi, A. H., Parenti-Castelli G., Massoti, L.: Lipid-protein interaction in mitochondria. I. Conditions affecting binding of phospholipids to lipid depleted mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 141, 79—88.
9. Kiełducka, A., Sitkiewicz, D.: Hamowanie aktywności oksydazy cytochromowej przez związki fosforoorganiczne. Rola komponentu lipidowego. XV Zjazd PTBiochem. 1977, Streszcz. Nr Pc-7.
10. Malinowski, R., Śledziewski, B.: Tionofosforan 0,0-dwumetylo-0-2,4,5-trójchlorofenyłowy — ważny insektycyd o niskiej toksyczności. *Pestycydy* 1967, 1, 1—14.
10. Menzis, R. A.: The turnover of mitochondria in a variety of tissues of young adult and aged rats. *J. Biol. Chem.* 1971, 246, 2425—2429.
12. Moore, C. L., Jobsis, F.: Some studies on the control of respiration in rat brain mitochondrial preparation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1970, 138, 295—305.
13. Murfitt, R. R., Sanadi, D. R.: Evidence for increased degeneration of mitochondria in old rats. *Mech. Ageing-Develop.* 1978, 8, 197—201.
14. Nohl, H., Hegner, D.: Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Europ. J. Biochem.* 1978, 82, 563—567.

15. Nohl, H., Breuninger, V., Hegner, D.: Influence of mitochondrial radical formation on energy-linked respiration. *Europ. J. Biochem.* 1978, 90, 385—390.
16. Patel, M. S.: Age-dependent changes in the oxidative metabolism in rat brain. *J. Gerontol.* 1977, 32, 643—646.
17. Rakowska, I., Dybowska, A., Malatyńska, E., Kiełducka, A.: The activities of some oxidoreductases and respiratory control in rat brain mitochondria following Fenchlorphos intoxication. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 461—469.
18. Sitkiewicz, D.: Procesy utleniania w mitochondriach ośrodkowego układu nerwowego i wątroby szczura w następstwie działania insektycydów tiosfosforoorganicznych. *Praca doktorska, Akademia Medyczna, Warszawa* 1975.
19. Sitkiewicz, D., Zalewska, Z.: Effect of organophosphorus insecticides on some oxidoreductases in rat brain mitochondria. *Neuropat. Pol.* 1975, 13, 463—469.
20. Sitkiewicz, D., Rakowska, I., Skonieczna, M., Chajdak, A.: The effect of Ronnel and its oxygen analog on succinate oxidation by rat brain, liver homogenates and mitochondria. *Pest. Biochem. Physiol.* 1977, 7, 501—509.
21. 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. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 487—495.
22. Sitkiewicz, D., Skonieczna, M., Krzywicka, K., Dziedzic, E., Staniszevska, K., Bicz, W.: Effect of organophosphorus insecticides on the oxidative processes in rat brain synaptosomes. *J. Neurochem.* 1980, 36, 619—626.
23. Sylvia, A. L., Rosenthal, M.: Effect of age on brain oxidative metabolism in vivo. *Brain Res.* 1979, 165, 235—248.
24. Weinbach, E. C., Garbus, J.: Age and oxidative phosphorylation in rat liver and brain. *Nature* 1956, 178, 1225—1226.
25. Yu Chang-An, L., King, T. E.: Studies on cytochrome oxidase. Interaction of the cytochrome oxidase protein with phospholipids and cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 1353—1392.
26. Zalewska, Z., Jurkiewicz, G., Wenzel, E.: Oksydacyjna fosforylacja oraz aktywność dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej w mózgu szczurów w następstwie zatrucia trichlorfonem i dichlorfossem. *Bromat. Chem. Toksykol.* 1977, 10, 357—365.

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

A. K. SZILÁGYI, A. TÁTRAALJAI

ALPHA-1-ANTITRYPSIN IN SERUM AND CEREBRO-SPINAL FLUID
ESPECIALLY WITH REGARD TO ALCOHOLIC DISORDERSNational Institute for Neurological and Mental Diseases and Research
Institute of Organic Chemical Industry, Budapest, Hungary

In man alpha-1-antitrypsin (α_1 -AT) is synthesized in the liver and secreted into the serum (Kueppers, Black, 1974). α_1 -AT is a glycoprotein with the molecular weight of about 50 000 (Crawford, 1973), accounting for 90% of the antiprotease activity of the serum and being the major component of the α_1 -globulin fraction (Vogel et al., 1968). Therefore, among protease inhibitors α_1 -AT appears to be particularly important.

α_1 -AT is also present in other body fluids (Talamo, 1975) e.g. tears, saliva, duodenal fluid, urine, milk, colostrum and cerebrospinal fluid (CSF). It exerts inhibitory effects (by forming a complex with the proteolytic enzyme and thus counteracting its tissue damaging effect) not only against trypsin itself but also against chymotrypsin (Ohlsson, 1971a), elastase (Ohlsson, 1971b), collagenase (Ohlsson, Ohlsson, 1973) and plasmin (Pechet, Alexander, 1962). α_1 -AT seems to be an important factor in the maintenance of tissue integrity during inflammations and infections and due to its effect on plasmin (Pechet, Alexander, 1962) and possibly thrombin (Abilgaard et al., 1970) it may interfere with the blood-clotting mechanism too. In view of the role of trypsin and other proteolytic enzymes in enhancing the passage of different compounds across the blood—brain barrier (Beiler et al., 1956; Van den Driessche et al., 1974), the involvement of α_1 -AT in the permeability processes may be inferred too. In spite of considerable efforts made in this field, the significance of α_1 -AT is not yet fully understood.

Much work has been done on the relations between serum α_1 -AT level and certain diseases and physiological states, respectively. It has been stated that α_1 -AT levels increase during inflammatory processes (Kueppers, Black, 1974), pregnancy (Ganrot, Bjerre, 1967), and parturition (Laurell, 1968), on administration of corticosteroids and estrogens (Laurell et al., 1968) and in alcoholic liver cirrhosis (Fehér et al., 1977). A decrease of the α_1 -AT serum-

level occurs in a liver disease attributed to a recessive genetic failure (Sharp, 1971) and homozygotes with inherited α_1 -AT deficiency show a high inclination for pulmonary emphysema (Erikson, 1964), liver cirrhosis (Lieberman, 1974; Eriksson, Hägerstrand, 1974) and malignant hepatoma (Lieberman, 1974).

Contrary to the abundance of studies dealing with factors influencing serum α_1 -AT levels there are only a few publications on this enzyme inhibitors in CSF. Canal and Frattola (1961) were the first to report on the occurrence of α_1 -AT in human CSF. CSF contains the same proteinase-inhibiting globulins as serum; the α_1 -AT concentration in the serum is about 100 times higher than in CSF (Bieth et al., 1969). In another study a value of 1.05 mg% was found for CSF α_1 -AT (Bock, 1973). A good linear correlation was found between the protein and α_1 -AT content in the CSF of patients suffering from malignant and benign intracranial tumors (Galvez et al., 1976).

In a previous study α_1 -AT levels were determined in sera and CSF samples of random patient material (154 CSF samples deriving from lumbar puncture and 54 sera) (Szilágyi, 1978). It was established that the CSF α_1 -AT level correlates with the CSF protein content and with the serum α_1 -AT concentration. CSF α_1 -AT was found in increased amounts in cases of chronic alcoholism and delirium tremens. However, the number of cases (8 and 11, respectively) was too small for a more detailed evaluation. In the present study relations between alcoholic diseases and the α_1 -AT concentration in CSF and serum are treated in more detail, based on a greater number of patients.

MATERIAL AND METHODS

Sera and CSF samples (withdrawn by lumbar puncture) were taken from random group of patients hospitalized on different wards of our Institute. Both biological fluids were collected from fasting patients in the morning and examined immediately. Hemolytical sera and CSF samples with blood contamination were excluded from the material studied.

Diagnosis of delirium was based on characteristic clinical features and anamnestic data. Sera and CSF of the delirium tremens group were generally taken one week after recover from acute clinical symptoms.

Liver damage was diagnosed by laboratory data: colloidal tests, serum bilirubin, SGOT, SGPT. We considered a liver damage when only one of the examinations gave abnormal results. CSF protein was estimated by Lowry's method. α_1 -AT concentration was estimated by the photometric method of Fritz et al. (1970) combined with the quantification procedure of Weber and Wegeland (1968). A synthetic substrate N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitranilid hydrochloride is degraded by trypsin with the formation of a yellow-colored p-nitraniline which can be determined photometrically. The color

development was followed during 8 minutes and was shown to be proportional to trypsin concentration and time. The trypsin inhibitor activity was estimated by measuring the inhibition of a known amount of trypsin. The activity of the trypsin preparation used was tested against known amounts of soybean α_1 -AT.

Student test was used for statistical evaluation of differences between diagnostic groups. Correlations between different parameters were calculated assuming a linear regression.

RESULTS

In Table 1, the mean values and standard deviations of the α_1 -AT concentrations in sera and CSF are given various diagnostic groups in mg% and in % of the total protein content. Protein contents of the CSF samples not

Table 1. α_1 -AT level in serum and CSF in different pathological states

Tabela 1. Poziom α_1 -AT w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym w różnych stanach chorobowych

Diagnosis Rozpoznanie	α_1 -AT in mg%			α_1 -AT w mg %			α_1 -AT in % of the total protein content α_1 -AT w % całkowitej zawartości białka					
	CSF płyn mózgowo-rdzeniowy			serum surowica			CSF płyn mózgowo-rdzeniowy			serum surowica		
	N	\bar{X}	σ	N	\bar{X}	σ	N	\bar{X}	σ	N	\bar{X}	σ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Arteriosclerosis Miażdżycza naczyń	43	0.81	0.36	16	141	28	43	2.11	0.62	16	2.01	0.40
Cerebral atrophy Zanik mózgu	23	0.67	0.30	10	137	23	1.96	0.60	10	1.96	0.27	
Neuro-spondyliartric disease Choroby neuro-spondyliatryczne	31	0.77	0.31	11	130	50	31	1.99	0.60	11	1.86	0.71
Epilepsy Padaczka	37	0.67	0.37	20	155	45	37	2.07	0.76	20	2.21	0.64
Schizophrenia Schizofrenia	28	0.79	0.36	14	163	28	28	2.38	0.95	14	2.33	0.40

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reference group Grupa referencyjna	162	0.75	0.34	71	147	36	162	2.17	0.76	71	2.10	0.50
Chronic alcoholism Przewlekły alkoholizm	29	0.72	0.43	17	140	41	29	1.99	0.81	17	2.00	0.59
Alcoholic hepatopathy Hepatopatia alkoholowa	11	1.15	0.33	7	199	21	11	2.87	0.91	7	2.84	0.30
Hepatopathy Hepatopatia	10	0.97	0.62	6	155	—	10	2.23	1.21	6	2.21	—
Delirium tremens without hepatopathy Oblęd opilezy bez hepatopatii	15	1.16	0.71	12	154	41	15	2.72	1.00	12	2.20	0.59
Delirium of non-alcoholic origin without hepatopathy Majaczenie pochodzenia niealkoholowego bez hepatopatii	14	0.94	0.43	3	164	—	14	2.43	0.88	3	2.34	—

N — number of cases
liczba przypadków

\bar{X} — mean value
wartość średnia

σ — standard deviation
odchylenie standardowe

listed in the table ranged from 30 to 40 mg%. Total protein concentration in the serum samples was assumed as 7 g%. The diagnostic group "locomotor diseases" includes disc prolapses, spondylosis, spondyl-arthritis and a few cases of rheumathoid arthritis and arthrosis.

The first 5 diagnostic groups showed no significant differences in the α_1 -AT concentration of CSF and serum, respectively. If in individual cases the basic illness is accompanied by an acute inflammatory process the α_1 -AT concentration may be somewhat elevated but the group as a whole behaves like the others. We therefore consider these groups as a homogeneous reference. As can be seen in Table 1, the group of chronic alcoholics does not differ from the reference group in serum and CSF α_1 -AT levels. Nevertheless, chronic alcoholism was not included in the reference group to emphasize the different behaviour of other diseases of alcoholic origin.

Compared to the reference group the patients suffering from hepatoopathies and delirium of non-alcoholic origin seem to have somewhat higher α_1 -AT concentrations in sera and CSF. These differences are, however, statistically not significant. Nevertheless, it can not be excluded that some kinds of non-alcoholic hepatoopathies and delirium result in an increase in serum and CSF α_1 -AT levels. Therefore all those cases, where alcoholic and non-alcoholic delirium occurred together with hepatoopathies, were disregarded.

Significantly higher CSF α_1 -AT concentrations were found exclusively in alcoholic hepatoopathies and delirium tremens (Table 2). Serum α_1 -AT levels, however, are only elevated in alcoholic hepatoopathies. These increases of the absolute concentration values are accompanied by significant increases of the relative α_1 -AT amounts expressed in % of the total protein content of serum and CSF, respectively.

Table 2. Significance levels
Tabela 2. Poziomoznamiennosci

Diagnosis Rozpoznanie	α_1 -AT	
	Serum Surowica Plyn	CSF m6zg. rdz.
Alcoholic hepatoopathy against reference group Hepatoopatiaz alkoholowa wobec grupy referencyjnej	0.001	0.001
Alcoholic hepatoopathy against chronic alcoholism Hepatoopatiaz alkoholowa wobec przewleklego alkoholizmu	0.001	0.005
Delirium tremens against reference group Obl6d opileczy wobec grupy referencyjnej	n.s.	0.001
Delirium tremens against chronic alcoholism Obl6d opileczy wobec przewleklego alkoholizmu	n.s.	0.01

n.s. not studied
nie badano

In Table 3 the correlation coefficients are given which were obtained by statistical calculations assuming a linear regression between serum and CSF α_1 -AT concentration. It should be noted that the correlation coefficient for the serum-CSF α_1 -AT regression of the alcoholic hepatoopathy group included in parenthesis may be meaningless. Since the α_1 -AT concentration values of the 7 CSF samples were closed to each other consequently the experimental error had a pronounced effect on the regression calculation.

DISCUSSION

In the earlier study (Szilágyi, 1978) we found the CSF α_1 -AT levels to be the highest in delirium tremens and elevated in some other diagnostic groups. In the present study the much larger material available allowed to perform the diagnostic classification in more detail, especially with respect to hepatopathies and delirium of various origin. Consequently it can be stated that besides the delirium tremens group only alcoholic hepatopathies show significantly elevated CSF α_1 -AT levels (Table 1 and 2).

As already reported, a good linear correlation exists between the α_1 -AT level and the total protein content of the CSF (Galvez et al., 1976; Szilágyi, 1978) as well as between the serum and CSF α_1 -AT levels (Szilágyi, 1978). The same was found in this study as can be seen from the correlation coefficients of the chronic alcoholic and the reference group given in Table 3. Moreover, the same α_1 -AT levels relative to the total protein were obtained for serum and CSF (Table 1). This allows us to conclude that serum α_1 -AT concentrations are reflected by the CSF, i.e. the CSF α_1 -AT originates from the serum. This conclusion is supported by the statement that serum and CSF protease inhibitors are identical (Bieth et al., 1969). Nevertheless, the correlation data for alcoholic hepatopathies and alcoholic delirium seem to indicate that in these groups the origin of at least some part of the CSF α_1 -AT may be different.

Table 3. Correlation coefficients

Tabela 3. Współczynniki korelacji

Diagnosis Rozpoznanie	N	Serum-CSF α_1 -AT	N	Protein- α_1 -AT in CSF
		Poziom α_1 -AT w surowicy w stosunku do płynu mózgo- rdzeniowego		Kompleks białko- α_1 -AT w płynie mózgowo-rdzeniowym
Reference Grupa referencyjna	77	0.76	162	0.67
Chronic alcoholism Alkoholizm przewlekły	17	0.73	29	0.74
Alcoholic hepatopathy Hepatopatia alkoholowa	7	(0.30)	11	0.09
Delirium tremens Oblęd opliczy	12	0.44	15	0.78

N — number of cases
liczba przypadków

Though alcoholic hepatopathies and alcoholic delirium show a unique behaviour compared to the other diagnostic groups included in this study, there are striking differences between them. Contrary to delirium tremens there is no correlation between CSF protein and α_1 -AT content in alcoholic hepatopathies. The α_1 -AT content of the serum is significantly elevated in alcoholic hepatopathies (which was also found by Fehér et al. (1977) but not in delirium tremens (Table 1 and 2).

The α_1 -AT contents observed in serum and CSF are specific and not caused by an overall increase of the protein content as can be seen from the relative α_1 -AT concentrations given in Table 1. Taking into account all the experimental results it can be concluded that in delirium tremens at least some part of the CSF α_1 -AT is either formed in or preferentially released from the central nervous system (CNS). This would explain the existing correlation between CSF protein and its α_1 -AT content, the absence of any correlation between CSF and serum α_1 -AT level and the high values for α_1 -AT in CSF as well as the control α_1 -AT content in serum. An alternative explanation can be given assuming a selective alteration of the blood-CSF barrier function in favor of α_1 -AT. Though in delirium tremens a selective alteration of the blood-CSF barrier function resulting in an increase of the CSF α_1 -AT level can not be excluded for certainty we believe that the increase is a primary effect which has its origin in the CNS.

The pathophysiological significance of the specific α_1 -AT increase in CSF is unknown. We don't even know the nature of the factors evoking delirium tremens though it is suggested that the disturbed metabolic state plays a role in its genesis (Freedman et al., 1975). Histopathological alterations (congestion, edema, sclerosis) are also unspecific (Tariska, 1969). At this stage of knowledge every phenomenon which seems to be related (directly or indirectly) to the disease may be of importance and should be attended. This also holds to the specific CSF α_1 -AT increase which is undoubtedly related to the alcoholic delirium because neither the chronic alcoholic nor the non-alcoholic delirium group behave in such a way.

The delirium tremens group is "homogeneous" with respect to the time of sampling which was performed within some days after the delirious clinical symptoms declined. In principle it would be of interest to follow the α_1 -AT concentration during the progress and decline of the delirious symptoms. However, from the ethical point of view, repeated CSF sampling without clinical need is inadvisable. The CSF samples were taken at times chosen from a clinical point of view, which were generally not best suited for the purpose of this study.

Acknowledgement. The authors wish to thank Mrs. Piroška Rómer for her skillfull technical assistance. The research work was supported by the Ministry of Health, Hungary, Theme number 6-01-0303-04-1/2.

A. K. Szilágyi, A. Tátraaljai

ALFA-1-ANTYTRYPSYNA W SUROWICY I PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM W CHORO-
BACH WYWOŁANYCH NADUŻYWANIEM ALKOHOLU

Streszczenie

W chorobach wątroby spowodowanych nadużywaniem alkoholu oraz w obłędzie opileczym stwierdzono podwyższony poziom α_1 -AT w płynie mózgowo-rdzeniowym. W grupie pacjentów z chorobami wątroby stwierdzono także podwyższony poziom α_1 -AT w surowicy. Na podstawie znamienych różnic między tymi grupami, oceny stosunku poziomu α_1 -AT w płynie mózgowo-rdzeniowym do poziomu α_1 -AT w surowicy (przy pomocy analizy regresji) oraz zawartości kompleksu białko- α_1 -AT w płynie wyciągnięto wniosek, że w obłędzie opileczym α_1 -AT jest przynajmniej częściowo wytwarzana w OUN. Natomiast w uszkodzeniach wątroby wywołanych nadużywaniem alkoholu wzrost poziomu α_1 -AT w płynie mózgowo-rdzeniowym jest jedynie odbiciem patologicznego wzrostu poziomu tego czynnika w surowicy.

A. K. Силяди, А. Татраалjai

АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИН В СЫВОРОТКЕ И СПИННО-МОЗГОВОЙ
ЖИДКОСТИ В БОЛЕЗНЯХ ВЫЗВАННЫХ ЗЛОУПОТРЕБЛЕНИЕМ АЛКОГОЛЯ

Резюме

В болезнях печени, вызванных злоупотреблением алкоголя и алкогольной белой горячке, обнаруживали повышенный уровень α_1 -AT в спинномозговой жидкости. В группе пациентов с заболеванием печени также обнаруживали повышенный уровень α_1 -AT в сыворотке. На основании достоверных различий между этими группами оценки соотношения уровня α_1 -AT в спинно-мозговой жидкости к уровню α_1 -AT в сыворотке (при помощи анализа регрессии), а также содержания комплекса белок- α_1 -AT в спинно-мозговой жидкости заключается, что в алкогольной белой горячке α_1 -AT, по крайней мере частично, образуется в ЦНС. В повреждениях же печени, вызванных злоупотреблением алкоголя, рост уровня α_1 -AT в спинно-мозговой жидкости является лишь отражением патологического повышения этого фактора в сыворотке.

REFERENCES

1. Abilgaard, U., Fogerhol, M. K., Egeberg O.: Comparison of progressive antithrombin activity and the concentration of three thrombin inhibitors in human plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1970, 26, 349—354.
2. Beiler, J. M., Brendel, R., Martin, G. J.: Enzymic modification of blood-brain barrier permeability. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1956, 118, 415—419.
3. Bieth, J., Miesch, F., Metais, D.: Etude enzymatique et immunologique des inhibiteurs de protéases du liquid céphalorachidien. *Clin. Chim. Acta* 1969, 24, 203—209.
4. Bock, E.: Quantification of plasma proteins in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Immunol.* 1973, 2, suppl. 1, 111—117.
5. Canal, N., Frattola, L.: Recherche sull' inibitore triptico liquorale in pazienti neurologici et psichiatrici. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1961, 37, 496—498.
6. Crawford, I.: Purification and properties of normal human α_1 -antitrypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1973, 156, 215—222.
7. Eriksson, S., Hägerstrand, J.: Cirrhosis and malignant hepatoma in α_1 -antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 1971, 195, 451—458.
8. Eriksson, S.: Pulmonary emphysema and alpha-1-antitrypsin deficiency. *Acta Med. Scand.* 1964, 175, 197—205.

9. Fehér, J., Jakab, L., Lengyel, G., Romics, L.: Szérum glykoproteid vizsgálatok májbetegségekben (Study on serum glycoproteids in liver diseases). *Orvosi Hetilap* 1977, 118, 2579—2581.
10. Freedman, A. M., Kaplan, H. I., Sadock, B. J.: *Comprehensive testbook of psychiatry*. Williams Wilkins, Baltimore 1975, vol. 2, 1341.
11. Fritz, H., Trautschold, I., Werle, E.: Ed. Bergmeyer, In.: *Methoden der Enzymatischen Analyse*. Akademie-Verlag, Berlin 1970.
12. Galvez, S., Monari, M., Retamal, C., Elso, L.: The normal concentration of alpha-1-antitrypsin in the cerebrospinal fluid and its variations in a series of 20 intracranial tumors. *Neurochirurgia*, 1976, 34, 13—19.
13. Ganrot, P. O., Bjerre, B.: Alpha-1-antitrypsin and -2-macroglobulin concentration in serum during pregnancy. *Acta Obst. Gynec. Scand.* 1967, 46, 1—8.
14. Kueppers, F., Black, I. F.: α_1 -Antitrypsin and deficiency. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1974, 110, 176—194.
15. Laurell, C. B.: Orosomucoid and α_1 -antitrypsin in maternal and fetal sera at parturition. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968, 21, 136—138.
16. Lau, C. B., Kullander, S., Thorell, J.: Effect of administration of a combined estrogen-progesterone contraceptive on the level of individual plasma protein. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1968, 21, 337—343.
17. Lieberman, J.: Cirrhosis and hepatoma with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Ann. Int. Med.* 1974, 81, 850—852.
18. Ohlsson, K.: Interactions between bovine α -chymotrypsin and the protease inhibitors of human and dog sera in vitro. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1971a, 28, 5—11.
19. Ohlsson, K.: Neutral leukocyte proteases and elastase inhibited by plasma alpha-1-antitrypsin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1971b, 28, 251—253.
20. Ohlsson, K., Ohlsson, I.: The neutral proteases of human granulocyte. *Eur. J. Biochem.* 1973, 36, 473—481.
21. Pechet, I., Alexander, B.: The effect of certain proteolytic enzymes on the thrombin-fibrinogen interaction. *Biochemistry*, 1962, 1, 875—883.
22. Sharp, H. L.: Alpha-1-antitrypsin deficiency. *Hosp. Pract.* 1971, 83—96.
23. Szilágyi, A. K.: Tripszinaktivitás liquorban. (Tripsin inhibitor activity in cerebrospinal fluid). *Ideggyógy. Szle.* 1978, 31, 445—449.
24. Talamo, R. C.: Basic and clinical aspects of the alpha-1-antitrypsin. *Pediatrics*, 1975, 56, 91—99.
25. Tariska, I.: Az alkoholizmussal kapcsolatos neuropathologiai kórképek gyakorlati szemmel (A practical survey on neuropathological syndroms attributable to alcoholism). In: *Tanulmányok az alkoholizmus pszichiátriai következményeiről*. Eds. I. Tariska, Gy. Geréby, Gy, Kardos, Budapest 1969.
26. Van den Driessche, J., Le Clec'h, G., Quinion, P., Linée, Ph., Lacroix, P., Patay, M., Delamare, J.: Elévation par l'alpha-chimotrypsine de la concentration cérébrale en dopamine chez le rat soumis à l'oxypertine et à la L-dopa. *C.R. Soc. Biol. Pharmacol.* 1974, 168, 1393—1400.
27. Vogel, P., Trautschold, I., Werle, E.: *Natural proteinase inhibitors*, Academic Press, New York 1968.
28. Weber, H., Wegmann, T.: *Atlas der Klinischen Enzymologie*, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1968.

Authors' address: National Institute for Neurological and Mental Diseases, Budapest, Vörösmarty str. 116.

Die Pickische Krankheit. Eine neuropathologisch — anatomisch — klinische Studie
Hermann Jakob. Springer Verlag. Berlin-Heidelberg-New York 1979, str. 110, Ryc. 40

Prezentowana książka stanowi 23 pozycję z publikowanej pod redakcją H. Hippinsa, W. Jazarika i C. Müllera serii psychiatrycznej „Monografie z pogranicza psychiatrii” wydawanej przez Wydawnictwo Springera.

Podstawową zaletą monografii jest jej oparcie na niezwykle bogatym materiale choroby Picka, obejmującym około 50 klinicznie i neuropatologicznie zweryfikowanych przypadków, jakkolwiek przedmiotem szczegółowej analizy jest tylko 27 przypadków pochodzących z najnowszych zbiorów autora. Zróżnicowanie postaci choroby i jej zaawansowania w poszczególnych przypadkach pozwala autorowi na przeprowadzenie systematycznych i bardzo dokładnych korelacji kliniczno-anatomicznych i kliniczno-neuropatologicznych, stwarzających podstawę dla własnych oryginalnych koncepcji patogenetycznych, zarówno w odniesieniu do symptomatologii klinicznej, jak i istoty procesu patologicznego. Te właśnie korelacje podbudowane gruntownym omówieniem zagadnień anatomii mikroskopowej i fizjologii najczęściej zajętych struktur mózgu, w tym przede wszystkim układu limbicznego i korowej części wężomózgowia oraz ich pogranicza i powiązań, stanowią zasadniczą część opracowania. Rozszerzają one nie tylko wiedzę o strukturalnym podłożu poszczególnych komponentów klinicznego zespołu choroby Picka, lecz również wyjaśniają rolę określonych struktur i części układu limbicznego w korelacji z doświadczalnymi spostrzeżeniami neurofizjologicznymi.

Istotną część opracowania poświęcona jest topografii procesów zanikowych mózgu w chorobie Picka oraz mechanizmom ich szerzenia się. Autor wyróżnia tzw. kluczowe obszary zaniku, stanowiące siedzibę najwcześniej ujawniającego się procesu chorobowego i wiążę z nimi wczesne, często umykające uwadze lekarza, objawy zespołu klinicznego. W późnych okresach choroby obszary te są miejscem najbardziej zaawansowanych uszkodzeń tkankowych. W dalszej kolejności omówione zostały kierunki rozszerzania się zaników tkankowych oraz tzw. obszary zaników wtórnych, od których zależy bogactwo i zróżnicowanie symptomatologii klinicznej w pełni rozwiniętego zespołu chorobowego. Przedmiotem odrębnej analizy jest udział poszczególnych strukturalno-czynnościowych układów mózgu w procesie patologicznym.

Drugim zasadniczym elementem monografii jest omówienie obrazu neuropatologicznego choroby Picka i systematyczna analiza dynamiki rozwoju uszkodzeń tkankowych. Autor zwraca szczególną uwagę na fakt, że podobnie jak stałość anatomicznej topografii zaników w mózgu, tak i stałość kolejności zajęcia poszczególnych struktur korowych stanowi wiodącą cechę obrazu patomorfologicznego choroby Picka. Najbardziej stałym i najwcześniejszym elementem uszkodzenia kory wybranych okolic mózgu jest zanik warstwy I i III przy równoczesnym zgąbczeniu warstwy II. Te właśnie cechy, a nie powszechnie przyjmowane występowanie charakterystycznych obrzmiałych komórek Picka i kul srebrochłonnych, stanowią w przeświadczeniu autora, obok topografii zmian, podstawowy i diagnostycznie zasadniczy element obrazu neuropatologicznego choroby. W dalszej części autor omawia szczegółowo typy i odmiany uszkodzeń komórkowych oraz obraz mikroskopowy i mikroskopowo-elektronowy srebrochłonnych wrętów śródplazmatycznych. Na szczególną uwagę zasługują tu rozważania nad pato- i morfogenezą tych zmian komórkowych, które autor uważa za następstwo pierwotnego zaniku dendrytów i upośledzenia aferencji neuronów.

Przedstawione opracowanie z całą pewnością zasługuje na uwagę psychiatrów, neurologów i neuropatologów. Szczególnie zachęcam do niej neuropatologów. Może dzięki niej w zbiorach pracowni neuropatologicznych pojawią się rozpoznania choroby Picka.

Mirosław J. Mossakowski

ANNA POLEWSKA-JESKE

ODCZYNY MAKROFAGOWE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W PRZEBIEGU WIRUSOWYCH I BAKTERYJNYCH ZAPALEŃ OPON*

Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych PAM, Szczecin
Kierownik: doc. dr B. Trzaska

Makrofagi biorą udział w fazie indukcyjnej odpowiedzi humoralnej, jak również w fazie wykonawczej odpowiedzi typu komórkowego. Interakcje biologiczne między makrofagami a innymi komórkami nie są dobrze poznane (Ptak 1970; Aleksandrowicz, Lisiewicz 1971; Zembala, Ptak 1971; Abetikjan, Demczenko 1975; Aleksandrowicz 1975; Aleksandrowicz, Lisiewicz 1975). Czynność makrofagów badano w wysiękach opłucnowych i otrzewnowych, w błonach śluzowych, pęcherzykach płucnych, a także w węzłach chłonnych oraz w tkankach wątroby i śledziony. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono natomiast prac poświęconych korelacji zmian cytologicznych makrofagów w płynie mózgowo-rdzeniowym, z przebiegiem procesów zakaźnych.

Postanowiono więc przebadać odczyn makrofagowy płynu mózgowo-rdzeniowego w zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych o różnej etiologii oceniając wystąpienie i dynamikę czynności żernych oraz niektóre odczyny cytochemiczne makrofagów.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 280 chorych na wirusowe i bakteryjne zapalenie opon (z.o.). Badaniami cytologicznymi objęto 248 chorych, leczonych w ostatnich latach w Klinice Chorób Zakaźnych PAM, (175 mężczyzn i 73 kobiety), w wieku od 13 do 76 lat. Badania wykonano w ostrym okresie choroby (1—7 dzień), we wczesnym okresie zdrowienia (8—14 dzień) i w późniejszym okresie zdrowienia (powyżej 14 dni). W zależności od etiologii i typu zmian w płynie mózgowo-rdzeniowym podzielono chorych na cztery grupy.

* — Praca wykonana w ramach problemu resortowego 10.MZ-V.

Grupę I stanowiło 46 chorych na zapalenie opon i mózgu wywołane przez wirus świnki. U 27 osób przebieg choroby był lekki, u 17 średnio-ciężki i tylko u 2 ciężki. Wszyscy chorzy wyzdrowieli. Wykonano 80 badań osadu płynu mózgowo-rdzeniowego.

Grupę II stanowiło 102 chorych z limfocytowym z.o., o innej etiologii wirusowej. Czynniki etiologiczne ustalono w 9 przypadkach. W jednym był to wirus *Poliomyelitis*, w dwóch wirus *Coxsackie B₃*, w trzech wirus *Coxsackie B₅* w trzech *Herpes virus varicellae-zoster*. Przebieg choroby u 56 osób był lekki, u 26 średnio-ciężki i u 20 ciężki. 101 osób wyzdrowiało, 1 zmarła. W grupie tej wykonano badania 205 osadów płynu mózgowo-rdzeniowego.

Grupa III obejmowała 82 chorych z ropnym z.o. Rozpoznanie ustalono w oparciu o ogólnie przyjęte kryteria diagnostyczne. U większości chorych leczenie antybiotykami rozpoczynano przed hospitalizacją i przed pobraniem płynu m.rdz. Rozpoznanie etiologiczne uzyskano w 23 przypadkach, z czego w 16 stwierdzono *Neisseria meningitidis*, w 6 — *Diplococcus pneumoniae* i w 1 — gronkowca złocistego. U 49 osób przebieg choroby był ciężki, a u 33 bardzo ciężki. 78 osób wyzdrowiało, u 2 przebieg choroby był powikłany wytworzeniem się ropni mózgu, 2 osoby zmarły. Zbadano 153 osady płynu m.rdz.

Grupę IV stanowiło 18 chorych z oponową lub żółtaczkowo-oponową postacią leptospirozy. U 9 chorych rozpoznano *leptospirosis icterohaemorrhagica*, u 3 *l. grippotyphosa*, u 3 *l. sejroe*, u 2 *l. canicola* i u 1 chorego *l. pomona*. Przebieg kliniczny, z wyjątkiem trzech przypadków, oceniono jako lekki. W grupie tej wykonano 37 badań osadu płynu m.rdz.

Badaniami cytochemicznymi objęto 32 chorych. Badania wykonano w ostrym okresie choroby (1—7 dzień) oraz w okresie zdrowienia.

Grupę I stanowiło 21 osób chorych na wirusowe zapalenie opon i mózgu. Wśród nich były trzy przypadki półpaścowego zapalenia mózgu (postać oponowa), w jednym rozpoznano chorobę Heinego-Medina, w 1 z.o. wywołane przez wirus *Coxsackie B₅* i w 1 przez wirus świnki. W pozostałych przypadkach z.o. limfocytarnych etiologii nie ustalono. Przebieg choroby był u 12 osób lekki, u 5 średnio-ciężki, u 3 ciężki. Jeden chory z półpaścowym zapaleniem mózgu zmarł z powodu zaostżenia choroby podstawowej (białaczka limfatyczna).

Grupa II składała się z 11 chorych na ropne zapalenie opon. W 4 przypadkach było to meningokokowe z.o., w innych czynniki etiologiczne nie zostały ustalone. Przebieg choroby był u wszystkich ciężki, 10 chorych wyzdrowiało, u 1 przebieg powikłany był wytworzeniem ropnia mózgu.

Płyn m.-rdz. pobierano do komory osadowej używanej w naszej Klinice (Kucharska-Demczuk 1974), bezpośrednio z igły punkcyjnej. Sedymentacja odbywała się w temp. pokojowej w ciągu 20 minut. Uzyskane osady suszono i barwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy w modyfikacji Szydłowskiej

i Junikiewicz (1971). W badanych preparatach obliczano liczbę makrofagów w stosunku do liczby innych komórek. W osadach, w których liczba makrofagów wynosiła 1 lub ponad 1%, określano odsetek makrofagów zawierających pochłonięty materiał komórkowy.

Wykonano następujące badania: 1) wykrywanie glikogenu metodą PAS wg Hotchkissa (Krawczyński, Osiński 1967), 2) wykrywanie lipidów wg Lisona (Krawczyński, Osiński 1967), 3) reakcję peroksydazową wg Grahama (Krawczyński, Osiński 1967), 4) test na wykrywanie esterazy nieswoistej przy użyciu alfanaftylooctanu metodą Braunsteinera (1959). Przeprowadzono badanie cytochemiczne 6, a badanie cytologiczne 1 osadu. Cytochemicznie badano tylko te płyny, w których odsetek makrofagów wynosił co najmniej 1. Z 6 osadów do badań cytochemicznych, 2 zasłużyły każdorazowo do badań kontrolnych reakcji PAS (jedno bez użycia kwasu nadjodowego i jedno z wytrawieniem śliną). Wykonano 184 podstawowe badania cytochemiczne.

WYNIKI

Wyniki badań cytologicznych ilustrują tabele 1—4. Na 80 płynów m.-rdz. w świnkowym z.o. (grupa I, tab. 1), w 9 osadach liczba makrofagów była niższa od 1%, w 37 wynosiła 1 i ponad 1%. Makrofagi (ryc. 1) pojawiały się od 2—3 dnia wystąpienia zespołu oponowego, liczba ich wzrastała w końcu pierwszego i w drugim tygodniu. W okresie zdrowienia liczba osadów z makro-



Ryc. 1. Makrofag z płynu mózgowo-rdzeniowego chorej na świnkowe zapalenie opon. Nie zawiera on dających się wyróżnić morfologicznie obcych elementów. Obok widoczny limfocyt. Pow. 1350 X.

Fig. 1. Macrophage from the cerebro-spinal fluid of a patient with mumps meningitis. It does not contain morphologically defined foreign elements. Next to macrophage lymphocyte is seen. X1350.

fagami wyraźnie obniżała się, a odsetek makrofagów w cytogramach wynosił średnio 6,5. W pierwszym tygodniu odsetek makrofagów zawierających komórki limfoidalne i części tych komórek wynosił 20,6, po 14 dniach odsetek ten wyraźnie się zmniejszał.

Tabela 1. Makrofagi płynu mózgowo-rdzeniowego w świnkowym zapaleniu opon

Table 1. Macrophages in the cerebro-spinal fluid of mumps meningitis

Dni choroby Days of disease	Liczba badanych osadów Number of studied sediments	Osady z makrofagami Sediments with macrophages				Średni odsetek makrofagów w osadach 1 i ponad 1 Average % of macrophages in sediment 1 and above 1	Odsetek makrofagów zawierających pochłonięty materiał komórkowy % of macrophages containing absorbed cell's material
		poniżej 1% below 1%		1 i ponad 1% 1 and above 1%			
		liczba badań number of data	%	liczba badań number of data	%		
1—7	39	4	10,2	21	58,8	2,7	20,6
8—14	23	4	17,4	12	52,2	6,5	16,0
powyżej above							
14	18	1	5,5	4	22,2	7,0	2,3

W grupie chorych z limfocytowym zapaleniem opon o innej etiologii wirusowej odczyn makrofagowy był większy niż w grupie I (tab. 2). Na 205 badań makrofagi (ryc. 2, 3, 4, 5) stwierdzono w 153 płynach. Więcej było osadów z odsetkiem makrofagów 1 i powyżej 1. Również średnie odsetkowe były wyższe (w 2 tyg. — 7,8%, najwyższa stwierdzana wartość średnia). Nasilenie fagocytozy w rozpatrywanych okresach choroby było podobne jak w grupie pierwszej.

Jak wynika z tabeli 3 odczyn makrofagowy w ropnych z.o. kształtował się nieco inaczej. Komórki żerne pojawiały się już w pierwszej dobie i ich średni odsetek w pierwszych 3 dniach był wyższy niż w pozostałych grupach, a następnie wzrastał od 6 do 14 dnia. W okresie zdrowienia spadek liczby makrofagów był mniejszy niż w limfocytowych z.o. W ostrym okresie choroby, kiedy to procesy zapalne są najbardziej burzliwe, 47,5% makrofagów zawierało pochłonięte granulocyty lub części tych komórek (ryc. 6, 7), w drugim tygodniu odsetek tych makrofagów był wyraźnie mniejszy (11,3), a w trzecim wynosił 5, 4. W ciężkich ropnych zapaleniach opon, częściej niż w pozostałych grupach, spotykano makrofagi z pochłoniętymi erytrocytami (ryc. 8).

Tabela 2. Makrofagi płynu mózgowo-rdzeniowego w limfocytowych zapaleniach opon o różnej etiologii wirusowej

Table 2. Macrophages in the cerebro-spinal fluid of lymphocytic meningitis of various viral etiology

Dni choroby Days of disease	Liczba badanych osadów Number of studied sediments	Osady z makrofagami Sediments with macrophages				Średni odsetek makrofagów w osadach 1 i ponad 1 Average % of macrophages in sediment 1 and above 1	Odsetek makrofagów zawierających pochłonięty materiał komórkowy % of macrophages containing absorbed cell's material	
		poniżej 1% below 1%	liczba badań number of data	%	1 i ponad 1% 1 and above 1%			liczba badań number of data
1—7	67	14	20,9	38	56,7	4,4	14,4	
8—14	72	18	25,0	46	63,9	7,8	9,3	
powyżej above	14	66	11	16,7	27	40,9	2,5	5,7

Tabela 3. Makrofagi płynu mózgowo-rdzeniowego w ropnych zapaleniach opon

Table 3. Macrophages in the cerebro-spinal fluid of purulent meningitis

Dni choroby Days of disease	Liczba badanych osadów Number of studied sediments	Osady z makrofagami Sediments with macrophages				Średni odsetek makrofagów w osadach 1 i ponad 1 Average % of macrophages in sediment 1 and above 1	Odsetek makrofagów zawierających pochłonięty materiał komórkowy % of macrophages containing absorbed cell's material	
		poniżej 1% below 1%	liczba badań number of data	%	1 i ponad 1% 1 and above 1%			liczba badań number of data
1—7	55	7	12,7	30	54,5	4,0	47,5	
8—14	53	10	18,9	32	60,4	7,4	11,3	
powyżej above	14	45	8	17,8	21	46,6	4,5	5,4

W najmniej licznej czwartej grupie chorych z leptospirowym z.o. odczyn makrofagowy był mniej nasilony niż w grupach poprzednich (tab. 4). Nasilenie fagocytozy zajmowało miejsce pośrednie między stwierdzanym w wirusowych i ropnych z.o.

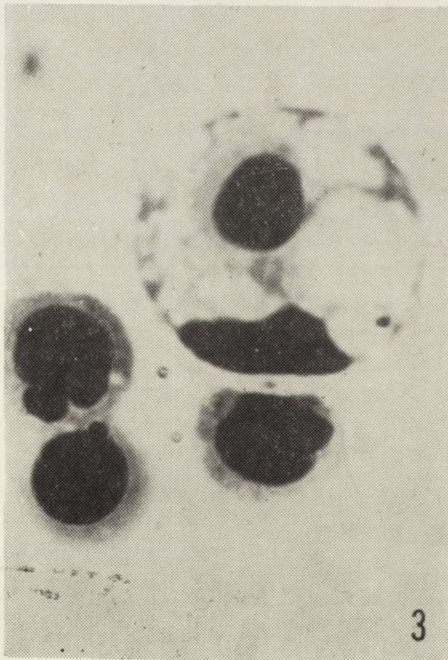
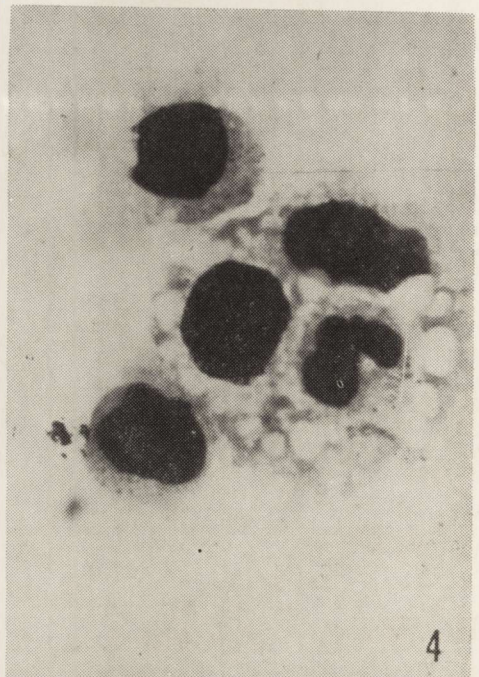
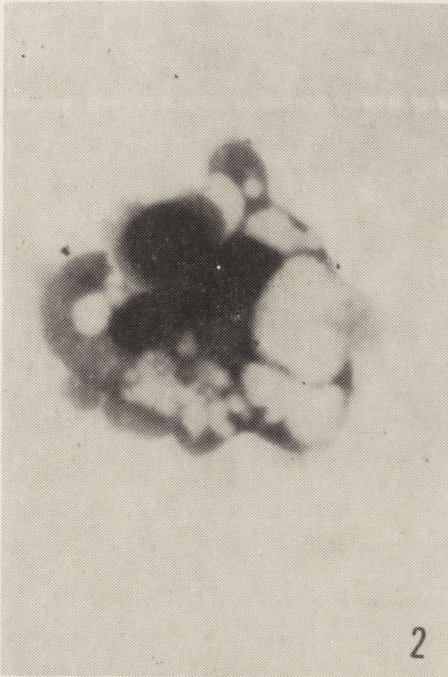


Tabela 4. Makrofagi płynu mózgowo-rdzeniowego w leptospirowym zapaleniu opon
 Table 4. Macrophages in the cerebro-spinal fluid of leptospirosis of the meninges

Dni choroby Days of disease	Liczba badanych osadów Number of studied sediments	Osady z makrofagami Sediments with macrophages				Średni odsetek makrofagów w osadach Average % of macrophages in sediment 1 and above 1	Odsetek makrofagów zawierających pochłonięty materiał komórkowy % of macrophages containing absorbed cell's material
		poniżej 1% below 1%	1 i ponad 1% 1 and above 1%		1 i ponad 1		
		liczba badań number of data	%	liczba badań number of data	%		
1—7	10	5	50,0	2	20,2	1,5	27
8—14	11	2	18,2	7	63,6	3,1	8,6
powyżej above 14	16	—	—	8	50,0	3,7	2,2

Wyniki badań cytochemicznych zestawiono w tabelach 5 i 6. Reakcja PAS w makrofagach była wyraźnie mniej intensywna w porównaniu z granulocytami. Materiał PAS-dodatni w postaci drobnych, rubinowo-czerwonych ziaren rozłożony był najczęściej na obwodzie komórki, rzadziej w centrum. W preparatach wytrawianych śliną ziarnistości znikają, co świadczy o tym, że były to ziarna glikogenu. Jak wynika z tabel makrofagi, w których reakcja PAS była dodatnia, występowały znacznie częściej w ostrym okresie w rop-

Ryc. 2. Makrofag z pochłoniętym limfocytom, materiał od chorego na limfocytarne zapalenie opon. Pow. 1350 X.

Fig. 2. Macrophage with engulfed lymphocyte, the material from a patient with lymphocytic meningitis. X 1350.

Ryc. 3. Komórka tzw. sygnetowa z pochłoniętym limfocytom, z przypadku kleszczowego zapalenia mózgu. Pow. 1350 X.

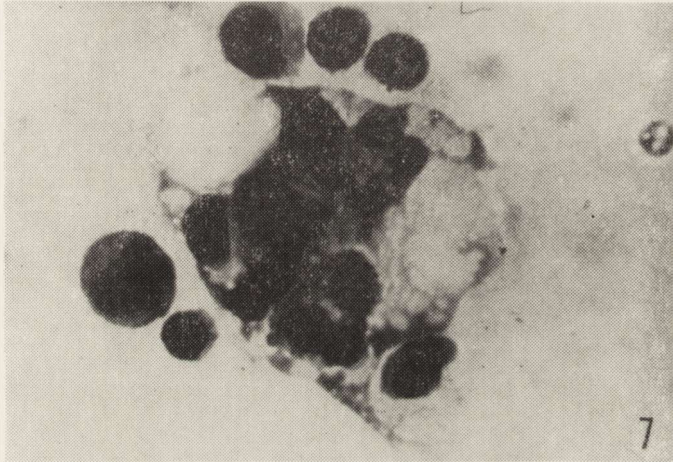
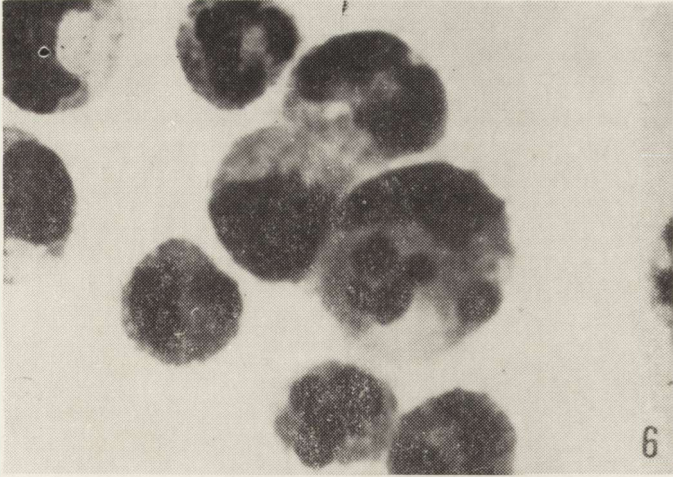
Fig. 3. So called "sygnet-like" cell with engulfed lymphocyte, from a case of tick-borne encephalitis. X 1350.

Ryc. 4. Makrofag z komórką monocytarną i bazofilem z płynu mózgowo-rdzeniowego chorego na zapalenie opon i mózgu o etiologii wirusowej. Pow. 1350 X.

Fig. 4. Macrophage with monocyte and basophile from the cerebro-spinal fluid of a patient with viral encephalo-meningitis. X 1350.

Ryc. 5. Makrofag zawierający resztki pochłoniętych komórek, z płynu mózgowo-rdzeniowego chorego na limfocytarne zapalenie opon. Pow. 1350 X.

Fig. 5. Macrophage containing the remnants of engulfed cells from the cerebro-spinal fluid of a patient with lymphocytic meningitis. X 1350.



nych niż w limfocytowych zapaleniach opon. Odsetek ich wynosił w ostrym okresie choroby w ropnych z.o. średnio 54,3, a w limfocytowych średnio 23,4. W okresie zdrowienia odsetek makrofagów PAS-dodatnich obniżył się do 20,3 w ropnych i do 5,5 w limfocytowych zapaleniach opon, a słabe nasilenie reakcji wskazywało na obecność mniejszej ilości ziaren glikogenu w okresie zdrowienia.

Reakcja barwienia Sudanem czarnym B była w makrofagach wyraźnie mniej intensywna niż w granulocytach. Czarne ziarnistości sudanofilne były drobne, skupione najczęściej w centrum komórki, w pobliżu jądra. Odsetek makrofagów zawierających ziarna sudanofilne był wysoki w ostrym okresie choroby (ponad 50,0). W okresie zdrowienia makrofagi zawierające ziarnistości sudanofilne występowały rzadziej. W zapaleniach ropnych odsetek ich wynosił średnio 16,4, a w limfocytowych średnio 12,9.

Odczyn ujawniający aktywność esterazy nieswoistej w makrofagach miał najczęściej charakter ziarnisty, czasem dyfuzyjny. Nasilenie odczynu można było określić najczęściej jako słabe (+), rzadziej jako średnie (++) , wyjątkowo jako znaczne (+++). Makrofagi esterazo-dodatnie występowały najczęściej w ostrym okresie choroby. W bakteryjnych zapaleniach opon odsetek ich wynosił 38—96, a limfocytowych 0—85. W okresie zdrowienia esterazo-dodatnie makrofagi spostrzegano znacznie rzadziej (odpowiednio średnio 13,7% i 9,5%).

Reakcja na myeloperoksydazę była słabo dodatnia (+) i wyraźnie mniej intensywna niż w granulocytach. Makrofagi myeloperoksydazo-dodatnie występowały w okresie ostrym dużo częściej w ropnych (56,3%), niż w limfocytowych (14,5%) zapaleniach opon. W okresie zdrowienia, reakcja w limfocytowych z.o. była ujemna we wszystkich makrofagach, a w bakteryjnych dodatnia w niskim odsetku (2,8) makrofagów.

Ryc. 6. Makrofag ze sfagocytowanym granulocytom i trudnym do zróznicowania fragmentem komórkowym (od chorego w 1 tyg. ropnego zapalenia opon). Obok granulocyty i komórki monocytarne. Pow. 1350 X.

Fig. 6. Macrophage with phagocytized granulocyte and non identifiable cellular fragment material (from a patient with purulent meningitis, 1 week of the disease). Next to macrophage, granulocytes and monocytes are present. X 1350.

Ryc. 7. Makrofag zawierający dwa eozynofile, komórkę monocytarną oraz trzy limfocyty, pochodzący od chorej na ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych (1 tydz. choroby). Pow. 1350 X.

Fig. 7. Macrophage containing two eosinophiles, monocyte and three lymphocytes from a patient with purulent encephalo-meningitis (1st week of disease). X 1350.

Ryc. 8. Makrofag ze sfagocytowanymi dwoma erytrocytami z przypadku ropnego zapalenia opon. Jeden z erytrocytów wyraźnie zmieniony w wyniku trawienia makrofaga. Pow. 1350 X.

Fig. 8. Macrophage with phagocytized two erythrocytes from a case of purulent meningitis. One of the erythrocyte distinctly changed due to digestive macrophage's action. X 1350.

Tabela 5. Cytochemiczne badania osadów płynu mózgowo-rdzeniowego u chorych na wirusowe zapalenie opon i mózgu

Table 5. Cytochemical studies of the cerebro-spinal fluid sediments of patients with virus cerebro-meningitis

Dni choroby Days of disease	Liczba badań cytochemicznych Number of studied sediments	Białko Protein mg/100 ml	Cytoza w 1 mm ³ Cytosis in 1 mm ³	% makrofagów w osadach % of macrophages in sediments	Odsetek makrofagów z dodatnimi reakcjami cytochemicznymi % of macrophages with positive cytochemical reactions			
					PAS	Lipidy Lipids	Esteraza nieswoista Non-specific esterase	Myeloperoksydaza Myeloperoxydase
2—7	32	26—152	41—949	1—11	3—56 $\bar{x} = 23,4 \pm 6,0$	3—87 $\bar{x} = 52,9 \pm 13,0$	0—85 $\bar{x} = 31,0 \pm 15,9$ 0 w 1 osadzie 0 in 1 sediment	0—47 $\bar{x} = 14,5 \pm 7,6$ 0 w 1 osadzie 0 in 1 sediment
9—33	72	10—156	12—102	1—23	0—34 $\bar{x} = 5,5 \pm 2,1$ 0 w 8 osadach 0 in 8 sediments	0—70 $\bar{x} = 12,9 \pm 4,0$ 0 w 5 osadach 0 in 5 sediments	0—46 $\bar{x} = 9,5 \pm 2,8$ 0 w 4 osadach 0 in 4 sediments	wszystkie ujemne all negative

Tabela 6. Cytochemiczne badania osadów płynu mózgowo-rdzeniowego u chorych na bakteryjne ropne zapalenie opon
Table 4. Cytochemical studies of the cerebro-spinal fluid sediments of patients with purulent meningitis

Dni choroby Days of disease	Biczba badań cytochemicznych Number of cytochemical studies	Białko Protein mg/100 ml	Cytoza w 1 mm ³ Cytosis in 1 mm ³	% makrofagów w osadach % of macrophages in sediments	Odsetek makrofagów z dodatnimi reakcjami cytochemicznymi % of macrophages with positive cytochemical reactions			
					PAS	Lipidy Lipids	Esteraza nieswoista Non-specific esterase	Myeloperoksydaza Myeloperoxidase
2—7	40	120— 900	2442— 20200	1—12	26—95 $\bar{x} = 54,3 \pm 6,6$	15—98 $\bar{x} = 61,1 \pm 10,6$	38—96 $\bar{x} = 71,7 \pm 6,6$	18—88 $\bar{x} = 56,3 \pm 7,4$
10—22	40	34—320	13—480	6—37	1—59 $\bar{x} = 20,3 \pm 6,8$	0—53 $\bar{x} = 16,4 \pm 6,7$ 0 w 1 osadzie 0 in 1 sediment	0—62 $\bar{x} = 13,7 \pm 5,5$ 0 w 1 osadzie 0 in 1 sediment	0—12 $\bar{x} = 2,8 \pm 1,9$ 0 w 4 osadach 0 in 4 sediments

OMÓWIENIE

W prawidłowym płynie m.-rdz. występują tylko limfocyty (70—100%) i komórki monocytarno-retikularne (0—30%). Makrofagi pojawiają się w krwawieniach podpajęczynówkowych (Sayk 1960; Wieczorek 1964; Dowżenko 1968; Hryckiewicz 1970; Dowżenko 1974; Dyken 1975; Kolmel 1976; Oehmichen 1976), w zespołach podrażnienia opon w mocznicy, porażeniu słonecznym, w zapaleniach opon wirusowych i bakteryjnych, a nawet w zespole podrażnienia opon w przebiegu infekcji górnych dróg oddechowych (Sayk 1960; Schönnenberg 1960; Scholz, Summer 1970; Guseo 1971; Dyken 1975; Kucharska-Demczuk 1975; Oehmichen 1976; Kucharska-Demczuk 1977; Kucharska-Demczuk, Trzaska 1978; Kucharska-Demczuk i wsp. 1978). W badaniach własnych pojawienie się makrofagów stwierdzano już w pierwszej dobie choroby, jednak w żadnym z badanych osadów ich odsetek nie był wyższy od 1. W 2—5 dobie obserwowano już znaczną liczbę osadów z odsetkiem makrofagów 1 lub wyższym, we wszystkich badanych grupach. W ostatnich dwóch dniach pierwszego tygodnia i w drugim tygodniu choroby obserwowano najczęściej ustępowanie objawów chorobowych, w tym także oponowych i mózgowych, natomiast odczyn makrofagowy był na silniejszy, zarówno u chorych na wirusowe jak i ropne z.o. W okresie zdrowienia we wszystkich grupach chorych makrofagi występowały znacznie rzadziej. Najpóźniej stwierdzano ich obecność w 34 dniu ropnego z.o.

W zależności od środowiska, makrofagi pochłaniały jakościowo i ilościowo różny materiał komórkowy. Nasilenie fagocytozy zależne było od rodzaju i intensywności odczynu zapalnego. W ostrym okresie zapaleń ropnych, około 47% makrofagów zawierało pochłonięte granulocyty, lub części tych komórek, a np. w zapaleniu ślnikowym, w którym nasilenie odczynu zapalnego było mniejsze i miało charakter limfocytowy, makrofagi pochłaniały materiał komórkowy pochodzący z limfocytów. Makrofagi z pochłoniętymi erytrocytami stwierdzano rzadko, głównie w ostrym okresie choroby, częściej w ropnych niż w wirusowych z.o. Szczególne znaczenie ma stwierdzenie obecności tych komórek w krwawieniach podpajęczynówkowych (Wieczorek 1964; Bischoff, Zobeli-Vassali 1966; Dowżenko 1968; Hryckiewicz 1970; Dowżenko 1974). Scholz i Summer (1970) wykazywali je w ciężkich krwotocznych zapaleniach mózgu u dzieci. Wydaje się, że ich obecność można uznać za dowód towarzyszącego zapaleniom stanu krwotocznego, nie dającego się wykryć innymi sposobami niż metoda osadowa.

W badaniach cytochemicznych i cytoenzymatycznych makrofagów płynu m.-rdz. odczynu były intensywniejsze i częściej dodatnie w ostrym okresie choroby niż w okresie zdrowienia. Może to mieć związek z nasiloną czynnością żerną makrofagów w początkowej fazie choroby, fagocytoza wymaga bowiem dostarczenia dodatkowej energii, szybciej przebiega przemiana tłuszczów,

wzmaga się glikoliza, wzrasta aktywność enzymów hydrolitycznych oraz myeloperoksydazy (Szczeklik 1974). W okresie zdrowienia obserwowano mniejszą fagocytozę, wystąpiło obniżenie zawartości glikogenu, spadek aktywności esterazy nieswoistej i myeloperoksydazy, jak również spadek zawartości lipidów, co może być spowodowane procesem starzenia się makrofagów.

Przeprowadzone badania wskazują na duże znaczenie makrofagów w procesach likwidacji stanu zapalnego opon o różnej etiologii. Z uwagi na znacznie wyższą bezwzględną cytozę w ropnych z.o., rola makrofagów w tych zapaleniach wydaje się szczególnie istotna.

Brak makrofagów w płynie m.-rdz. nie jest równocześnie zapowiedzią cięższego przebiegu choroby lub wolniejszego zdrowienia, jakkolwiek u niektórych chorych o ciężkim przebiegu choroby, w tym także w obu przypadkach ropnych z.o., zakończonych zgonem, komórek tych nie stwierdzano. Obecność makrofagów i dodatnie reakcje cytochemiczne w późniejszym okresie zdrowienia przemawiają za utrzymującym się jeszcze procesem zapalnym w oponach.

PODSUMOWANIE

1. W zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych o różnej etiologii, makrofagi w płynie mózgowo-rdzeniowym pojawiają się już na początku choroby.
2. Największe nasilenie odczynów makrofagowych stwierdzono pomiędzy 6—14 dniem choroby.
3. W ostrym okresie choroby liczba makrofagów z pochłoniętym materiałem komórkowym jest wyraźnie większa w ropnych niż w wirusowych zapaleniach opon.
4. W okresie zdrowienia liczba makrofagów fagocytydujących materiał komórkowy jest niewielka we wszystkich typach zapaleń opon.
5. Dodatnie reakcje na glikogen, lipidy, esterazę nieswoistą i myeloperoksydazę w makrofagach były znacznie silniejsze w ostrym okresie choroby niż w okresie zdrowienia w obu typach zapaleń, ale wyraźnie przeważały w zapaleniach ropnych.

A. Полевска-Еске

МАКРОФАГОВЫЕ РЕАКЦИИ СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ В ПРОЦЕССЕ ВИРУСНЫХ И БАКТЕРИЙНЫХ МЕНИНГИТОВ

Резюме

Целью работы была оценка наличия и динамики активности макрофагов спинно-мозговой жидкости больных вирусным и бактериальным менингитом.

При применении осадочного метода было проведено 475 цитологических исследований жидкости у 248 больных в том у 46 паротидной, 102 другой вирусной этиологии, 82 с гнойным и 18 с лептоспирозным менингитом.

Цитохимические исследования проводились у 32 больных, в том числе у 21 с вирусным и у 11 с гнойным менингитом. Были проведены следующие реакции: ПАСК на наличие гликогена, черный Судан на липиды, на активность неспецифической эстеразы и миелопероксидазы.

Исследования показали, что макрофаговые реакции в спинно-мозговой жидкости у больных разными менингитами имеют место часто. На первый день заболевания участие макрофагов небольшое, не превышающее 1%. Самая сильная макрофаговая реакция у больных вирусным и гнойным менингитом обнаруживалась между 6 и 14 днем болезни. В бактериальных менингитах число макрофагов содержащих клеточный материал было отчетливо больше, чем в вирусных менингитах. В период выздоровления число макрофагов, фагоцитирующих клеточный материал, было небольшое во всех типах менингитов.

Цитохимические исследования показали, что реакции на гликоген, липиды, неспецифическую эстеразу и миелопероксидазу были значительно сильнее в остром периоде заболевания, чем во время выздоровления, как в бактериальных так и в вирусных менингитах. Имели они место значительно чаще в случаях гнойных менингитов.

A. Polewska-Jeske

MACROPHAGE REACTIONS OF THE CEREBRO-SPINAL FLUID IN THE COURSE OF VIRAL AND BACTERIAL MENINGITIS

S u m m a r y

The aim of the study was to evaluate the presence and dynamic of phagocytic macrophages action in the cerebro-spinal fluid of patients with viral and bacterial infections of the leptomeninges.

By means of sedimentation technique 475 cytological studies of the cerebro-spinal fluid were done, comprising 46 cases with mumps infection, 102 of those of other viral ethiology and 11 cases with purulent meningitis. The reactions visualizing: glicogen (PAS method), lipids (Sudan Black B), non-specific esterase activity and myeloperoxidase activity were performed.

The studies pointed out that macrophage reactions in the cerebro-spinal fluid of the patients with various types of meningitides were observed frequently. On the first day of the disease a little participation of the macrophages, not exceeded 1% was observed. The most intensive reaction was stated between 6—14 days in the patients with both viral and bacterial leptomeningitis. In the latter the number of macrophages containing ingested cellular material was much greater than in viral leptomeningitis. In the later period of recovery the number of macrophages phagocytizing cellular material was small in all types of meningeal infections.

The cytochemical studies showed that reactions detecting glycogen, lipids, non-specific esterase and myeloperoxidase activities were more intensive in the acute period of the disease than in the time of recovery both in purulent and in viral leptomeningitides. These reactions were observed more often in cases with purulent leptomeningitis.

PIŚMIENICTWO

1. Abetikjan W., Demezenko T.: O makrofagalnoj transformacji limfocytow w kulture. Akad. Med. SSSR 1975, 12, 62—69.
2. Aleksandrowicz J.: Choroby krwi i narządów krwiotwórczych. PZWL, Warszawa 1975.
3. Aleksandrowicz J., Lisiewicz J.: Cytogenesis of white blood cells in view of neounitarian theory. Acta physiol. Pol. 1971, 22, 873—879.

4. Aleksandrowicz J., Lisiewicz, J.: Hematologia chorób zakaźnych. PZWL, Warszawa 1975.
5. Bischoff, H., Zobel-Vassali L.: Der blutige Liquor. Schweiz. Med. Wschr. 1966, 96, 105—112.
6. Braunsteiner H.: Esterase in leucocytes. J. Histochem. 1959, 7, 202—217.
7. Dowżenko A.: Współczesne kierunki badań w zakresie cytologii i biochemii płynu mózgowo-rdzeniowego. Neurol. Neurochir. Pol. 1968, 2, 453—460.
8. Dowżenko A.: Neurologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1974.
9. Dyken P. R.: Cerebrospinal fluid cytology. Practical, clinical usefulness. Neurology 1975, 25, 210—217.
10. Guseo A.: Über die Makrophagen des Liquor cerebrospinalis. Z. Neurol. 1971, 200, 136—147.
11. Hryckiewicz, D.: Obraz morfologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w krwawieniach podopajęczynówkowych. Roczn. PAM, Szczecin 1970, 16, 445—459.
12. Kolmel H. W.: Atlas of cerebrospinal fluid cells. Springer Verl., Berlin 1976.
13. Krawczyński J., Osiński T.: Laboratoryjne metody diagnostyczne. PZWL, Warszawa 1967.
14. Kucharska-Demczuk, K.: Nowy wzór komory osadowej do badań cytologicznych płynu mózgowo-rdzeniowego. Pol. Tyg. Lek. 1974, 52, 2283—2285.
15. Kucharska-Demczuk, K.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w niektórych wirusowych zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Neuropat. Pol. 1975, 13, 121—135.
16. Kucharska-Demczuk, K.: Zmiany w płynie mózgowo-rdzeniowym w zespole podrażnienia opon w przebiegu niektórych ostrych infekcji dróg oddechowych. Pol. Tyg. Lek. 1977, 103—106.
17. Kucharska-Demczuk, K., Trzaska, B.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w leptospirowym zapaleniu opon. Przegl. Epid. 1978, 32, 195—202.
18. Kucharska-Demczuk, K., Trzaska, B., Polewska-Jeske, A.: Odczyn komórkowy płynu mózgowo-rdzeniowego w ropnych zapaleniach opon. Przegl. Epid. 1978, 32, 203—213.
19. Oehmichen M.: Cerebrospinal fluid cytology. G. Thieme Publ., Stuttgart 1976.
20. Ptak W.: Rola makrofagów w zjawiskach immunologicznych. I. Udział makrofagów w łuku dośrodkowym odpowiedzi immunologicznej. Post. Hig. Med. Dośw. 1970, 24, 713—757.
21. Sayk J.: Zytologie der Cerebrospinalflüssigkeit. G. Fischer Verl., Jena 1960.
22. Scholz H., Summer K.: Klinischdiagnostischer Wert liquorzytologischer Befunde bei Entzündungen der Meningen. Wien. Z. Nervenheil. 1970, 28, 283—305.
23. Schönnerberg H.: Der Liquor Cerebrospinalis im Kindesalter. Stuttgart 1960.
24. Szezeklik E.: Enzymologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1974.
25. Szydłowska H., Junikiewicz R.: Modyfikacja niektórych sposobów barwienia płynu mózgowo-rdzeniowego. Neuropat. Pol. 1971, 9, 377—381.
26. Wieczorek W.: Liquorveränderungen bei Blutungen in den Subarachnoidalraum mit besonderer Berücksichtigung des Liquorzellbildes. Dtsch. Z. Nervenheil. 1964, 186, 87—100.
27. Zembala M., Ptak W.: Rola makrofagów w zjawiskach immunologicznych. II. Udział makrofagów w odporności komórkowej. Post. Hig. Med. Dośw. 1971, 25, 698—730.

Adres autora: Klinika Chorób Zakaźnych PAM, ul. Arkońska 4, 71-455 Szczecin.

C. D. A. Verwoerd, G. G. van Oostrom: *Cephalic Neural Crest and Placodes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1975. Str. 175. Ryc. 41.

Monografia została wydana w ramach znanego cyklu publikacji: "Advances in anatomy, embryology and cell biology" jako jego tom 58. Opiera się ona na badaniach wykonanych przez autorów w Zakładzie Anatomii i Embriologii Uniwersytetu w Amsterdamie.

Nazwa plakody została pierwotnie wprowadzona przez Kupffera w 1894 roku. Określała ona zgrubienia ektodermy w odcinku głowowym, pojawiające się w czasie rozwoju osobniczego u ryb. Ariëns-Kappers (1941) określił plakody jako miejscowe zgrubienie ektodermy zawiązka głowy, które są zdolne do daleko posuniętego „samoróżnicowania się” i mogą brać udział w rozwoju narządów czucia, układu nerwowego obwodowego i (być może również) mezenchymy.

Opis plakod przedstawiony przez Ariëna-Kappersa dotyczył zasadniczo niższych kręgowców — ryb i płazów — natomiast nie odnosił się do ssaków, u których problem plakod nie był dotychczas obszerniej badany. Dlatego też autorzy przeprowadzili szczegółowe obserwacje zarodków mysich zwracając uwagę na grubość i stopień rozwoju ektodermy odcinka głowowego w różnych okresach rozwoju. Ze szczególnym naciskiem badacze podkreślają, że — jak wynika z ich własnych obserwacji oraz piśmiennictwa — rozwój embrionalny ektodermy przebiega u myszy na ogół podobnie jak u człowieka.

Badania przeprowadzono na 120 zarodkach w wieku 7—10 dni po zapłodnieniu. Każde kolejne stadium rozwoju jest szczegółowo opisane, ponadto autorzy przedstawiają mikrofotografie przekrojów poprzecznych oraz schematy i zdjęcia modeli opracowanych na podstawie seryjnych skrawków. Ilustrują one w sposób przejrzysty poszczególne fazy rozwoju odcinka głowowego.

W dalszej części publikacji autorzy omawiają uzyskane wyniki i porównują je z mniej licznymi obserwacjami powstawania plakod u człowieka. Badane przez nich fazy rozwoju u myszy (stadia 5—17 somitów) odpowiadają 15—30 dniom życia zarodkowego człowieka, a więc okresowi istotnemu z punktu widzenia powstawania wad rozwojowych.

Następnie omawiają kolejno rozwój poszczególnych plakod: przysadkowej, węchowej, nadskrzelowych, usznej i soczewkowej. Dynamizm ich powstawania jest różnorodny. Najistotniejsze jest, zdaniem autorów, nierównomierne cieżczenie ektodermy w różnych odcinkach powierzchni ciała. Autorzy obszernie dyskutują genezę lokalnych różnic jej grubości, a w szczególności problem czynników powodujących większą grubość ektodermy w odcinkach tworzących zawiązki plakod. Oczywiście odpowiedź na to pytanie nie jest w obecnym stanie wiedzy jednoznaczna.

Powyższe obserwacje morfologiczne, które w przyszłości będą prawdopodobnie uzupełnione o badania histochemiczne i czynnościowe, mają istotną wartość dla embriologów i neuroanatomów. Jednak również dla szerszego grona specjalistów zainteresowanych problemami powstawania wad rozwojowych głowy, a zwłaszcza wrodzonymi zaburzeniami narządów zmysłów i nerwów czaszkowych, badania te mogą dostarczyć wiele potrzebnych informacji.

Olgierd Narkiewicz

KATARZYNA KUCHARSKA-DEM CZUK, HALINA MAJCHROWICZ
ANNA POLEWSKA-JESKE*

ZMIANY CYTOLOGICZNE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO W PRZEBIEGU PRZEWLEKŁYCH I PRZEWLEKAJĄCYCH SIĘ ZAPALEŃ OPON MÓZGOWO-RDZENIOWYCH I MÓZGU**

Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych PAM Szczecin
Kierownik: prof. dr J. Januszkiewicz

Istotny postęp jaki dokonał się w ciągu ostatnich lat w diagnostyce i terapii chorób zapalnych ośrodkowego układu nerwowego (OUN) dotyczy głównie ich postaci ostrych. Przewlekłe zapalenie opon i mózgu nie należą do częstych, stanowią jednak poważne zagrożenie dla zdrowia i życia i nastroczają niejednokrotnie duże trudności różnicowo-rozpoznawcze, a także lecznicze. W tej sytuacji wyłania się konieczność poszukiwania uzupełniających metod rozpoznania, a tym samym odpowiedniego leczenia przyczynowego. Jedną z nich jest badanie cytologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego (m.-rdz.) metodą osadową wg zasady podanej przez Sayka (1954). Wg danych z piśmiennictwa (Bischoff 1960; Sayk 1960; Bischoff 1963; Seidel-Kołodziejowa 1964; Olischer, Sayk 1967; Dowżenko 1968; Kolar, Zeman 1968; Scholz, Summer 1970; Hrazdira 1974; Oehmichen 1976); a także na podstawie własnych obserwacji (Kucharska-Demczuk 1974; Kucharska-Demczuk i wsp. 1974; Kucharska-Demczuk 1975; Kucharska-Demczuk, Trzaska 1978; Kucharska-Demczuk i wsp. 1978) badania cytologiczne płynu stanowią cenną pomoc w diagnostyce chorób zapalnych OUN.

Ponieważ informacje dotyczące zmian cytologicznych płynu w przewlekłych zapaleniach opon i mózgu są w piśmiennictwie nieliczne i ograniczone głównie do zapaleń swoistych — gruźliczych, kiłowych i grzybiczych (Matheis 1960; Sayk 1960; Seidel-Kołodziejowa 1964; Oehmichen 1976), postanowiono prześledzić dynamikę zmian cytologicznych płynu w aspekcie diagnostyki przewlekłych i przewlekających się zapaleń opon i mózgu o innej etiologii.

* — pomoc techniczna st. techn. Maria Zaremba.

** — praca wykonana w ramach problemu resortowego 10.MZ-V.

MATERIAŁ I METODY

W latach 1972—79 w Klinice Chorób Zakaźnych PAM hospitalizowano 462 przypadki zapalenia opon m.-rdz. i mózgu. U 152 chorych rozpoznano zapalenie ropne, u 303 wirusowe i u 7 toksoplazmowe. Z liczby 462 chorych tylko u 12 (2,6%) przebieg choroby był przewlekły lub przewlekający się. Rozpoznanie przewlekłego, bądź przewlekającego się zapalenia, przyjęto na podstawie utrzymywania się zmian zapalnych w płynie, a także niektórych objawów klinicznych przez okres dłuższy niż 6 tygodni. Wyodrębnienie dwóch postaci — przewlekłej i przewlekającej się — było niezbędne dla celów porównawczych, między innymi dla porównania dynamiki zmian cytologicznych płynu w zależności od okresu i przebiegu choroby oraz nasilenia objawów klinicznych.

Przyjęto założenie, że utrzymywanie się objawów klinicznych i zmian w płynie m.-rdz. powyżej 6 tygodni i do 3 miesięcy wyznacza przewlekający się przebieg choroby. Jeżeli choroba trwała dłużej niż 3 miesiące — klasyfikowano ją jako przewlekłą. Zdajemy sobie sprawę z niepełnej ścisłości tego kryterium, ale dla potrzeb praktycznych przyjęliśmy je jako najprostsze i wystarczające.

Wśród badanych było 6 mężczyzn i 6 kobiet w wieku od 15 do 56 lat. U 3 chorych (wiek 29—41 lat) rozpoznano zapalenie ropne, w tym u 2 przewlekające się o etiologii meningokokowej i u 1 przewlekłe o nieustalonym czynniku etiologicznym. Przyczyną przewlekłego zapalenia było obustronne zapalenie ucha środkowego. Leczenie zachowawcze nie było skuteczne i dopiero skojarzenie operacji i antybiotykoterapii doprowadziło do wyzdrowienia. Z materiału pobranego podczas operacji ucha środkowego wyhodowano *Proteus vulgaris* wrażliwy jedynie na streptomycynę i karbenicylinę. Nie sądzimy, aby drobnoustrój ten był powodem przewlekłego stanu zapalnego, jeżeli w ogóle miał znaczenie etiologiczne. Dlatego rozpoznajemy w tym przypadku etiologię ropną o nie ustalonym czynniku przyczynowym.

U 4 chorych (2 kobiet i 2 mężczyzn w wieku od 36 do 56 lat) rozpoznano nabytą toksoplazmozę układu nerwowego. W 3 przypadkach choroba miała przebieg przewlekły, w jednym przewlekający się. U wszystkich rozpoznanie potwierdzono dodatnimi (czynami serologicznymi (odczyn wiązania dopełniacza i immunofluorescencji z antygenem toksoplazmowym), a w jednym stwierdzono w płynie obecność pasożytów. Przypadek ten, przedstawiony podczas VI Międzynarodowego Kongresu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych w 1974 r. w Warszawie (Kucharska-Demczuk i wsp. 1974), dotyczył postaci oponowo-mózgowej o rzadko spotykanym przebiegu, w którym po okresie 5-letniej remisji, wystąpił w styczniu 1978 r. nawrót dolegliwości z objawami oponowymi i mózgowymi oraz znacznie nasilonymi zmianami zapalnymi w płynie. Obecnie po leczeniu chora czuje się dobrze, pozostaje nadal w stałej kontroli ambulatoryjnej i klinicznej, z uwagi na utrzymywanie się zmian

w płynie. Z tych samych względów, stałej obserwacji wymaga inna chora, u której przewlekły proces zapalny opon m.-rdz. trwa ponad rok. W 2 innych przypadkach objawy ustąpiły w okresie 7 tygodni i 4 miesięcy, a przebieg choroby określono jako średnio-ciężki. W okresie obserwacji (1 rok) nie stwierdzono wznowy choroby.

U 5 chorych rozpoznano przewlekające się wirusowe zapalenie opon m.-rdz. i mózgu. W jednym stwierdzono etiologię świnkową. U 4 rozpoznano limfocytowe zapalenie opon o nie ustalonej etiologii, prawdopodobnie wirusowej. W jednym przypadku przebieg choroby był ciężki, w pozostałych średnio-ciężki. Wszyscy chorzy wyzdrowieli w okresie 7—10 tygodni.

Badanie cytologiczne płynu m.-rdz. wykonywano metodą osadową wg zasady podanej przez Sayka (1954) w komorze własnej konstrukcji (Kucharska-Demczuk 1974). Płyn do badania pobierano bezpośrednio z igły do komory podczas nakłucia lędźwiowego. Osady suszono na powietrzu, a następnie barwiono metodą May-Grünwalda-Giemsy i oceniano jakościowo oraz ilościowo w wartościach względnych. W zależności od etiologii, postaci klinicznej i fazy choroby stwierdzano odczyny granulocytowe, monocytarno-retikularne i makrofagowe oraz limfoidalne i plazmatyczno-komórkowe. Wykonano łącznie 89 badań, w tym w zapaleniach przewlekłych 52 i w przewlekających się 37.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wyniki niektórych badań przedstawiono w tabelach. Tabela 1 dotyczy przewlekłych, tabela 2 — przewlekających się zapaleń opon.

Odczyny granulocytowe. Granulocyty płynu m.-rdz. badanych chorych nie różniły się od granulocytów krwi obwodowej. Częściej niż w zapaleniach ostrych spotykano postaci zwyrodnieniowe jak np. formy kuliste, komórki z nadmierną segmentacją jąder i z toksyczną ziarnistością w cytoplazmie (ryc. 1). Dwukrotnie stwierdzono w granulocytach obecność bakterii (*N. meningitidis*). Największe odczyny granulocytowe spostrzegano w zapaleniach ropnych, przy czym w postaciach przewlekłych utrzymywały się one dłużej i w znacznie większym odsetku, niż w postaciach przewlekających się. W przypadku usznopochodnego zapalenia opon do 9 miesiąca choroby utrzymywał się stały, wysoki (73—92%) odczyn granulocytowy. Wysoki odczyn granulocytowy płynu (47%) obserwowano w przypadku nawrotowej postaci toksoplazmozy, a również dość znaczny (30%), w początkowej fazie choroby w innym przypadku o tej samej etiologii. Podobne dane dotyczące odczynów granulocytowych płynu w toksoplazmozie OUN przytacza Rabinowicz (1971). U 2 chorych udział granulocytów w cytogramach płynu był niewielki (poniżej 1% i 4%). W przebiegu toksoplazmowych zapaleń opon obserwowano wyraźne i niekiedy wysokie odczyny eozynofilowe płynu. Zdaniem więk-

Tabela 1. Przewlekłe zapalenie

Table 1. Chronic

Etiologia Etiology	Nr przypadku Case number	Wiek (lata), Płeć Age (years) sex	Czas trwania choroby Duration of disease	Stadium choroby Stage of disease	Cytoza w mm ³ Cytosis in mm ³
Ropna Purulent	1	41 M	9 mies.	2 tyg.	509
			(10 mies. operacja)	3 weeks	8607
			wyleczenie	4	728
			9 months	3 mies.	444
			(at 10 months operated)	8 months	200
recovery	9	27			
			10	3	
Toksoplazmowa Toxoplasmosis	2	51 K F	7 miesięcy	5 mies.	64
			months	months	
				7	2
		56	po 5 latach remisja	2 tyg.	205
			remission after 5 years	25 weeks	389
				30	60
	3	36	po 18 miesiącach remisja	1	1283
		K	remission after 18 months	2 tyg.	85
		F		7 weeks	93
				12	123
				22	41
				18 mies.	18
				months	
	4	50	po 4 mies. remisja	1	711
		M	remission after 4 months	2 tyg.	47
				6 weeks	137
				10	139
				28	69

+ stwierdzono obecność w osadzie
present in a sediment

— nie stwierdzono w osadzie
absent in a sediment

opon mózgowo-rdzeniowych
encephalo-meningitis

Cytoza płynu mózgowo-rdzeniowego — wartości w % — Cerebro-spinal fluid cytogram
in %

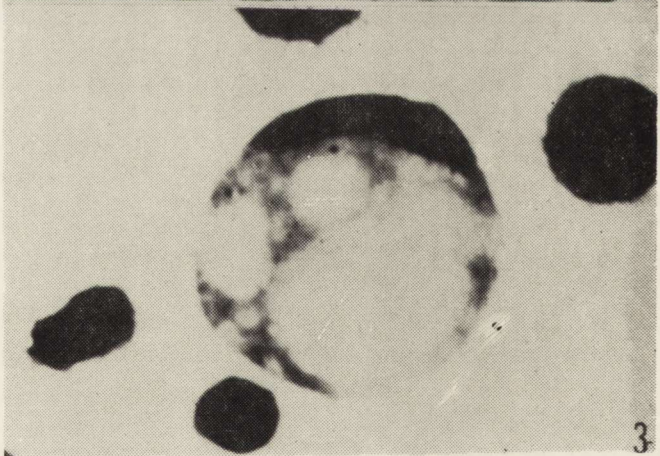
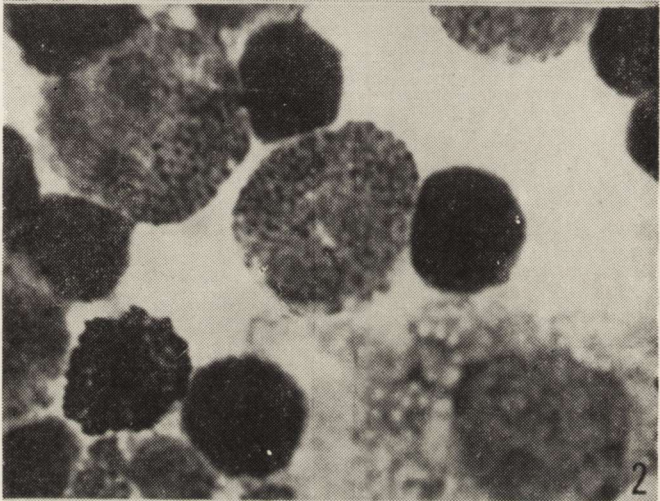
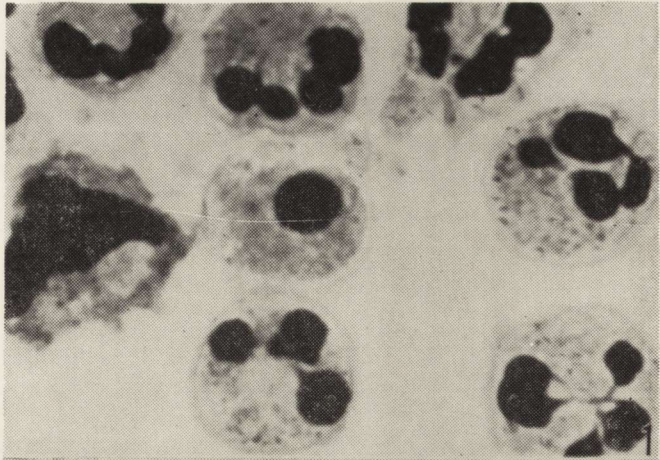
granulocyty obojętne neutrophile granulocytes	granulocyty kwasochłonne acidophile granulocytes	granulocyty zasadochłonne basophile granulocytes	komórki monocytarne-retikularne monocytes-reticulocytes	makrofagi macrophages	komórki limfocytarne lymphocytes	formy przejściowe transitional forms	komórki plazmatyczne plasmocytes	mitozy mitoses	inne others
83	—	—	12	—	5	—	—	—	—
91	—	—	6	2	1	+	—	—	—
73	—	+	7	1	17	—	2	—	+
92	—	—	6	—	2	—	+	—	—
81	—	—	9	+	10	—	+	—	—
83	—	—	1	—	15	—	1	—	—
—	—	—	30	—	70	—	—	—	—
+	+	—	7	3	36	24	29	+	1
—	—	—	20	—	80	—	—	—	—
47	+	+	9	1	30	4	9	—	+
1	+	—	20	1	55	7	16	+	+
8	—	—	22	4	55	5	6	—	—
30	9	+	50	1	10	+	—	—	—
—	13	—	24	3	45	9	6	+	—
—	12	—	18	2	54	11	3	—	—
—	9	—	9	1	69	10	2	—	—
—	2	—	16	2	72	8	+	+	—
18	1	—	21	10	44	5	1	—	—
+	32	7	12	6	32	10	1	+	—
—	21	1	7	10	48	2	11	—	—
—	33	3	24	11	25	3	1	—	—
—	17	+	41	2	36	3	1	—	—
—	18	+	17	5	54	5	1	—	—

inne — komórki dwu- i wielojądrowe, olbrzymie i nietypowe
others — bi- and multinucleated, giant and atypical cells

Tabela 2. Przewlekające się zapalenie
Table 2. Prolonged encephalo-

Etiologia Etiology	Nr przypadku Case number	Wiek (lata), płeć Age (years) and sex	Czas trwania choroby Duration of disease	Stadium choroby Stage of disease	Cytoza w mm ³ Cytoss in mm ³
Ropna meningokowa	5	31	12 tyg weeks	1 dzień day	22813
		M		3 tyg. 6 weeks	174 174
Purulent meningo- coccie	6	29	8 tyg. weeks	12	18
		M		4 dzień day	15570
				2 tyg. 3 weeks 8	432 13 53
Toksooplazmowa	7	44	8 tyg. weeks	5 dzień day	248
		M		2 tyg. 4 weeks 8	138 69 43
Toxoplasmosis	8	20	10 tyg. weeks	2	216
		K		3 tyg. 4 weeks	163 110
				F	10
	9	25	8 tyg. weeks	1	341
		K		3 tyg. 6 weeks 8	76 75 30
				F	
Wirusowa	10	40	8 tyg. weeks	1	315
		K		2 tyg. 5 weeks 8	163 123 35
Viral	11	25	7 tyg. weeks	2 tyg.	332
		K		3 weeks 7	308 28
				F	
	12	16	8 tyg. weeks	1	426
		M		2 tyg. 5 weeks 8	512 51 44
				F	

Objaśnienia jak w tabeli 1. Legend as in Table 1.



szości autorów odczyny te są dość charakterystyczne dla pasożytniczych i alergicznych chorób układu nerwowego (Sayk 1960; Péter, Kovács 1967; Kolar, Zeman 1968; Oehmichen 1976). W naszym materiale w jednym przypadku przewlekłego zapalenia toksoplazmowego, stałemu i wysokiemu (17—33%) odczynowi eozynofilowemu, towarzyszył wyraźny (1—7%) odczyn bazofilowy (ryc. 2). Znaczenie bazofilii płynu w patogenezie chorób układu nerwowego nie jest jasne. Zdaniem Reisa i wsp. (1973) mają one wskazywać na reakcje immuno-alergiczne opon.

Odczyn monocytarno-retikularny i makrofagowy.
Jak wiadomo, odczyn monocytarno-retikularny płynu występuje często w różnych chorobach OUN. W ostrych stanach zapalnych opon są charakterystyczne dla fazy zdrowienia (Sayk 1960; Bischoff 1963; Olischer, Sayk 1967; Kolar, Zeman 1968; Scholz, Summer 1970; Kucharska-Demczuk 1975; Oehmichen 1976; Kucharska-Demczuk, Trzaska 1978; Kucharska-Demczuk i wsp. 1978). W omawianej grupie chorych, z przewlekłym i przewlekającym się stanem zapalnym, występował znaczny polimorfizm komórek monocytarno-retikularnych: formy sygnetowe (ryc. 3), podziałowe (ryc. 4), a także komórki olbrzymie dwu- i wielojądrowe (ryc. 5) spotykano znacznie częściej, niż w postaciach ostrych. Wg Sayka (1960) i innych (Wieczorek i wsp. 1967; Hrazdira 1974; Oehmichen 1976), komórki olbrzymie i wielojądrowe występują głównie w przewlekłych procesach ziarnicznych, często w gruźlicy. W materiale własnym stwierdziliśmy je także w zapaleniach wirusowych, czasem toksoplazmowych.

Makrofagi wykazywały różną, niekiedy dość znaczną aktywność fagocytarną. W zapaleniach wirusowych zwykle zawierały pochłonięte limfocyty, w ropnych granulocyty. W późniejszych okresach choroby widywano w nich resztki sfagocytowanych komórek oraz inne bezpostaciowe złoży (ryc. 6a, b, c).

Ryc. 1. Odczyn granulocytarny płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadku przewlekłego zapalenia opon i mózgu: widoczna forma kulista oraz granulocyty wykazujące nadmierną segmentację jąder i ziarnistości toksyczne w cytoplazmie. Pow. 1350 X.

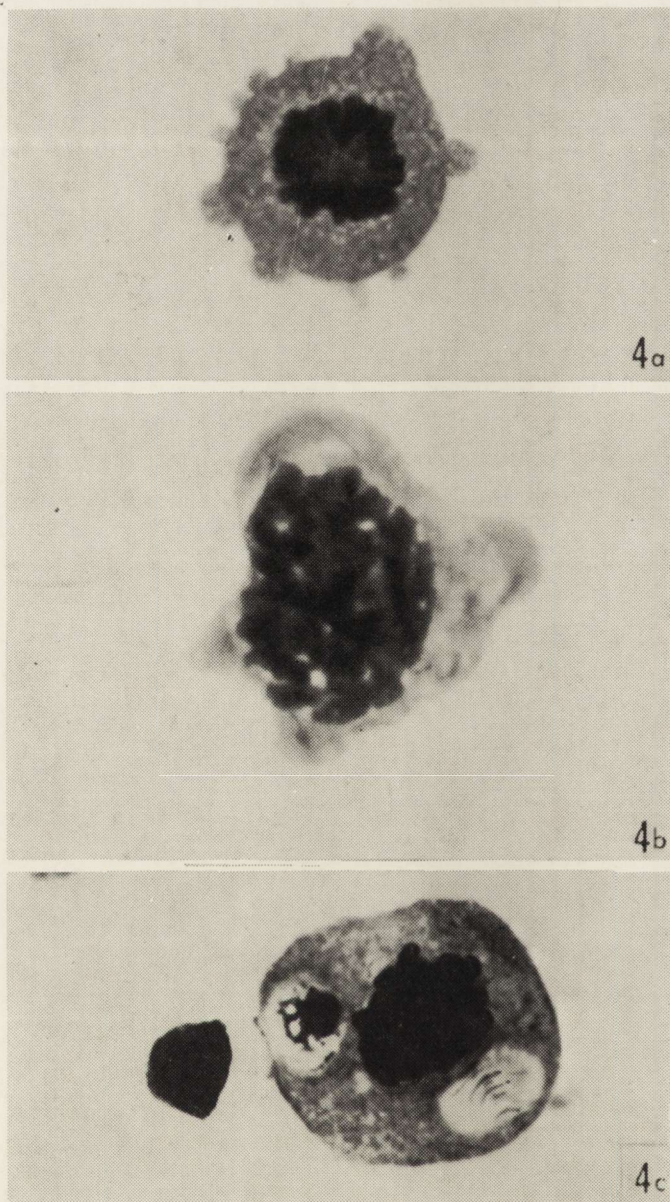
Fig. 1. Granulocytic reaction in the cerebro-spinal fluid in a case of prolonged encephalo-meningitis: "ball" form and granulocytes with abnormal segmentation of nuclei and toxic granules in the cytoplasm. X 1350.

Ryc. 2. Odczyn eozynofilny z wyraźnym udziałem bazofilów w płynie mózgowo-rdzeniowym chorego na przewlekłą toksoplazmozę opon. Pow. 1350 X.

Fig. 2. Eosinophilic reaction with a great participation of basophiles in the cerebro-spinal fluid of a patient with chronic toxoplasmosis of the leptomeninges.

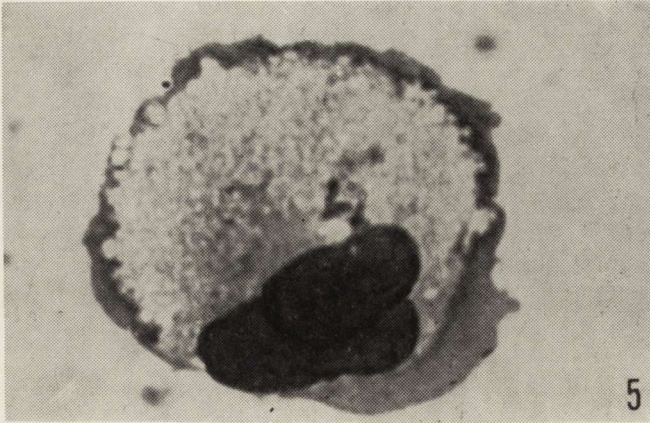
Ryc. 3. Forma sygnetowa komórki monocytarnej w przewlekającym się wirusowym zapaleniu opon. Pow. 1350 X.

Fig. 3. Signet-like form of monocyte in prolonged viral leptomeningitis. X 1350.



Ryc. 4. Mitozy komórkowe (stadium metafazy) płynu mózgowo-rdzeniowego w przypadkach przewlekających się wirusowych (a) i ropnych zapaleń opon (b) oraz w przewlekłym zapaleniu toksoplazmowym (c). Zwraca uwagę obecność wypustek (a i b) oraz zmian wodniczkowych i złogów nieustalonego pochodzenia (c).

Fig. 4. Mitoses (metaphase) in the cerebro-spinal fluid in the prolonged viral (a), and purulent (b) leptomeningitis as well as in the chronic toxoplasmosis (c). The presence of processes (a and b), vacuoles and deposits of unknown origin is worth of noting. X 1350.



Ryc. 5. Olbrzymia komórka dwujądrowa w płynie chorej na przewlekające się wirusowe zapalenie opon. Pow. 900 X.

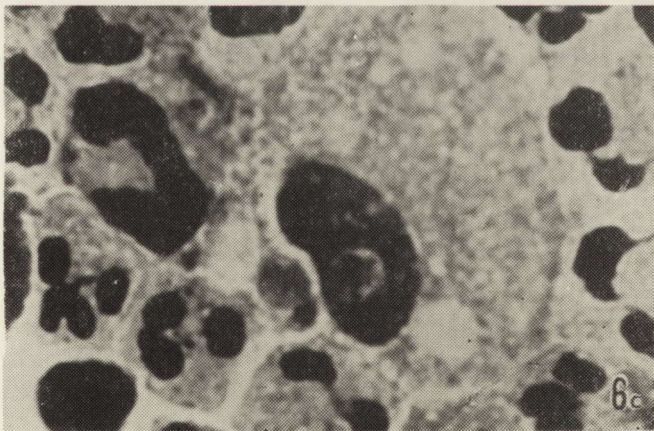
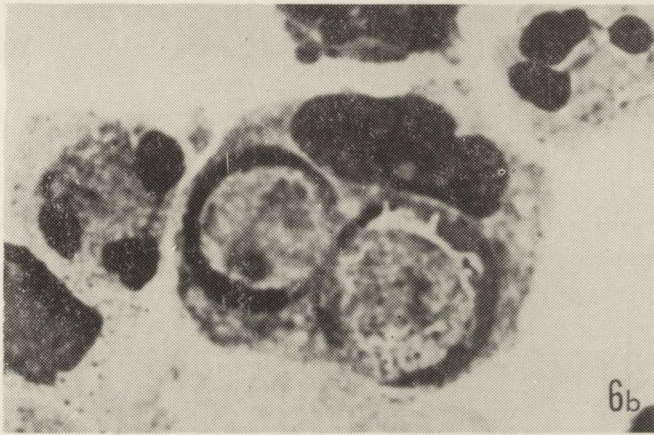
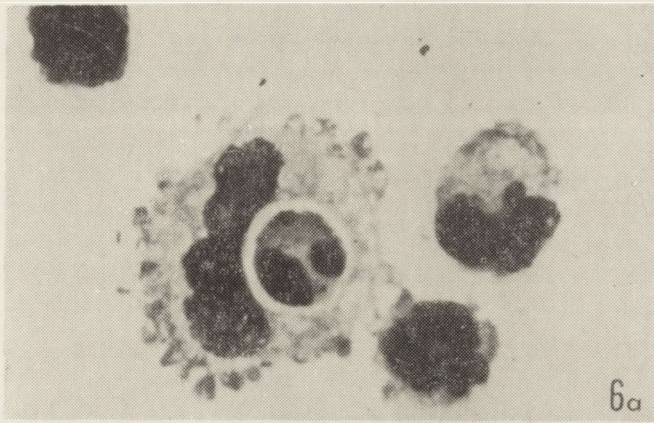
Fig. 5. Giant binucleated cell in the cerebro-spinal fluid in a patient with prolonged viral leptomeningitis. X 900.

Dynamika odczynów monocytarno-retikularnych i makrofagowych była różna. W przewlekających się zapaleniach ropnych, niskie na początku choroby odczyny monocytarno-retikularne, wzrastały w miarę zdrowienia. Podobną dynamikę obserwowano w zapaleniach wirusowych. Natomiast w przewlekłym, usznopochodnym ropnym zapaleniu opon były one stale niskie. W zapaleniach toksoplazmowych zarówno w początkowych, jak i w późniejszych fazach choroby obserwowano tak wysokie, jak i niskie odczyny monocytarno-retikularne.

Odczyny limfoidalne i plazmatyczno-komórkowe. W przewlekających się zapaleniach o etiologii wirusowej, charakter odczynów limfoidalnych był podobny do spotykanych w zapaleniach ostrych, ale utrzymywały się one dłużej — od 7 do 10 tygodni. W zapaleniach ropnych stwierdzono różnicę między przypadkami o przebiegu przewlekającym się i przewlekłym. Obniżony odczyn limfoidalny w obu rodzajach zapalenia utrzymywał się stale w postaci przewlekłej, natomiast w przewlekającej się — wzrastał równolegle do ustępującej cytozy i odczynu granulocytowego, podobnie jak w zapaleniach ostrych.

W toksoplazmozie, w postaci przewlekającej się, odczyn limfoidalny był wysoki (70—95%), w odróżnieniu od postaci przewlekłych, w których był wyraźnie niższy zwłaszcza w okresach zaostrzeń i nawrotów (10—30%) i wzrastał dopiero podczas ustępowania dolegliwości i objawów klinicznych.

Formy przejściowe, podziałowe oraz komórki dwujądrowe i nietypowe spotykano częściej w zapaleniach wirusowych i toksoplazmowych. Największe odsetki form przejściowych (24%) i komórek plazmatycznych (29%) obserwo-

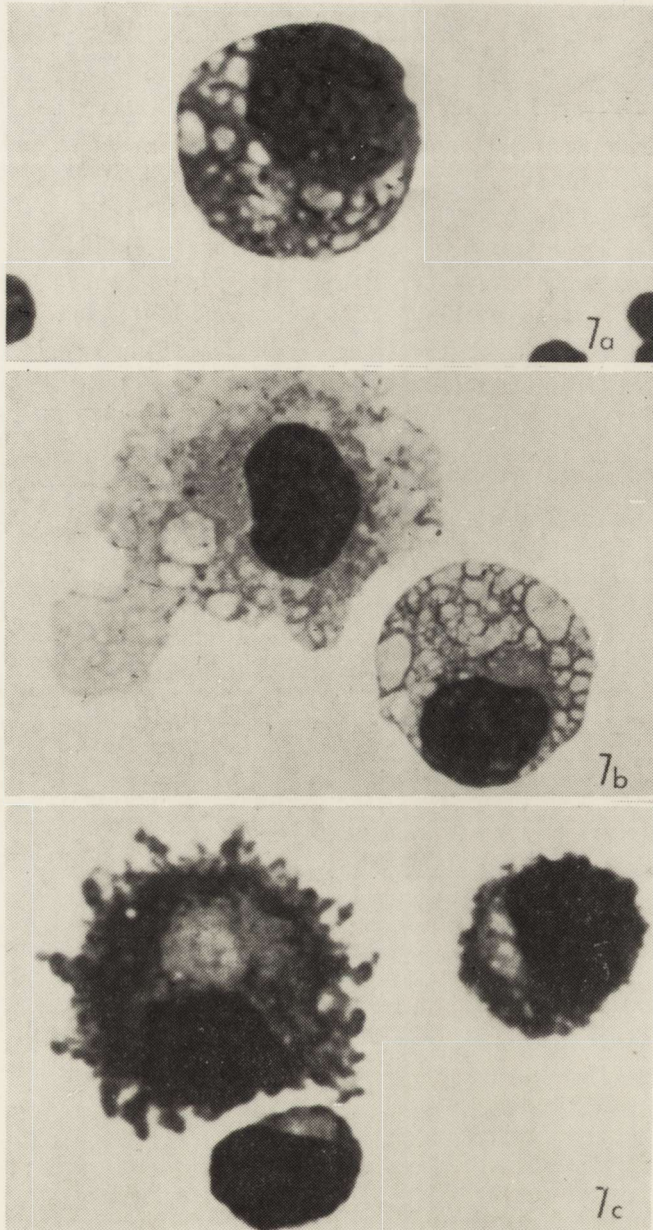


wano w przypadku nawrotowej postaci toksoplazmozy. Zjawisko to może przemawiać, zgodnie z poglądem wielu autorów, za oponowym pochodzeniem tych komórek powstających na drodze blastycznych transformacji elementów limfoidalnych płynu (Bischoff 1960; Sayk 1960; Olischer, Sayk 1967; Peter 1967; Oehmichen 1976). W płynie wszystkich omawianych chorych, niezależnie od etiologii, stwierdzano obecność komórek plazmatycznych. Wielu badaczy podkreśla dużą wartość diagnostyczną tych elementów komórkowych w przewlekłych procesach zapalnych OUN (Bischoff 1960; Sayk 1960; Bischoff 1963; Péter 1967; Kolar, Zeman 1968; Guseo 1971; Hrazdira 1974; Bosch, Oehmichen 1976; Oehmichen 1976). Wysokie (52%) odczyny plazmatyczno-komórkowe w płynie spostrzegali Péter (1967) w przebiegu wągrzycy mózgu. Bosch i Oehmichen (1976), wykazali obecność tych komórek w 80% przypadków ropni mózgu. W naszym materiale największe odczyny plazmatyczno-komórkowe obserwowano w płynie chorych na toksoplazmowe zapalenie opon i mózgu. Komórki plazmatyczne tych chorych wykazywały znaczne różnice morfologiczne, w porównaniu z plazmocytami krwi obwodowej i szpiku. Spotykano komórki ze zmianami wodniczkowymi, tworami kroplistymi i ciałkami Russell'a (ryc. 7a, b). Czasem widywano komórki dwu i trójjądrowe, nietypowe formy podziałowe oraz plazmocyty z licznymi wypustkami cytoplazmatycznymi (ryc. 7c). Na szczególną uwagę zasługują, obserwowane u chorej z nawrotową postacią toksoplazmozy, komórki plazmatyczne, zawierające dotychczas nie opisywane śródplazmatyczne twory (ryc. 8). Być może są to zmiany zwyrodnieniowe, nie można jednak wykluczyć, że w przebiegu przewlekłego procesu zapalnego komórki plazmatyczne płynu magazynują nieznaną bliżej materiał biologiczny. Zmiany wodniczkowe i ciałka Russell'a w komórkach plazmatycznych płynu opisywali także inni autorzy (Sayk 1960; Péter 1967; Oehmichen 1976), przyjmując, że zmiany te świadczą o aktywności immunologicznej komórek związanej z produkowaniem przeciwciał.

W przebiegu ropnych i wirusowych zapaleń opon, komórki plazmatyczne występowały często, zwykle jednak w niewielkim odsetku (do 2%). Tylko w jednym przypadku przewlekającego się meningokokowego zapalenia opon, w 6 tygodniu choroby, obserwowano wyraźny (10%) odczyn plazmatyczny,

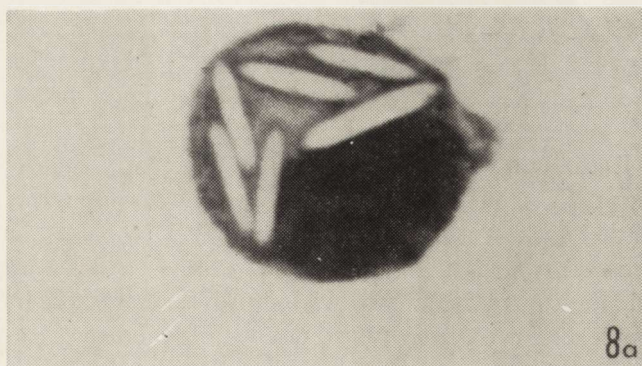
Ryc. 6. Odczyny monocytarno-retikularne i makrofagowe płynu mózgowo-rdzeniowego w przewlekającym się wirusowym (a) oraz w przewlekłym ropnym zapaleniu opon (b, c); a) makrofag z resztkami sfagocytowanej komórki; b) makrofag zawierający bezpostaciowe złoże, kształtu kulistego; c) makrofag ze zmianami wodniczkowymi w jądrze i cytoplazmie oraz śródplazmatycznymi bezpostaciowymi złożami w strefie przyjądrowej. Pow. 1350 X.

Fig. 6. Monocyte-reticulocyte and macrophage reaction in the cerebro-spinal fluid in a case of prolonged viral (a) and chronic purulent leptomeningitis (b, c); a) macrophage with vacuolated cellular remnants; b) macrophage containing round amorphous deposits; c) macrophage with vacuolated nucleus and cytoplasm. Intracytoplasmic, amorphous deposits are present in the perinuclear zone. X 1350.



Ryc. 7. Komórki plazmatyczne płynu mózgowo-rdzeniowego chorych na przewlekłe ropne (a) oraz toksoplazmowe zapalenie opon (b, c). Widoczne zmiany wodniczkowe i twory kropliste przypominające ciała Russella (a, b) oraz komórka z licznymi wypustkami cytoplazmatycznymi i wyraźną strefą przejaśnienia przyjądrowego (c). Pow. 1350 X.

Fig. 7. Plasmocytes in the cerebro-spinal fluid in the patients with chronic purulent (a) and toxoplasmatic leptomeningitis (b, c). Vacuoles and drop-like structures resembling Russell bodies (a, b), and the cell with numerous cytoplasmic processes and distinct, clear perinuclear zone (c) are visible. X 1350.



Ryc. 8. a, b, c. Komórki plazmatyczne płynu chorej z nawrotową postacią toksoplazmozy, zawierające dotychczas nie obserwowane twory śródplazmatyczne. Zwraca uwagę różne ich wielkość, kształt i ułożenie. Pow. 1350 X.

Fig. 8. a, b, c. Plasmocytes in the cerebro-spinal fluid in a patient with recurrent toxoplasmosis containing not described before intraplasmatic structures. Differences in size, shape and configuration of cells are striking. X 1350.

Z przedstawionych danych wynika, że:

1. Utrzymywanie się odczynów granulocytowych i komórek plazmatycznych w płynie m.-rdz. wskazuje na przewlekły czynny proces ropny opon i mózgu.

2. Odczyny limfoidalne ze znacznym udziałem form przejściowych i komórek plazmatycznych oraz wyraźnym, niekiedy wysokim odczynem eozynofilowym i niekiedy współistniejącym bazofilowym są charakterystyczne dla przewlekłych zapaleń toksoplazmowych. Często w tych zapaleniach występują komórki nietypowe, dwu- i wielojądrowe oraz komórki olbrzymie. W zaostrzeniach i nawrotach mogą występować odczyny granulocytowe.

3. W zapaleniach wirusowych, o przewlekającym się przebiegu, zmiany cytologiczne są podobne do obserwowanych w postaciach ostrych, utrzymują się jednak dłużej, częściej występują komórki plazmatyczne, dwujądrowe i olbrzymie, więcej jest też form podziałowych.

K. Kucharska-Demczuk, X. Майхрович, А. Полевска-Еске

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПИННО-МОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ В ХРОНИЧЕСКИХ МЕНИНГИТАХ

Резюме

При помощи осадочной техники исследовали цитологические изменения спинно-мозговой жидкости 12 больных хроническим воспалением спинно-мозговых и мозговых оболочек (2,6% общего числа леченных). В зависимости от этиологии, клинического вида и фазы болезни оценивались гранулоцитные, моноцитарно-ретикулярные и макрофаговые, а также лимфоидные и плазматическо-клеточные реакции. Обращается внимание на значение плазматическо-клеточных реакций в диагностике хронических менингитов. В одном случае возвратной формы токсоплазмоза наблюдали до сих пор не описанные морфологические изменения плазматических клеток.

Была обнаружена зависимость цитологических изменений жидкости от вида инфекции и продолжительности заболевания. Это может быть полезно в диагнозе, дифференцировании и лечении.

K. Kucharska-Demczuk, H. Majehrowicz, A. Polewska-Jeske

CYTOLOGICAL CHANGES OF THE CEREBRO-SPINAL FLUID IN THE COURSE OF CHRONIC AND PROLONGED ENCEPHALO-MENINGITIS

S u m m a r y

Cytological changes with cerebro-spinal fluid were studied by means of sedimentation technique in 12 patients suffering of chronic and prolonged encephalo-meningitis (2.6% of all treated patients). Granulocyte, monocyte-reticulocyte, macrophage, limphoidal and plasmocytic cells reactions were found dependently on the etiology, clinical form and phase of the disease. The

attention was directed to the diagnostic value of plasmocytic cells reaction in chronic and prolonged encephalo-meningitis. In one case of recurrent toxoplasmosis special plasmatic cell morphological abnormalities were observed; the phenomenon being not described previously. The dependence of cytological cerebro-spinal fluid changes on the kind of the neuroinfection and disease period was found. This can be helpful both in the diagnostic and differentiation procedure as well as in the direction of treatment.

PIŚMIENNICTWO

1. Bischoff A. M.: Der derzeitige Stand der Liquor-Cytodiagnostik. Schweiz. Med. Wochr. 1960, 90, 479—487.
2. Bischoff A. M.: L'examen cytologique du liquide cephalo-rachidien par la methode de sedimentation et de filtration. Etude de 5000 cas. Rev. Neurol. 1963, 108, 567—575.
3. Bosch I., Oehmichen M.: Diagnostische Wertigkeit von Plasmazellen im Liquor unter besonderer Berücksichtigung ihres Nachweises beim Hirnabszess. Nervenarzt 1976, 47, 618—622.
4. Dowżenko A.: Współczesne kierunki badań w zakresie cytologii i biochemii płynu mózgowo-rdzeniowego. Neur. Neurochir. Pol. 1968, 2, 453—460.
5. Guseo A.: Über die Makrophagen des Liquor cerebrospinalis. Z. Neurol. 1971, 200, 136—147.
6. Hrazdira C. L.: Cellular system of the cerebrospinal fluid. Acta Fac. Med. Univ. Brno., Brno 1974, 97—97.
7. Kolar O., Zeman W.: Spinal fluid cytology. Arch. Neurol. 1968, 18, 44—51.
8. Kucharska-Demczuk K.: Nowy wzór komory osadowej do badań cytologicznych płynu mózgowo-rdzeniowego. Pol. Tyg. Lek. 1974, 29, 2283—2285.
9. Kucharska-Demczuk K., Trzaska B., Brykczyńska H., Stępień M.: Contribution to the diagnosis of acquired toxoplasmosis of the nervous system. Mat. Nauk. VI Międzynarodowego Kongresu Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych, Warszawa 1974, t. II, 333—337.
10. Kucharska-Demczuk K.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w niektórych wirusowych zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu. Neuropat. Pol. 1975, 13, 121—135.
11. Kucharska-Demczuk K., Trzaska B.: Obraz cytologiczny płynu mózgowo-rdzeniowego w leptospirowym zapaleniu opon. Przegl. Epid. 1978, 32, 195—202.
12. Kucharska-Demczuk K., Trzaska B., Polewska-Jeske A.: Odczyn komórkowy płynu mózgowo-rdzeniowego w ropnych zapaleniach opon mózgowo-rdzeniowych. Przegl. Epid. 1978, 32, 203—213.
13. Matheis H.: Die Cryptococose (Torulose) des Nervensystems. Dtsch. Z. Nervenheilk. 1960, 180, 595—601.
14. Oehmichen M.: Cerebrospinal fluid cytology, G. Thieme, Stuttgart 1976.
15. Oliseher R. M., Sayk J.: Liquor-insbesondere Zellbefunde bei Meningitiden. Forsch. Neurol. Psychiatr. 1967, 35, 453—474.
16. Péter A.: The plasma cells of the cerebrospinal fluid. J. Neurol. Sci. 1967, 4, 227—233.
17. Péter A., Kovács F.: Eosynophil granulocyte a liquorban. Idegyóg. Szlc. 1967, 20, 159—168.
18. Rabinowicz Th.: Acquired cerebral toxoplasmosis in the adult. W: Toxoplasmosis, Red. D. Hentsch, Heber, Bern 1971, 200—201.
19. Reis J. B., Mota I., Bei A., dos Reis Filho J. B., Zukerman E.: Os basófilos do Liquido Cefalorraqueno. Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo) 1973, 31, 10—20.

20. Sayk J.: Ergebnisse neuer liquorzytologischer Untersuchungen mit dem Sedimentkammer-Verfahren. *Ärzt. Wochenschr.* 1954, 9, 1042—1046.
21. Sayk J.: Zytologie der Cerebrospinalflüssigkeit, Fischer, Jena 1960.
22. Scholz H., Summer K.: Klinisch-diagnostischer Wert liquorzytologischer Befunde bei Entzündungen der Meningen. *Wien. Z. Nervenheilk.* 1970, 28, 283—305.
23. Seidel-Kolodziejowa A.: Wartość badania płynu mózgowo-rdzeniowego metodą Sayka dla różnicowania gruźliczego i limfocytarnego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych. *Gruźlica* 1964, 32, 297—303.
24. Wiczorek V., Stahl J., Bock R.: Zum Vorkommen von Riesenzellen im Liquorcerebrospinalis. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 1967, 192, 246—264.

Adres autorów: Klinika Chorób Zakaźnych Instytutu Chorób Wewnętrznych PAM, ul. Arkońska 4, 71-455 Szczecin.

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

EXPERIMENTAL MODELLING OF HEPATOGENIC ENCEPHALOPATHY*

Department of Neuropathology, Medical Research Centre Polish Academy
of Sciences

Head of Department: Prof. dr M. J. Mossakowski

Hepatogenic encephalopathy in humans results from either chronic or acute liver insufficiency, from abnormal abdominal venous flow, bypassing hepatic portal circulation and from intolerance to gut proteins (Fischer, 1974). In most conditions all or at least two of these factors operate in combination. In a great proportion of cases, liver cirrhosis, being the most common cause of the chronic liver insufficiency, is accompanied by severe abnormalities in the portal intrahepatic blood flow expressed among others by the formation of the pathological extrahepatic venous collateral circulation. In addition Diemer (1978) had shown pathological intrahepatic shunting, being the result of liver cirrhosis. Clinical exacerbation resulting from dietary factors in cases of chronic liver cirrhosis or porto-caval shunting emphasizes the pathogenic importance of gut overloading with proteins. As great as the number of different factors precipitating the occurrence of the hepatic encephalopathy are, their final effects most likely fit into one of the three basic pathogenic mechanisms. Most of the clinical observations are clearly indicating that hepatic encephalopathy develops as a result of absolute or relative liver insufficiency, related with all probability to its "detoxicating" function. The possible role of an unknown active compound or compounds produced by healthy liver regulating the brain function and lacking in case of liver damage cannot be ruled out in the light of Geiger's studies (1958) and recently those of Egan and coworkers (1976).

Most of the experimental models, aiming at reproduction in animals of the pathological conditions corresponding to hepatogenic encephalopathy in

* The paper was presented at II Joint Neuropathological Symposium organized by Neuropathological Society of GDR and Polish Association of Neuropathologists, Erfurt (GDR), June 9—11, 1980.

humans are directed towards one of the above mentioned pathogenic mechanisms. They can be roughly divided into three following groups:

1. Porto-caval shunting, with many different surgical variants very often supplemented with additional precipitating factors.
2. Toxic liver damage, with a wide range of chemical compounds used.
3. Experimentally induced disturbances in the ammonia metabolism in animals with unchanged both liver and portal circulation, simulating the condition occurring in human in case of intolerance to gut protein.

All of the above mentioned procedures lead both to significant metabolic disturbances in the central nervous system and to its structural abnormalities.

In human material the most common pathological feature found in the brain in cases of liver disease are astrocytic abnormalities consisting in the concomitance of their progressive and regressive reaction. There is a widespread, generalized proliferation of astrocytic nuclei with a significant hypertrophy of individual astrocytes. These abnormalities appear against the background of regressive changes taking the form of more or less advanced klastodendrosis (Fig. 1). Numerous astrocytes lacking processes and their ameboid forms are seen. Alzheimer cells, type II in all their forms are present in practically all grey structures and in the subcortical white matter (Fig. 2). In a great majority of cases the intranuclear glycogen inclusions are to be found both in naked nuclei and in those of unchanged astrocytes (Fig. 3). Opalski cells (Fig. 4) occur in a great proportion of chronic cases, but they are absent from all acute ones.

The second feature common to most cases of hepatogenic encephalopathy is spongy degeneration of the brain tissue. Cortico-subcortical junction (Fig. 5), cerebral cortex, basal ganglia and cerebellar dentate nuclei are the sites of predilection for spongiotic changes. Relatively good preservation of myelin and neurons, as well as lack of either glial or mesenchymal reaction are fairly typical features of spongy degeneration observed in hepatogenic encephalopathy. Rare cortical necroses, neuronal abnormalities, taking the form of either non-specific degeneration or patchy neuronal loss, features of brain edema and hyperemia complete the pathomorphology of hepatogenic encephalopathy.

Aiming in reproduction of pathological changes typical for human hepatogenic encephalopathy, since several years two basic experimental models were used in our laboratory. They represented both the group of toxic liver damage and that of experimental porto-caval shunting. The toxic liver damage group comprises two subgroups. The first one most commonly used consisted in chronic carbon tetrachloride intoxication, in the second one alteration of the liver parenchyma was due to low protein in the diet, the content of protein in strictly standardized food being reduced to 10.8 per cent (Mossakowski, 1966; Mossakowski et al. 1970; Ostenda et al. 1976). The shunting

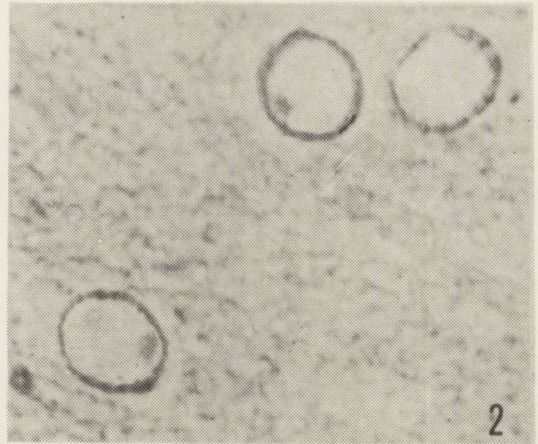
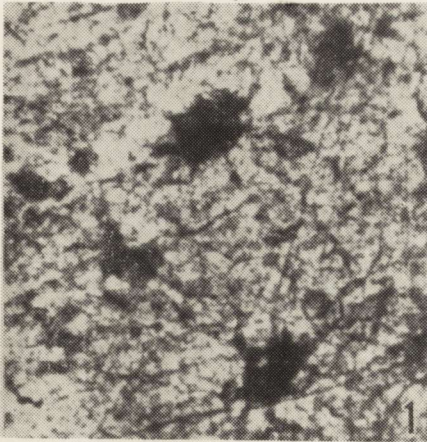


Fig. 1. Hypertrophied astrocytes with severe klastodendrosis in a case of hepatogenic encephalopathy. Cajal. X 400.

Ryc. 1. Zaawansowana klastodendroza przerosłych astrocytów w przypadku encefalopatii wątrobowej. Cajal. Pow. 400 X.

Fig. 2. Alzheimer II cells in a case of hepatogenic encephalopathy. H-E. X 600.

Ryc. 2. Komórki Alzheimer'a typu II w przypadku encefalopatii wątrobowej. H-E. Pow. 600 X.

Fig. 3. Naked nucleus with a glycogen inclusion in a case of hepatogenic encephalopathy. PAS. X 1500.

Ryc. 3. Nagie jądro z wtrętem glikogenowym w przypadku encefalopatii wątrobowej. PAS. Pow. 1500 X.

Fig. 4. Opalski cell in a case of hepatogenic encephalopathy. H-E. X 600.

Ryc. 4. Komórka Opalskiego w przypadku encefalopatii wątrobowej. H-E. Pow. 600 X

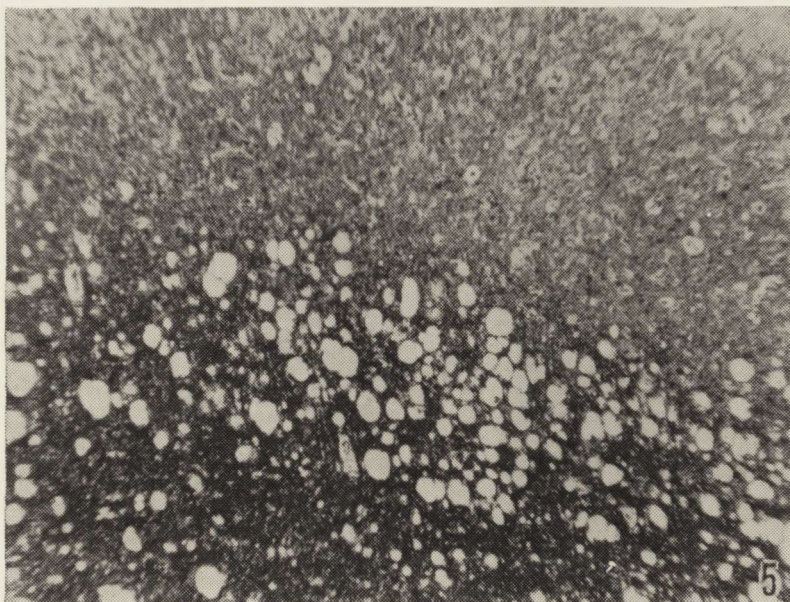


Fig. 5. Spongy degeneration of the cortico-subcortical junction in a case of porto-systemic encephalopathy. Good preservation of myelin is worth mentioning. Heidenhain. X 75.

Ryc. 5. Zwyródnienie gąbczaste istoty białej na pograniczu korowo-podkorowym w przypadku encefalopatii wrotno-układowej. Zwraca uwagę dobre utrzymanie mieliny. Heidenhain. Pow. 75 X.

experiments have been performed in two species of animals, namely in dogs in which additionally meat intoxication was applied, and in rats (Mossakowski, 1966; Mossakowski et al., 1977). There was no increase of serum ammonia in either of toxic groups, which contrasts with Diemer's observations (1978). However in the carbon tetrachloride group, an increased concentration of ammonia within the brain tissue was shown by Hilgier (1980).

In both groups with porto-caval shunt a significant enhancement of serum ammonia was observed as a rule. In rats this was accompanied by its increase in the brain (Hilgier, 1980). In both dogs and rats ammonia level at the end of experiment was generally lower than in the first weeks following the performance of Eck's fistula.

In rats kept on low protein diet for a period of nine month the most remarkable brain abnormality consisted in hypertrophy of astrocytes (Fig. 6) and occurrence of numerous enlarged astrocytic nuclei (Fig. 7) corresponding to typical Alzheimer II cells (Mossakowski, 1966). Glial abnormalities were generalized, involving both grey and white structures, with a predilection to the cortico-subcortical junction of the cerebrum and dentate nucleus of the cerebellum. Marked glial proliferation, although present in some animals, was not a striking feature, neither were pathological abnormalities of other

types of glia. Severe neuronal loss and nerve cells degeneration, taking the form of either chromatolysis or vacuolar degeneration completed the neuropathological picture of the brains of experimental animals. Neuronal abnormalities were mostly confined to the cerebral cortex and cerebellar dentate nuclei. Their intensity in other structures was much less. Slight spongiosis was present only in two of twenty five animals. It is worth pointing out that the astrocytic abnormalities were found only in those animals in which severe damage of liver parenchyma was present.

In rats with liver cirrhosis induced by carbon tetrachloride intoxication for the period of two, four and six months significant astroglial proliferation and hypertrophy involving most of grey formations of the brain were present (Fig. 8). These were accompanied by severe degeneration of astrocytes, seen both in the light and electron microscopy (Mossakowski et al., 1970; Ostenda et al., 1976). Naked nuclei distributed throughout the central nervous system were the most striking feature (Fig. 9). Other types of glia were not involved. Slight spongy degeneration of the white matter was present only in two animals of the whole series. Abnormality in the capillary permeability for both silver nitrate, seen in the dark field microscopy (Mossakowski et al., 1970) and for horse radish peroxidase observed in the electron-microscope (Mossakowski et al., 1976) are worth mentioning. Cerebral blood vessels, though unchanged in light microscopy on the ultrastructural level revealed an increased number of pinocytotic vesicles and abnormal localization of the activity of nucleoside phosphatases (Ostenda et al., 1975; Mossakowski et al. 1978). Nonspecific neuronal degeneration was a persistent supplementary finding. Notably, glial abnormalities and blood vessel permeability changes showed an evident dependence on the duration of the experiment.

In dogs with Eck's fistula there were some differences in the neuropathology between those with and without "meat intoxication" (Mossakowski, 1966). In both subgroups diffuse neuronal loss, mostly cortical and hippocampal and severe nonspecific neuronal degeneration dominated the pathological picture of the brains (Fig. 10). Though most pronounced in animals with additional hypovolemic shock, considered as one of the precipitating factors, they were present in all animals of both experimental subgroups. Glial abnormalities were less evident; however, astrocytic proliferation and hypertrophy (Fig. 11), concomitant with klastodendrosis were observed throughout. Typical Alzheimer cells II were found only in some cases. Contrary to the previous experimental groups, spongy degeneration of both cerebral cortex and the white matter was present in almost all the examined cases in the subgroups without "meat intoxication" and in all with meat diet (Fig. 12). The intensity of these changes was similar in both subgroups, despite the significant difference in the duration of experiment, which was extended to 67—191 days in one subgroup and limited to 9—21 in the other.

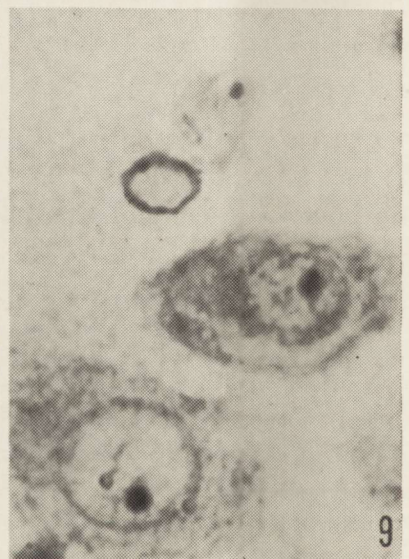
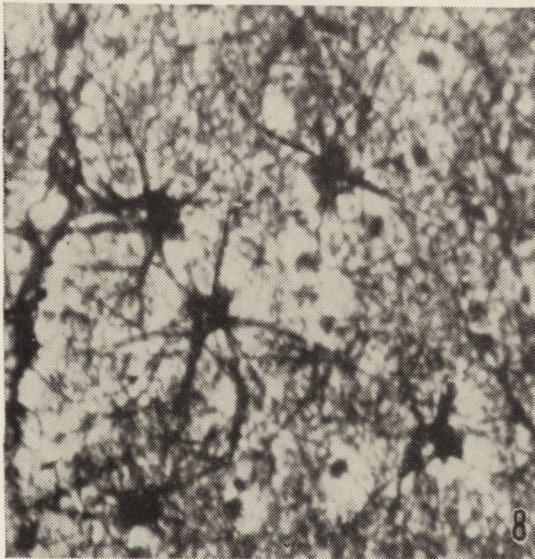


Fig. 6. Hypertrophy of the fibrillary astrocytes in the white matter in a rat kept for 9 months on low-protein diet. Cajal. X 300.

Ryc. 6. Przerost astrocytów włóknistych w istocie białej u szczura przetrzymwanego przez okres 9 miesięcy na diecie niskobiałkowej. Cajal. Pow. 300 X.

Fig. 7. Naked nucleus in the cortex of a rat kept for 9 months on low-protein diet. H-E. X 450.

Ryc. 7. Nagie jądro w korze mózgu szczura przetrzymwanego przez okres 9 miesięcy na diecie niskobiałkowej. H-E. Pow. 450 X.

Fig. 8. Increased number of hypertrophied astrocytes with some features of klastodendrosis within the white matter of a rat with carbon-tetrachloride intoxication. Cajal. X 600.

Ryc. 8. Zwiększona liczba przerosłych astrocytów z cechami klastodendrozy w istocie białej szczura z zatruciem czterochlorkiem węgla. Cajal. Pow. 600 X.

Fig. 9. Naked nucleus in the cortex of a rat with carbon tetrachloride intoxication. Cresyl-violet. X 600.

Ryc. 9. Nagie jądro w korze mózgu szczura z zatruciem czterochlorkiem węgla. Fiolet krezylu. Pow. 600 X.

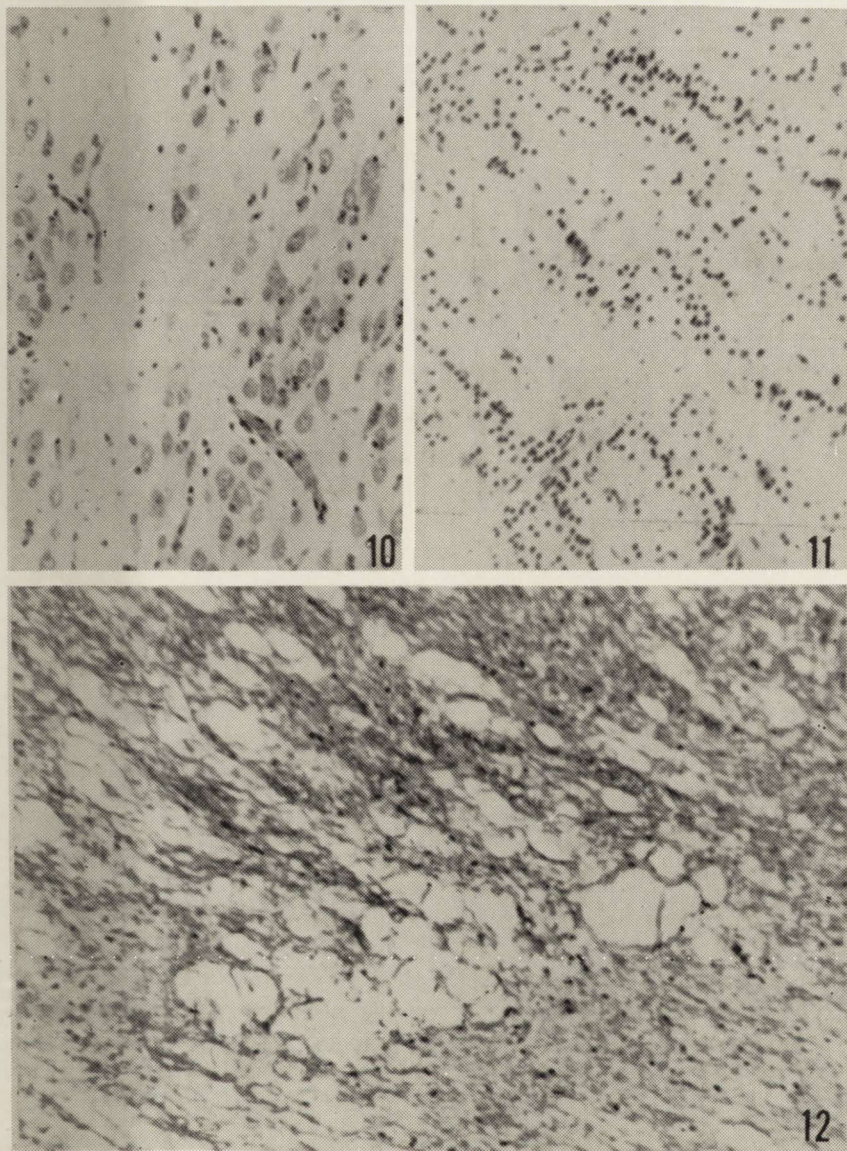


Fig. 10. Neuronal loss in the cortex of a dog with Eck's fistula. Cresyl-violet. X 600.

Ryc. 10. Ubytki neuronalne w korze mózgu psa z przetoką Eck'a. Fiolet krezylu. Pow. 600 X.

Fig. 11. Glial proliferation in the white matter in a dog with Eck's fistula. H-E. X 300.

Ryc. 11. Rozpętnie gleju w istocie białej u psa z przetoką Eck'a. H-E. Pow. 300 X.

Fig. 12. Focal spongiosis of the subcortical white matter in a dog with Eck's fistula. Klüver-Barrera. X 120.

Ryc. 12. Ogniskowe zgębczenie podkomorowej istoty białej u psa z przetoką Eck'a. Klüver-Barrera. Pow. 120 X.

In rats in which porto-caval shunt was performed for a period ranging from 7 to 10 weeks the typical abnormality was the appearance of enlarged light astrocytic nuclei (Fig. 13), some of them with irregular, lobulated outlines, overimposed over a slight glial proliferation (Fig. 14). The glial alterations in the earlier stage were confined mostly to basal nuclei, thalamus, some motor brain stem nuclei and dentate nucleus of the cerebellum. In later stage they also involved neocortex and Ammon's horn. Neurons and other types of glial cells were not altered, and so were the myelin sheaths. Spongy degeneration was absent.

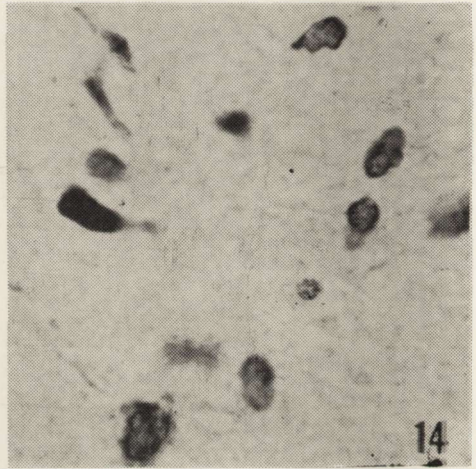
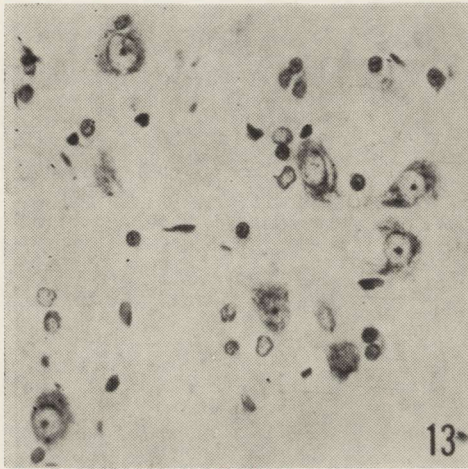


Fig. 13. Numerous naked nuclei in thalamus in a rat with porto-caval shunt. Cresyl-violet. X 400.

Ryc. 13. Liczne nagie jądra we wzgórzu szczura z przetoką wrotno-układową. Fiolet krezyłu. Pow. 400 X.

Fig. 14. Alzheimer cells type II with lobulated outlines within the dentate nucleus in a rat with porto-caval shunt. Cresyl-violet. X 1200.

Ryc. 14. Komórki Alzheimer'a typu II z pofalowanymi zarysami jąder w jądrze zębatym mózdzku u szczura z zespoleniem wrotno-układowym. Fiolet krezyłu. Pow. 1200 X.

In none of the experimental group we were able to demonstrate intranuclear glycogen inclusions in astrocytes. Neither Alzheimer cells type I nor Opalski cells were present, except one case from the porto-caval shunt group in rats in which one cell with the morphological features of Alzheimer cell type I was seen within a glial scar of the traumatic origin.

The leading pathological changes found in all experimental groups are summarized in table 1. Their comparison clearly indicates differences between human and animal material on one hand and between various experimental models on the other. The most notable difference between both chronic and

Table 1. Comparison of brain abnormalities in different experimental models of hepatogenic encephalopathy

Experimental model, animals	Astrocytic abnormalities			Neuronal abnormalities			Spongy degeneration	Vascular abnormalities	
	proliferation	hypertrophy	degeneration	Alzheimer cells type II	neuronal loss	neuronal degeneration		morphology	permeability
Low-protein diet, rats	moderate	severe	severe	numerous	severe	severe	rare	not examined	
Carbon tetrachloride intoxication, dogs	severe	severe	severe	numerous	slight	moderate	rare	changed	increased
Porto-caval shunt, dogs	moderate	moderate	severe	occasional	severe	severe	frequent	not examined	
Porto-caval shunt, rats	moderate	moderate	not observed	numerous	not observed	not observed	not observed	not examined	

acute hepatogenic encephalopathy in humans and their experimentally induced counterparts in animals consists in the fact, that in each experimental model only some elements of the pathology typical for human cases are present. Hepatogenic encephalopathy due to chronic carbon tetrachloride intoxication, closest in its neuropathological picture to that seen in chronic human cases differ from them in an almost complete absence of tissue spongiosis. This abnormality fairly common to most of the human cases (Mossakowski 1966; Mossakowski et al., 1974) was on the contrary seen in dogs with Eck's fistula, in which glial abnormalities, mostly those taking the form of the so-called metabolic glia, were much less pronounced. On the other hand this type of tissue alteration was the only change in the brains of rats with portocaval shunt. The neuropathological picture of brains in rats kept on low-protein diet was dominated mostly by astrocytic hypertrophy concomitant with degenerative changes and naked nuclei formation, while glial proliferation seen both in human cases and in other experimental models, was much less pronounced. Intranuclear glycogen inclusions, fairly common in human pathology were absent in all experimental groups. So were Opalski cells occurring in a great proportion of chronic cases in humans, but not in the acute ones. Their presence in animals was described by Taraszewska et al. (1971) in a case of an aged dog with a primary cancer of the liver. In our human material, including both chronic and acute hepatogenic encephalopathy, Alzheimer cells type I were not seen. Contrary to this Cavanagh and Kyu (1976) demonstrated them in rats with porto-caval shunt. This type of cells was also seen in one of our experimental models. Neuronal losses and degeneration, which in most human cases, except the acute ones, are rather second rate features, dominated the neuropathology in dogs with Eck's fistula, regardless the survival duration of animals, being absent in rats with identical experimental pathology.

The above mentioned differences between various types of experimental models of hepatogenic encephalopathy are even more striking when the results obtained by other authors are taken into consideration (table 2—4), not mentioning the observations described by earlier authors, such as for instance encephalitis resulting from Eck's fistula in dogs (Balo, Kapasy, 1932) or basal ganglia necrosis due to hepatic artery ligation (Kirschbaum, 1923). Some of the more recent papers point out the involvement of oligodendroglia (Zamora et al., 1973; Diemer, 1978), myelin sheaths (Cavanagh, Kyu, 1971a), nerve cell processes and their endings (Rizzuto, Gonatas, 1974; Kornfeld, 1975).

Despite those variations, the general pattern of brain abnormality, consisting in the appearance of astrocytic changes seems to be common to most of the experimental models. The second feature characteristic for human hepatogenic encephalopathy, namely spongy tissue degeneration is less

Table 2. Brain pathomorphology in animals with toxic liver damage

Author, animals and damaging factor	Essential pathological changes in the brain
Lapham (1961), rats, CCl ₄	astrocytic proliferation, Alzheimer cells II
Mossakowski (1966), rats, low-protein diet	astrocytic hypertrophy, Alzheimer cells II
Mossakowski et al. (1971, 1978), rats, CCl ₄	astrocytic proliferation and degeneration. Alzheimer cells II, increased permeability of blood vessels (LM and EM), neuronal degeneration
Lahl (1974), rabbits, CCl ₄	astrocytic proliferation, enlargement of astrocytic nuclei, hyperchromatic nerve cells, status spongiosus in the white matter
Hopper et al. (1974), sheeps, lasiocarpine	spongy degeneration of the white matter
Diemer (1978), rats, CC ₁₄	lobulated and enlarged astrocytes, decrease in number of oligodendrocytes and vacuoles in the white matter, neuronal degeneration

Table 3. Brain pathomorphology in porto-caval shunting

Author and animals	Essential pathological changes in the brain
Mossakowski (1966), dogs	astrocytic proliferation, Alzheimer cells II, spongy degeneration
Benson et al. (1970), dogs	astrocytic proliferation, Alzheimer cells II
Cavanagh, Kyu (1971a), rats	abnormal astrocytic nuclei in some cerebral structures
Cavanagh, Kyu (1971b), rats	abnormal astrocytic nuclei, Alzheimer cells I, while wounding, lesions of myelin and oligodendroglia
Norenberg et al. (1972), dogs	astrocytic proliferation and degeneration (ME)
Zamora et al. (1973), rats	astrocytic abnormalities and proliferation, lesions to capillary basal membrane and oligodendrocytes (ME)
Norenberg, Lapham (1974), rats	hyperplasia and hypertrophy of astrocytes, Alzheimer cells II
Laursen, Westergaard (1977), rats	increased permeability of blood vessels to HRP, astrocytic swelling (ME)
Kornfeld (1975), rats	abnormalities of dendrites, axon terminals and astrocytes (ME)
Mossakowski et al. (1977), rats	astrocytic hyperplasia, Alzheimer cells II
Diemer (1978), rats	lobulation and enlargement of astrocytic nuclei

Table 4. Brain pathomorphology in experimental disturbances of ammonia metabolism

Author, animals and noxious agent	Essential pathological changes in the brain
Cole et al. (1972), monkeys, ammonium acetate	astrocytic proliferation, Alzheimer cells II, glycogen deposition
Rizzuto, Gonatas (1974), rats, methionine sulfoximine	lesion to synaptic processes (after convulsions), swelling of glia
Gibson et al. (1974) mice, urease	astrocytic proliferation and hypertrophy, Alzheimer cells II, spongius vacuolization of neuropil (after convulsions)
Phelps (1975), mice, methionine sulfoximine	astrocytic accumulation of glycogen
Hooper (1975), sheeps, ammonium acetate	spongy degeneration
Diemer (1978), rats, urease	Alzheimer cells II

common. Like in humans it seems to be more inherent to cases with porto-caval shunting. Neuronal lesion in the sense of their loss and non-specific degeneration are the most fluctuating elements of the cerebral pathology.

Quantitative and qualitative differences in neuropathology of experimental hepatogenic encephalopathy may be due to numerous additional factors differing from one model to another. Some of them may act directly on the nerve tissue and thus modify the pathomorphology of the brain in each case. This may for instance explain differences in the extent and intensity of neuronal lesions between the groups where liver damage was due to low-protein diet and to carbon tetrachloride intoxication. The different brain tissue reaction to various pathogenic factors, having in common liver damage and/or bypassing portal-hepatic circulation, has also to be taken into consideration. This finds its support, among others, in the differences in metabolic abnormalities occurring in porto-caval shunting and in carbon tetrachloride intoxication in rats (Hilgier, 1980). The obvious species-related differences cannot be overlooked. It is well known that some animals are more, and some are less susceptible to the liver damage (Diemer, 1978). The time factor and severity of liver lesions are also of an utmost importance, as shown in the experiments with carbon tetrachloride intoxication (Mossakowski et al., 1970; Ostenda et al., 1976).

This short review of different experimental models of the hepatogenic encephalopathy showing the usefulness of each particular model for elucidating the pathogenic mechanisms underlying pathological process at the same time points out the necessity of simultaneous application of a variety of them; only such a complex approach offers the possibility to distinguish what is common, essential and primary from what is exception, incidental and secondary.

M. J. Mossakowski

DOŚWIADCZALNE MODELE ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ

Streszczenie

Omówiono stosowane typy modeli doświadczalnych encefalopatii wątrobowych wyodrębniając w oparciu o ich założenia patogenetyczne 3 grupy: a) doświadczalne uszkodzenie wątroby przy zastosowaniu różnorodnych substancji chemicznych; b) operacyjne wytworzenie pozawątrobowego przepływu krwi wrotnej; c) doświadczalnie wywołane upośledzenie metabolizmu amoniaku przy nieuszkodzonym mięszu wątrobowym i zachowanym krążeniu wrotnym. Przedstawiono zmiany patomorfologiczne w mózgu w dwóch stosowanych od szeregu lat modelach — toksycznym uszkodzeniu wątroby i wytworzonym zespoleniu wrotno-układowym. Zwrócono uwagę na podobieństwa i odrębności obserwowanych zmian neuropatologicznych w stosunku do patologii wątrobowo-mózgowej u ludzi i w innych typach doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. Zwrócono uwagę na rolę dodatkowych czynników modyfikujących obraz uszkodzeń strukturalnych ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnej encefalopatii

wątrobowej. Wykazano, że równoczesne stosowanie kilku modeli doświadczalnej encefalopatii wątrobowej umożliwia wyodrębnienie zmian pierwotnych i istotnych dla procesu patologicznego od zaburzeń wtórnych i przypadkowych.

М. Я. Моссаковский

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ

Резюме

Обсуждаются применяемые типы экспериментальных моделей печеночной энцефалопатии выделяя, основываясь на их патологические положения, 3 группы: а) экспериментальное повреждение печени при применении разнообразных химических веществ; б) операционное создание внепеченочного кровообращения воротной крови; в) экспериментально вызванное нарушение метаболизма аммиака при не поврежденной паренхиме печени и сохраненном воротном кровообращении. Представлены патоморфологические изменения в мозге в двух применяемых в течение ряда лет моделях — токсическом повреждении печени и образованном воротно-системном анастомозу. Обращается внимание на аналогию и отличие наблюдаемых нейропатологических изменений по отношению к печеночно-мозговой патологии у людей и в других типах экспериментальной печеночной энцефалопатии. Обращается внимание на роль добавочных факторов модифицирующих картину структурных повреждений центральной нервной системы в экспериментальной печеночной энцефалопатии. Показано, что одновременное применение нескольких моделей экспериментальной печеночной энцефалопатии делает возможным выделение первичных и существенных для патологического процесса изменений от вторичных и случайных нарушений.

REFERENCES

1. Balo J., Kapassy B.: The encephalitis of dogs with Eck's fistula fed on meat. *Arch. Path.*, 1932, 13, 80—87.
2. Benson R. W., May A. G., Norenberg M. D., Lapham L. W.: Protoplasmic astrocytosis of the brain in experimental hepatic coma. *Surg. For.* 1970, 21, 357—359.
3. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: Type II Alzheimer changes experimentally produced in astrocytes in the rat. *J. neurol. Sci.* 1971a, 12, 63—75.
4. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: On the mechanism of type I Alzheimer abnormality in the nuclei of astrocytes. *J. neurol. Sci.* 1971b, 12, 241—261.
5. Cole M., Rutheford R. B., Smith F. O.: Experimental ammonia encephalopathy in the primate. *Arch. Neurol.* 1972, 26, 130—136.
6. Diemer N. H.: Glial and neuronal changes in experimental hepatic encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.* 1978, suppl. 71, 58, 1—144.
7. Egan E., Schoelerman S., Szirmai E.: Action of peripheral organs and deproteinized blood on the brain cortex respiratory process. *Agressologie* 1978, 19, 109—112.
8. Fischer J. E.: Hepatic coma in cirrhosis, portal hypertension, and following portocaval shunt. *Arch. Surg.* 1974, 108, 325—336.
9. Geiger A.: Correlation of the brain metabolism and function by the use of a brain perfusion method in situ. *Physiol. Rev.* 1958, 38, 1—20.
10. Gibson G. E., Zimber A., Krook L., Richardson E. P., Visek W. J.: Brain histology and behaviour of mice injected with urease. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1974, 33, 201—211.

11. Hilgier W.: Zawartość glutaminy oraz aktywność aminotransferazy glutaminowej w mózgu o doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1981, 19, 67—73.
12. Hooper P. T.: Spongy degeneration in the central nervous system of domestic animals. Part III. Occurrence and pathogenesis of hepatocerebral disease caused by hyperammonaemia. *Acta Neuropath.* 1975, 31, 343—351.
13. Hooper P. T., Best S. M., Murray D. R.: Hyperammonaemia and spongy degeneration of the brain in sheep affected with hepatic necrosis. *Res. Vet. Sci.* 1974, 16, 216—222.
14. Kirschbaum W.: Einfluss schwerer Leberschädigungen auf das Zentralnervensystem. 2. Mitt. Gehirnbefunde nach tierexperimenteller Leberschäden. Leberschädigung nach Unterbindung der a. hepatica und Guaninvergiftung. *Z. Neurol.* 1924, 88, 50—83.
15. Kornfeld M.: Early changes in the striatum of rats after portocaval anastomosis; an ultrastructural and histofluorescence study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1975, 34, 78.
16. Lahl R.: Beitrag zum Problem der atypischen Astroglia („Leberglia“) bei Mensch und Tier. Vergleichende Untersuchungen am Hirn leberkranker Menschen und mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteter Bastärddkäninchen. *Wiss. Z. Univ. Halle* 1974, 5, 81—102.
17. Lapham L. W.: A study on protoplasmic astrocytes in experimentally produced hepatic encephalopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1961, 20, 305—309.
18. Laursen H., Westergaard E.: Enhanced permeability to horseradish peroxidase across cerebral vessels in the rat after portocaval anastomosis. *Neuropath. Appl. Neurobiol.* 1977, 3, 29—43.
19. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.* 1966, 4, 231—304.
20. Mossakowski M. J., Śmialek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1970, 8, 365—374.
21. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Kassur B., Olejnik Z.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego w ostrych uszkodzeniach wątroby. *Neuropat. Pol.* 1974, 12, 51—62.
22. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Różga J., Paluszkiwicz R.: Wpływ α -oksooglutaranu na rozwój gliopatii wątrobowej u szczurów z zespoleniem wrotno-układowym. *Neuropat. Pol.* 1977, 15, 317—325.
23. Mossakowski M. J., Ostenda M., Pronaszko-Kurczyńska A.: Obraz mikroskopowo-elektrowny naczyń włosowatych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.* 1978, 16, 327—337.
24. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: An electron microscopic study. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1974, 33, 422—435.
25. Norenberg M. D., Lapham L. W., Benson R. W., May A. G.: Ultrastructural observation in protoplasmic astrocytes in experimental acute hepatic coma. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1972, 31, 184—185.
26. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.* 1976, 14, 347—354.
27. Phelps C. H.: An ultrastructural study of methionine sulphoximide induced glycogen accumulation in astrocytes of the mouse cerebral cortex. *J. Neurocyt.* 1975, 4, 479—490.
28. Rizzutto N., Gonatas N. K.: Ultrastructural study of the effect of methionine sulfoximine on developing and adult rat cerebral cortex. *J. Neuropath. exp. Neurol.* 1974, 33, 237—250.

29. Taraszewska A., Lewicka-Wysocka H., Nozdryn-Plotnicki B.: Analiza neuropatologiczna zmian u psów starych z nowotworami narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.* 1971, 9, 217—230.
30. Zamora A. J. Cavanagh J. B., Kyu M. H.: Ultrastructural responses of the astrocytes to portocaval anastomosis in the rat. *J. Neurol. Sci.* 1973, 18, 25—45.

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

TADEUSZ MAJDECKI

ZANIK WARSTWY ZIARNISTEJ MÓZDŻKU W PRZYPADKU OSTREJ
MAŁOPLYTKOWEJ SKAZY KRWOTOCZNEJ

Pracownia Neuropatologii Centralnego Szpitala Kolejowego, Międzylesie k/Warszawy.

Kierownik Pracowni: dr hab. med. T. Majdecki

Obok pierwotnie zwyrodnieniowych postaci zaniku mózdzku wyróżnia się postaci objawowe w przebiegu różnorodnych zewnątrz- i wewnątrz-pochodnych procesów chorobowych (Mumenthaler 1972). Objawowe postaci zaniku mózdzku opisano w przypadkach przewlekłego alkoholizmu (Strock 1967), po stosowaniu niektórych leków m. in. nitrazepamu, glutethimidu, dilantyny (Valsemis, Mancall 1973), w chorobie Hodgghina (Tsapatsaris i wsp. 1979) i w złośliwych nowotworach (Brain i wsp. 1951; Barraquer, Löventhal 1953; Sarbach 1977). Patomorfologicznym wyrazem tych zmian może być zanik komórek Purkinjego i znacznie rzadziej występujący zanik warstwy ziarnistej mózdzku (Osetowska 1963). Przedstawienie poniższego przypadku uzasadnia fakt, że w dostępnym piśmiennictwie nie spotkano opisu zaniku warstwy ziarnistej mózdzku w przebiegu ostrej skazy krwotocznej.

OPIS PRZYPADKU

Chory Z.B., lat 56, palacz kotłów. Przed dwoma laty operowany z powodu powikłanego złamania kończyny dolnej. Wykonane w tym czasie badania krwi nie ujawniły istotnych odchyłeń od normy. Poza tym poważnie nie chorował. W służbowym badaniu okresowym, przed około 3 miesiącami, ustalono silnie dodatni odczyn VDRL. Pacjent skierowany został do przychodni dermatologicznej, gdzie wobec prawidłowego wyniku badania serologicznego krwi i braku objawów klinicznych uznano niecelowość leczenia kily. W dniu poprzedzającym hospitalizację u chorego wystąpiło nagle krwawienie z błon śluzowych jamy ustnej. W nocy pojawiły się wybroczyny do skóry kończyn dolnych i silne bóle głowy. Nad ranem pacjent zaczął krwawić z przewodu pokarmowego i stracił przytomność. W chwili przyjęcia do szpitala był nieprzytomny, w bardzo ciężkim stanie, miał liczne wybroczyny do

skóry kończyn. Ciśnienie tętnicze krwi 140/70 mm Hg. Prawa źrenica większa od lewej, obydwie szerokie, nie reagujące na światło. W kończynach obniżenie napięcia mięśniowego, żywe odruchy okostnowe i ścięgnowe, obustronnie dodatni objaw Babińskiego, Oppenheima i Chaddocka. U chorego zastosowano kontrolowany oddech aparaturowy. Objawy skazy krwotocznej nasilały się; zgon nastąpił w drugim dniu po przyjęciu do szpitala.

Badania laboratoryjne. Czas protrombinowy 15 min., czas krwawienia 1 min., czas krzepnięcia 7 min. 40 sek. Płytki krwi 27 g/l. W badaniu morfologicznym krwi cechy niedokrwistości. Odczyn VDRL (++++).

Rozpoznanie kliniczne: *Haemorrhagia cereбрalis. Thrombocytopenia. Leukæmia suspecta.*

Wynik wykonanej w 20 godz. po zgonie sekcji ogólnej (Dr med. J. Zaremba): *Haemorrhagia subduralis præcipue basis cerebri. Diathesis hæmorrhagica. Thromboendocarditis ulcerosa valvulæ semilunaris aortæ. Hypertrophia excentrica ventriculi sinistri cordis. Cicatrices parvæ disseminatæ myocardii. Hyperæmia passiva omnium organorum.*

BADANIE NEUROPATHOLOGICZNE

W badaniu makroskopowym stwierdzono krwotok przebijający się od strony podstawnej prawego płata potylicznego do przestrzeni podpajęczynówkowej. Nad prawą półkulą mózdzku i mostem wynaczyniona krew do przestrzeni podpajęczynówkowej. Na przekrojach czołowych przez mózg, w prawym płacie potylicznym krwotok średnicy około 1,5 cm z licznymi wokół, punkcikowatymi krwotoczkami, obejmującymi częściowo korę i istotę białą. Podobne drobne wynaczynienia krwi w śródmózgowiu i w górnej części mostu. Cechy obrzęku mózgu.

Rozpoznanie makroskopowe: *Focus hæmorrhagicus lobi occipitalis dextri in spatio subarachnoideale penetrans. Diathesis hæmorrhagica mesencephali, pontis et lobi occipitalis dextri. Oedema cerebri. Arteriosclerosis mediocris gradus.*

Do badania mikroskopowego pobrano wycinki z półkul mózgu, pnia i mózdzku. Technika parafinowa, barwienia: hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu, metodą van Gieson i Heidenhaina.

W badaniu mikroskopowym stwierdzono krwotok z licznymi, drobnymi okolonaczyniowymi krwotoczkami na obwodzie. Podobne drobne krwotoczki w śródmózgowiu i częściowo w moście. Krew w przestrzeniach podpajęczynówkowych. Naczynia krwionośne niekiedy ze zwłókniastymi i sporadycznie zeszkliwiałymi ścianami. Wokół naczyń poszerzenie przestrzeni adwentycjalnych, czasem gąbczasto zmieniona tkanka. W półkulach i robaku mózdzku prawie całkowity zanik warstwy ziarnistej kory (ryc. 1). Sporadycznie oszczędzone były jedynie najbardziej powierzchowne pokłady komórek ziarnistych

placików mózdzku (ryc. 2). Miejscami, wśród komórek Purkinjego, występowały pojedyncze, dobrze zachowane komórki ziarniste (ryc. 3). Zanik komórek ziarnistych połączony był z gąbczastą martwicą podłoża z zachowaniem pojedynczych, obkurczonych, nie dających się zidentyfikować elementów komórkowych (ryc. 4). Brak odczynu glejowego czy mezodermalnego. Komórki Purkinjego nieco przerzedzone, czasem objęte tigrolizą, obrzmiałe lub rzadziej obkurczone (ryc. 3). Istota biała placików nie zmieniona. Rysunek jąder mózdzku prawidłowy. Opuszka bez zmian. Nie stwierdzono przynaczeniowo an w oponach nacieków zapalnych.

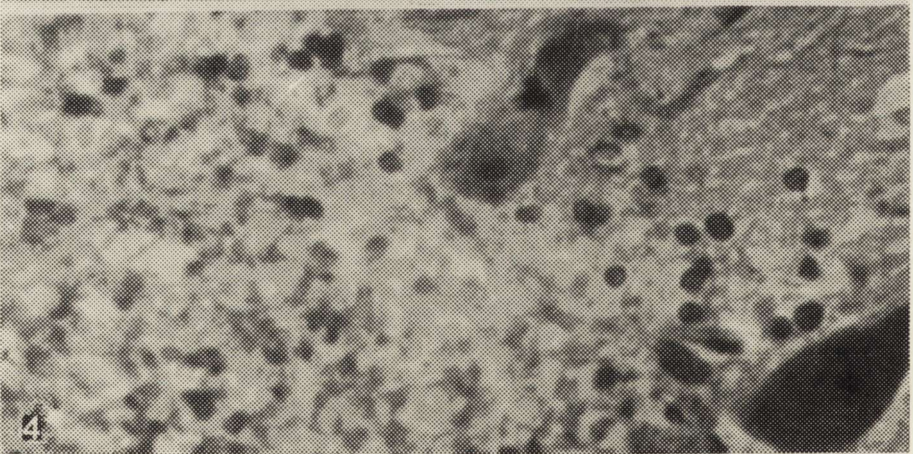
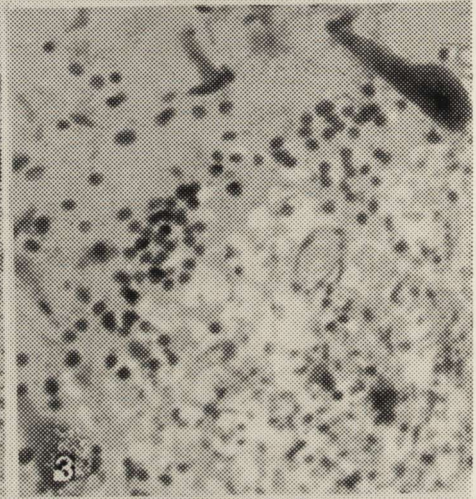
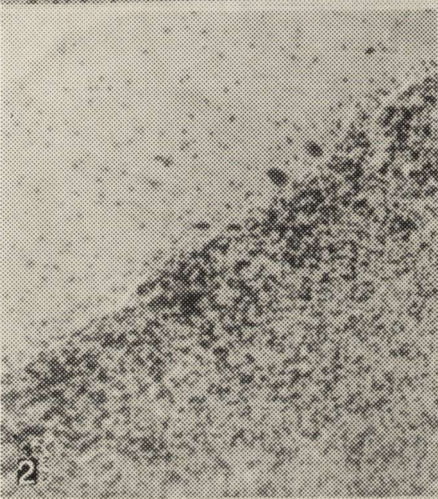
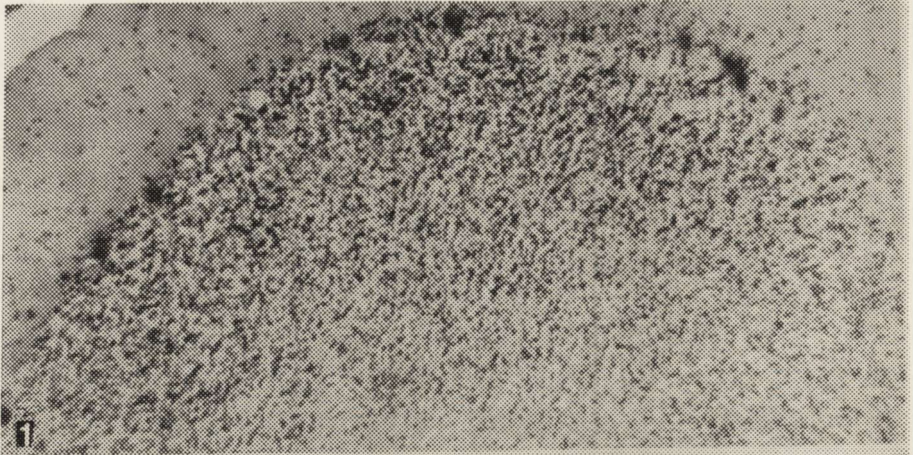
Rozpoznanie mikroskopowe *Haemorrhagia subarachnoidealis. Haemorrhagia et diathesis haemorrhagica. Atrophia granularis cerebelli.*

OMÓWIENIE

Bezpośrednią przyczyną zgonu w omawianym przypadku były wylewy krwi do opon mózgowych i do mózgu w przebiegu małopłytkowej skazy krwotocznej. Fakt, że choroba wystąpiła nagle, bez uprzednich objawów skazy, że pacjent przed jej wystąpieniem nie chorował na żadne choroby i nie przyjmował leków, przemawiać może za ostrą postacią samoistnej małopłytkowości. Z chorobą tą najprawdopodobniej ma związek dodatni odczyn VDRL — nie istnieją bowiem ani kliniczne, ani patomorfologiczne podstawy aby uznać za jego tło infekcję kilową.

Poza naczyniowopochodnymi zmianami w półkulach i pniu mózgu, w mózdzku stwierdzono niemal uogólniony, równomierny zanik warstwy ziarnistej na podłożu rozplywającej się obrzękowo tkanki, brak reakcji tkanki na ostry obrzęk i stosunkowo małe uszkodzenie komórek Purkinjego.

Różnie nasilony zanik warstwy ziarnistej występuje w wielu przypadkach objawowych postaci zaniku mózdzku. Istnieją jednak przypadki, w których obserwuje się niemal wybiórczy zanik warstwy ziarnistej, o nieznannej patogenie. Uszkodzenie takie, przy pewnym objęciu i innych elementów strukturalnych mózdzku, występować może m. in. w zatruciu rtęcią (Valsamis, Mancall 1973). Najczęściej jednak wybiórczy zanik warstwy ziarnistej mózdzku opisywano wśród przypadków tzw. „rakopochodnego zwyrodnienia mózdzku” (*cerebellopathia carcinogenes*) (Barraquer, Löventhal 1953; Osetowska 1963), mogącego wchodzić w skład zespołu paraneoplazmatycznego (*paraneoplastic syndrome*) (Sarbach 1977). Kliniczny przebieg większości przypadków jest podostry, a w części z nich występuje, poza zanikiem warstwy ziarnistej, glejoza włóknista istoty białej mózdzku, przemawiająca za przyżyciowym powstawaniem zmian (Osetowska 1963). Zanik warstwy ziarnistej mózdzku opisali poza tym Leigh i Meyer (1949) oraz Ule (1952) w przypadkach śpiączki hipoglikemicznej. Podstawową wspólną cechą przypadków wspomnianych powyżej i opisanego w niniejszej pracy jest zanik warstwy



ziarnistej mózdzku. Charakteryzuje go całkowity brak reakcji tkanki na zniszczenie warstwy ziarnistej, co może się wiązać z bardzo ostrym przebiegiem choroby. Na patomorfologiczne odmienności omawianych przypadków może zatem mieć pewien wpływ szybkość podstawowego procesu chorobowego, niezależnie od jego charakteru.

Omawianej formy zaniku mózdzku nie można uznać za etiologicznie odrębną jednostkę chorobową, można ją natomiast rozpatrywać jako pewne stadium określonego rodzaju reakcji mózdzku, która może być wywołana przez różne czynniki. Uwzględnienia wymagają wśród nich czynniki metaboliczne, autoimmunologiczne, toksykologiczne, niedoborowe i zakaźne. Wybiórczy zanik warstwy ziarnistej mózdzku jest prawdopodobnie wynikiem osobniczo niejednorodnego sposobu reagowania podłoża mózdzku. Za istnieniem tego typu regionalnych odmienności reagowania mózdzku na różne czynniki przemawiać mogą chociażby wyniki doświadczalnych badań nad działaniem promieni X (Scholz 1934) i promieni gamma (Vogel 1959) na mózg, które głównie wywołują uszkodzenie warstwy ziarnistej mózdzku.

Т. Майдецки

АТРОФИЯ ЗЕРНИСТОГО СЛОЯ МОЗЖЕЧКА
В СЛУЧАЕ ОСТРОГО ТРОМБОПЕНИЧЕСКОГО ДИАТЕЗА

Резюме

Описывается случай мужчины 56 лет с атрофией зернистого слоя мозжечка в процессе острого тромбопенического диатеза.

На основании собственных наблюдений и данных из литературы заключается, что обсуждаемой формы атрофии мозжечка нельзя узнать за этиологически отдельную единицу заболевания, а только за стадию определенного способа реагирования мозжечка на разнообразные факторы, внутреннего или наружного происхождения.

Ryc. 1. Prawie całkowity zanik warstwy ziarnistej mózdzku. H-E. Pow. 60×.

Fig. 1. Almost complete atrophy of cerebellar granular layer. H-E. ×60.

Ryc. 2. Sporadycznie spotykane oszczędzenie najbardziej powierzchniowych warstw płacików mózdzku, poza tym prawie całkowity zanik warstwy ziarnistej. H-E. Pow. 60×.

Fig. 2. Sporadically observed sparing of the most superficial layers of the cerebellar lobuli, almost complete atrophy of the granular layer. H-E. ×60.

Ryc. 3. Pojedyncze komórki ziarniste rozrzucone między komórkami Purkiniego. H-E. Pow. 200×.

Fig. 3. Occasional granular cells dispersed among Purkinje cells. H-E. ×200.

Ryc. 4. Martwica gąbczasta warstwy ziarnistej mózdzku. Komórki Purkiniego objęte tigrólizą Fiolet krezyłu. Pow. 400×.

Fig. 4. Spongy necrosis of cerebellar granular layer. Tigrolysis of Purkinje cells. Cresyl violet. ×400.

T. Majdecki

ATROPHY OF THE CEREBELLAR GRANULAR LAYER IN THE CASE OF ACUTE
THROMBOPENIC HEMORRHAGIC DIATHESIS

S u m m a r y

Atrophy of the cerebellar granular layer in a case of 56 year-old man suffering of acute thrombopenic hemorrhagic diathesis is described. Presented observations and the data from literature indicate that this type of cerebellar atrophy can not be considered as an etiologically defined entity but only as a stage of a certain type of cerebellar reaction to different endo- and exogenic factors.

PIŚMIENNICTWO

1. Barraquer-Bordas L., Löventhal A.: Le syndrome cérébelleux préterminale des carcinomes. *Mshr. Psychiat. Neurol.* 1953, 125, 239—260.
2. Brain W. i wsp.: Subacute cortical cerebellar degeneration and its relation to carcinoma. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1951, 14, 59—75.
3. Leigh A., Meyer A.: Degeneration of the granular layer of the cerebellum. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 1949, 12, 287—296.
4. Mumenthaler M.: *Neurologia*. FZWL, Warszawa 1972.
5. Osetowska E.: Zaniki kory mózdzku w przebiegu raka narządów wewnętrznych. *Neuropat. Pol.* 1963, 1, 91—100.
6. Sarbach B.: L'atteinte paranéoplastique du cervelet. *Acta Neurol. Belg.* 1977, 77, 363—372.
7. Scholz W.: Die morphologische Veränderungen des Hirngewebes unter dem Einfluss von Röntgen- und Radiumstrahlen. *Electroradiobiologica.* 1934, 2, 1051—1062.
8. Stroek J.: Kleinhirnwurmatrophie und chronischer Alkoholismus. *Schweiz. Arch. Neurol. Neuroch. Psych.* 1967, 99, 40—82.
9. Tsapatsaris N., i wsp.: Cerebellar degeneration and Hodgkin's disease. *Arch. Intern. Med.* 1979, 139, 829—830.
10. Ule G.: Kleinhirnrindenatrophie von Körnertyp. *Dtsch. Ztschr. Nervenheilk.* 1952, 168, 195—226.
11. Valsalmis M., Mancall E.: Toxic cerebellar degeneration. *Hum. Pathology.* 1973, 4, 513—520.
12. Vogel S.: Changes in the fine structure to cerebellar neurons following ionizing radiation. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 1959, 18, 580—589.

Adres autora: Pracownia Neuropatologii Centralnego Szpitala Kolejowego, Międzyzlesie k/Warszawy.

URSZULA RAFAŁOWSKA

METABOLIZM CYTRYNIANU W MÓZGU SZCZURA W WARUNKACH PRAWIDŁOWYCH I W NIEDOTLENIENIU*)

Streszczenie pracy habilitacyjnej

Zespół Neurochemii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

Z badań przeprowadzonych głównie na wątrobie i drobnoustrojach wiadomo, że cytrynian zajmuje centralną pozycję w ogólnym metabolizmie komórki. Przemiany tego związku łączą się z wytwarzaniem energii w mitochondriach i z dostarczaniem substratów do cytoplazmatycznych syntez kwasów tłuszczowych i acetylocholin. Pośredniczy on w powiązaniu przemian białek, cukrów i tłuszczów oraz spełnia rolę regulatora szeregu reakcji (Rafałowska 1976).

Dotychczasowe badania dotyczące metabolizmu cytrynianu w mózgu ograniczały się głównie do obserwacji nad liazą cytrynianową i jej rolą w syntezie acetylocholin (Tućek 1978; Szutowicz i wsp. 1978).

Brak danych z zakresu cytoplazmatycznego utleniania cytrynianu w mózgu z udziałem izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej (IDH NADP) oraz transportu tego związku przez błonę mitochondriów perikarialnych, synaptosomów i mitochondriów synaptosomalnych był przyczyną podjęcia badań mających na celu wyjaśnienie tych zagadnień. Z drugiej strony wiadomo, że niedotlenienie ośrodkowego układu nerwowego (OUN) wywołuje wiele zaburzeń metabolicznych (Siesjö 1978). Mimo, że ostatnio ilość badań poświęconych metabolicznym skutkom niedoboru tlenowego w OUN znacznie wzrasta, jednakże dotychczas brak było jakichkolwiek danych na temat wpływu niedotlenienia na przemiany tak podstawowego w ogólnym metabolizmie związku jak cytrynian. Dlatego też informacje uzyskane z doświadczeń prowadzonych w niniejszej pracy w warunkach normalnych posłużyły za bazę do dalszych badań, mających na celu ocenę wpływu niedotlenienia na metabolizm cytrynianu w mózgu i związane z nim reakcje.

*) Praca została wykonana w Zespole Neurochemii CMDiK PAN, Warszawa, oraz w Zakładzie Biochemii i Biofizyki Uniwersytetu Pennsylvania w Filadelfii, USA.

MATERIAŁ I METODY

Warunki doświadczeń

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, samcach, o ciężarze ciała 180—200 g. Stosowano niedotlenienie hipoksyjne, które wywoływano przetrzymując zwierzęta w komorze doświadczalnej ze stałym przepływem mieszanki gazowej zawierającej 7% tlenu i 93% azotu. Anestezję wywoływano podając zwierzętom nembutal w dawce 40 mg/kg wagi ciała. Niedotlenienie w anestezji uzyskiwano stosując jednocześnie podanie nembutalu i niedotlenienie hipoksyjne.

Otrzymywanie frakcji subkomórkowych

Jednoczesne otrzymywanie z tkanki szeregu frakcji subkomórkowych uzyskiwano stosując metodę różnicowego wirowania wg Whittakera i wsp. (1972). Frakcję cytoplazmatyczną otrzymywano w wyniku homogenizacji półkul mózgu w 0,125 M KCl oraz wirowania (30 min, 25 tys. \times g). Cytosol uzyskiwano poprzez odwirowanie frakcji cytoplazmatycznej (1 godz., 105 tys. \times g). Frakcję mitochondrialną otrzymywano metodą Clarka i Niclasa (1970). Frakcję synaptosomalną uzyskiwano w oparciu o flotacyjną metodę Bootha i Clarka (1978) w modyfikacji własnej (Rafałowska i wsp. 1980a) lub o metodę sedymentacyjną Lai i Clarka (1976). Frakcję mitochondriów synaptosomalnych wydzielano z synaptosomów zgodnie z metodą Lai i wsp. (1977).

Białko oznaczano metodą Lowry i wsp. (1951).

Oczyszczenie i oznaczenie ciężaru cząsteczkowego izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej z cytosolu mózgu

Enzym oczyszczano przez zastosowanie chromatografii kolumnowej używając kolejno DE 32 celulozę, CM celulozę, DEAE Sephadex oraz stosując elektroforezę na żelu poliakrylamidowym. Ciężar cząsteczkowy oznaczano elektroforetycznie w siarce dodecyłu zgodnie z metodą Webera i Osborna (1969).

Oznaczanie aktywności enzymów

Aktywność IDH NADP oznaczano wg Ochoy (1955), syntazy cytrynianowej wg Shepharda i Garlanda (1969), a ATP zależnej liazy cytrynianowej zgodnie z metodą Szutowicza i wsp. (1974). Aktywność akonitazy mierzono w mieszaninie stosowanej do oznaczania aktywności IDH NADP, stosując izocytrynian jako substrat i mierząc wzrost cytrynianu. Aktywność aminotrans-

ferazy asparaginowej oznaczano metodą Bergmayera i Berntta (1963), fumarazy metodą Rackera (1950) i dehydrogenazy mleczanowej zgodnie z metodą Johnsona (1960).

Oznaczanie stężeń substratów i metabolitów

Cytrynian, α -ketoglutaran, glutaminian, asparaginian, mocznik, karbamyloasparaginian, hydroksymaślan, octan, mleczan, pirogronian ATP, ADP, AMP, fosfokreatynę, kreatynę i fosforan nieorganiczny oznaczano, posługując się dostępnymi w literaturze i powszechnie stosowanymi metodami spektrofotometrycznymi i kolorymetrycznymi. Jablczan oznaczano spektrofluorymetryczną metodą Williamsona i Corkey (1969).

Izotopowe pomiary stężenia cytrynianu i jablczanu

Po inkubacji badanej subfrakcji komórkowej z ^{14}C cytrynianem i ^{14}C jablczanem (0.1 μCi w próbie) i dwukrotnym przemyciu, subfrakcję rozpuszczano w NCS, mieszano ze scyntylatorem (spektrofluor + toluen) i mierzono radioaktywność w liczniku scyntylicyjnym.

Stężenie i stan redukcji cytochromu c oznaczano w spektrofotometrze dwuwiązkowym Johnson Foundation, mierząc poziom zredukowanego cytochromu c przy 550—540 nm w sposób opisany uprzednio (Rafałowska i wsp. 1980a).

Potencjał błonowy synaptosomów i przestrzeń wewnątrzsynaptosomalną oznaczano zgodnie z metodą opisaną w pracy Deutsch i Rafałowskiej (1979).

WYNIKI I DYSKUSJA

1. Metabolizm cytrynianu w mózgu w warunkach normalnych

1.1. Wewnątrzkomórkowa lokalizacja enzymów metabolizujących cytrynian i utlenianie tego związku w cytosolu z udziałem izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej

Ocena aktywności i rozmieszczenia enzymów biorących udział w utlenianiu cytrynianu w jednocześnie otrzymanych subfrakcjach komórkowych pozwala sądzić, że w mózgu istnieją dwie odrębne drogi pozamitochondrialnego utleniania cytrynianu (Rafałowska, Książak 1976). Jedna opisana wcześniej przez wielu autorów, zależna od ATP cytrynianowej liazy i druga, nie scharakteryzowana dotychczas, związana z aktywnością izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej. Utlenianie cytrynianu przy udziale cytoplazmatycznej IDH NADP związane jest z aktywnością akonitazy i transaminazy asparagi-

nianowej. Wykazano, że akonitaza przekształca cytrynian do izocytrynianu, a następnie izocytrynianowa dehydrogenaza NADP zależna przekształca go do α -ketoglutaranu, CO_2 i NADPH. α -ketoglutaran jest zużywany w reakcji transaminacji do szczawiooctanu, a donorem grup aminowych jest endogeny asparaginian. Wydaje się, że omawiane tu dwie drogi metaboliczne mogą uzupełniać się nawzajem i podlegać wzajemnej regulacji przez nukleotydy adeninowe i pirydynowe co może mieć duże znaczenie w stanach patologicznych OUN.

1.2. Oczyszczanie, oznaczanie ciężaru cząsteczkowego i charakterystyka izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej w cytosolu mózgu

Wykazano, że IDH NADP z mózgu składa się z dwu izoenzymów: mitochondrialnego i cytoplazmatycznego, różniących się ruchliwością elektroforetyczną. Cytoplazmatyczną IDH NADP oczyszczano stosując chromatografię kolumnową i elektroforezę na żelu poliakrylamidowym. 36-krotny wzrost aktywności specyficznej enzymu po jego oczyszczeniu, jest zbliżony lub wyższy od danych uzyskanych przez innych autorów, w wyniku oczyszczania IDH NADP z *E. coli*, *Halobacterium salinarium* i *Thiobacillus novellus* i niższy od wartości uzyskanych dla IDH NADP izolowanej z serca i wątroby.

Ciężar cząsteczkowy czystego preparatu IDH NADP w niskich stężeniach soli wynosi 80.000, a w stężeniach „fizjologicznych” 165.000. Wydaje się, że w mózgu, podobnie jak w wątrobie i drobnoustrojach, IDH NADP występuje w postaci dimeru, składającego się z dwu podjednostek o ciężarze cząsteczkowym 80.000. Aktywność mózgowej IDH NADP regulowana jest przez nukleotydy adenilowe i pirydynowe, które działają kompetycyjnie w stosunku do izocytrynianu. Wykazano katalityczną rolę grup —SH w aktywności mózgowej IDH NADP oraz stwierdzono, że enzym ten różni się od IDH NADP wątrobowej optimum pH.

1.3. Transport cytrynianu przez błonę mitochondriów perikarialnych

Mitochondria izolowane z mózgu, zawierające jedynie niewielką ilość zanieczyszczeń i zachowujące funkcję utleniania egzogenego cytrynianu mają zdolność szybkiej akumulacji cytrynianu i jabłczanu. Wykazano, że jabłczan może przechodzić przez błonę mitochondrialną w wyniku wymiany zarówno z fosforanem nieorganicznym (Pi) jak i z cytrynianem. Fakt, że transport jabłczanu w wymianie z Pi jest hamowany przez butylomalonian, który nie wpływa na wymianę jabłczan/cytrynian, sugeruje obecność dwóch niezależnych przenośników specyficznych dla kwasów dwu- i trójkarboksy-

lowych, podobnie jak w mitochondriach wątroby (Rafałowska 1978). Wymiana zewnątrzmitochondrialnego cytrynianu z wewnątrzmitochondrialnym jableczanem zachodzi w stosunku 1 : 1. Akumulacja (wejście) cytrynianu do mitochondriów mózgu zachodzi 5-krotnie szybciej niż w mitochondriach wątroby. Akumulacja obydwu badanych pośredników cyklu Krebsa jest funkcją egzogennych stężeń tych związków. System transportujący jest wysycony przez cytrynian przy wartości stałej Michaelisa $K_m = 4.55$ mM. Wartość ta jest zbliżona do podawanej przez Patela (1975) dla utleniania dodanego cytrynianu w mitochondriach mózgu ale jest znacznie wyższa od odpowiedniej wartości K_m dla mitochondriów wątroby.

1.4. Charakterystyka synaptosomów i transport cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych

Dotychczasowe metody stosowane do otrzymywania synaptosomów nie pozwalały na otrzymywanie czystej i jednocześnie niezmienionej, w stosunku do warunków *in vivo*, frakcji synaptosomalnej. Zastosowanie metody Bootha i Clarka (1978) zmodyfikowanej w niniejszej pracy, pozwoliło na uzyskanie wyjątkowo czystej frakcji. Z obrazów w mikroskopie elektronowym wyliczono statystycznie, że ponad 75% wszystkich widocznych struktur stanowią nienaruszone synaptosomy. Jest to najwyższy ze znanych dotychczas w literaturze stopień czystości frakcji synaptosomalnej. Zastosowanie anestezji pentobarbitalowej przed dekapitacją zwierząt pozwoliło na utrzymanie stanu energetycznego synaptosomów na poziomie *in vivo*. Wolna energia dla przeniesienia 2 elektronów z NAD na cytochrom c i syntezy 2 moli ATP wyliczona z danych eksperymentalnych w synaptosomach z mózgu anestetyzowanych szczurów, jest bliska równowagi ($\Delta G = -0.26$), podobnie jak w komórkowych, zachowujących pełną integralność metaboliczną (Rafałowska 1979b; Rafałowska i wsp. 1980a). Potencjał błonowy takich synaptosomów jest wysoki (wynosi -86.8 ± 7.8 mV) i ulega zmniejszeniu o około -10 mV w czasie depolaryzacji błony w obecności jonów K^+ . Otrzymane synaptosomy mają zdolność pobierania egzogenego cytrynianu. Ilość pobranego z mieszaniny inkubacyjnej ^{14}C cytrynianu jest zależna od obecności jableczanu podobnie jak w mitochondriach perikarialnych.

Wykazano, że transport ^{14}C cytrynianu przez błony mitochondriów synaptosomalnych zachodzi szybciej niż przez błonę synaptosomalną, która *in vivo* może być czynnikiem limitującym transport tego związku z cytoplazmy synaptosomalnej do mitochondriów synaptosomalnych (Rafałowska, Księżak 1979). Transport cytrynianu przez błonę izolowanych mitochondriów synaptosomalnych mimo czterokrotnie szybszego czasu maksymalnej akumulacji tego związku jest znacznie niższy niż w mitochondriach perikarialnych.

2. Zaburzenia metabolizmu cytrynianu w mózgu w warunkach niedotlenienia hipoksyjnego

2. 1. Utlenianie cytrynianu na drodze zależnej od cytoplazmatycznej IDH NADP w warunkach niedoboru tlenowego

Niedotlenienie hipoksyjne zmniejsza utlenianie cytrynianu w cytoplazmatycznym ciągu reakcji zależnej od IDH NADP o ok. 30%. Wykazano, że za obniżenie tego utleniania odpowiedzialny jest endogeny asparaginian, którego poziom spada w hipoksji o ok. 60% (Rafałowska i wsp. 1975). Spadek poziomu asparaginianu w niedotlenieniu spowodowany jest zwiększonym zużyciem tego związku w cyklu mocznikowym i jego przechodzeniem do krwioobiegu.

Zastosowanie anestezji jednocześnie z niedotlenieniem pozwala na utrzymanie stężenia asparaginianu, a w konsekwencji i utleniania cytrynianu w badanym ciągu reakcji na poziomie warunków normalnych.

2.2. Wpływ niedotlenienia na aktywność enzymów metabolizujących cytrynian

Niedotlenienie hipoksyjne nie wpływa na zmianę aktywności akonitazy, transaminazy asparaginianowej i izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej i jak wykazano nie wpływa na zmianę ciężaru cząsteczkowego IDH NADP (Rafałowska 1979c; Rafałowska, Pastuszko 1979). Wydaje się jednak, że w czasie niedotlenienia część mitochondrialnej IDH NADP przechodzi do cytosolu. Wiąże się to prawdopodobnie ze zmianami strukturalnymi w błonie mitochondrialnej wywołanymi nagromadzającymi się w czasie niedotlenienia wolnymi kwasami tłuszczowymi.

2.3. Zaburzenia w transporcie cytrynianu i jableczanu przez błonę mitochondriów perikaryalnych mózgu w warunkach niedotlenienia

Drastyczne obniżenie w warunkach niedotlenienia transportu cytrynianu i jableczanu do mitochondriów aż o ok. 60% wskazuje na powstanie ostrych zaburzeń na tym etapie metabolizmu cytrynianu. Wykazano, że przyczyną zahamowania może być obniżenie w warunkach niedotlenienia poziomu dostępnych grup — SH przenośnika wymiany jableczan/Pi. W konsekwencji zmniejszenie transportu cytrynianu może wynikać z niedoboru wewnątrz-mitochondrialnego jableczanu niezbędnego do wymiany cytrynian/jableczan (Rafałowska 1979a). Wykazano, że w zmniejszeniu transportu mogą odgrywać pewną rolę zmiany stężeń szeregu metabolitów wywołane warunkami patologicznymi. Metabolity te mogą prawdopodobnie działać kompetycyjnie w stosunku do cytrynianu podobnie jak obserwowano to w mitochondriach

wątroby. Pentobarbitalowa anestezja nie wywiera „ochronnego” wpływu na zmiany w transporcie wywołane niedotlenieniem. Powrót do normy (recovery) zachodzi bardzo wolno — w czasie kilku dni.

2.4. Wpływ niedotlenienia na własności synaptosomów i transport cytrynianu do synaptosomów i izolowanych mitochondriów synaptosomalnych.

W stosowanym modelu niedotlenienia nie obserwowano zmian w parametrach energetycznych synaptosomów. Oddychanie synaptosomów obniżone w obecności różnych substratów oddechowych w czasie 30-minutowego niedotlenienia szybko powracało do normy. Również przedłużenie okresu niedotlenienia zwierząt do 60 min. powodowało spontaniczny wzrost oddychania do wartości równej normie. Zwierzęta nakarmione w ogóle nie wykazywały zmian w oddychaniu w stosowanych warunkach niedotlenienia (Rafałowska i wsp. 1980b). Transport cytrynianu do synaptosomów otrzymanych z mózgu zwierząt poddanych niedotlenieniu i do izolowanych z nich mitochondriów, jest zmniejszony o około 20% w stosunku do warunków normalnych, tzn. o 40% mniej niż w przypadku mitochondriów perikarialnych.

WNIOSKI

1. Równoległe z rozkładem cytrynianu w obecności ATP cytrynianowej liazy związek ten jest utleniany w cytoplazmie mózgu w wyniku sekwencji przemian, których kluczowym enzymem jest izocytrynianowa dehydrogenaza NADP zależna.

2. Podstawowy mechanizm transportu cytrynianu przez błonę mitochondriów mózgu jest podobny do mechanizmu transportu tego związku w mitochondriach wątroby. Specyficzne dla mózgu cechy tego transportu wiążą się głównie z różnicami w jego kinetyce.

3. Otrzymana frakcja synaptosomalna, odznaczająca się wyjątkowo wysoką homogennością, posiadająca bliską równowagi wartość wolnej energii między reakcjami utleniania i redukcji łańcucha oddechowego i stanu fosforylacji nukleotydów adeninowych jest prawidłowym i wygodnym modelem do badań metabolizmu zakończeń nerwowych.

4. Transport cytrynianu do mitochondriów synaptosomalnych zachodzi w wyniku wymiany z jableczanem tak jak w mitochondriach perikarialnych, jednak maksymalna akumulacja tego związku w mitochondriach synaptosomalnych jest niższa. Błona synaptosomalna jest czynnikiem limitującym transport cytrynianu do mitochondriów synaptycznych *in situ*.

5. Zmiany w metabolizmie cytrynianu w mózgu, wywołane niedotlenieniem hipoksyjnym różnią się wielkością i natężeniem, w zależności od poszczególnych typów reakcji i układów metabolicznych.

6. Niedotlenienie hipoksyjne nie zmienia aktywności i ciężaru cząsteczkowego izocytrynianowej dehydrogenazy NADP zależnej powodując jedynie częściowe przemieszczenie mitochondrialnej IDH NADP do cytosolu w wyniku prawdopodobnie zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej w tych warunkach.

7. Zmniejszenie utleniania cytrynianu przy udziale IDH NADP w cytosolu mózgu w niedotlenieniu, wynikające z obniżenia stężenia endogennego asparagianu, szybko powracające do normy i wrażliwe na „ochronny” wpływ anestezji pentobarbitalowej jest przykładem zmian łagodnych, wynikających ze zmian w poziomach substratów i metabolitów regulujących metabolizm.

8. Drastyczne zaburzenia obserwowane w transporcie cytrynianu i jabłczanu do mitochondriów w czasie niedotlenienia, związane z rolą grup — SH przenośników, niewrażliwe na „ochronny” wpływ anestezji, powracające do normy dopiero po kilku dniach, wiążą się prawdopodobnie ze zmianami konformacyjnymi i (lub) ze zmianami w biosyntezie białka przenośników.

9. Wydaje się, że w porównaniu z mitochondriami perikaryalnymi synaptosomy i mitochondria synaptosomalne są bardziej odporne na wpływ niedoboru tlenu.

PIŚMIENICTWO

1. Bergmeyer H. U., Bernt E.: Glutamate-oxaloacetate transaminase. W.: *Methods of Enzymatic Analysis*. Red. H. U. Bergmeyer, Academic Press, New York 1963, 834—845.
2. Booth R. F., Clark J. B.: A rapid method for the preparation of relatively pure, metabolically competent synaptosomes from rat brain. *Biochem. J.* 1978, 176, 365—370.
3. Clark J. B., Nicols W. J.: The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1970, 245, 4724—4731.
4. Deutsch C., Rafałowska U.: Transmembrane electrical potential measurements in rat brain synaptosomes. *FEBS Letters* 1979, 108, 274—279.
5. Johnson M. K.: The intracellular distribution of glycolytic and other enzymes in rat brain homogenates and mitochondrial preparations. *Biochem. J.* 1960, 77, 610—618.
6. Lai J. C. K., Clark J. B.: Preparation and properties of mitochondria derived from synaptosomes. *Biochem. J.* 1976, 154, 423—432.
7. Lai J. C. K., Walsh J. M., Dennis S. C., Clark J. B.: Synaptic and non-synaptic mitochondria from rat brain: isolation and characterization. *J. Neurochem.* 1977, 28, 625—631.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265—275.
9. Patel M. S.: Citrate transport and oxidation by isolated rat brain mitochondria. *Brain Res.* 1975, 98, 607—611.
10. Ochoa S.: Isocitric dehydrogenase system (TPN) from pig heart. W.: *Methods in Enzymology*. Red. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1955, 1, 699—704.
11. Racker E.: Spectrophotometric measurement of the enzymatic formation of fumaric and cis-aconitic acids. *Biochem. Biophys. Acta* 1950, 4, 211—214.
12. Rafałowska U.: Wewnątrzkomórkowa regulacja metabolizmu cytrynianu. *Post. Biol. Kom.* 1976, 3, 325—342.

13. Rafałowska U.: Citrate transport to isolated rat brain mitochondria. *Bull. Acad. Polon. Sci.* 1978, 26, 589—597.
14. Rafałowska U.: Transport of malate and citrate into rat brain mitochondria under hypoxia and anaesthesia. *Neurochem. Res.* 1979a, 4, 355—364.
15. Rafałowska U.: Rat brain synaptosomes: a preparation with high ATP/ADP. *Fed. Proc. Dallas* 1979b, 38, 1514.
16. Rafałowska U.: Activities of citrate metabolising enzymes in subcellular fractions from rat brain in normoxia, hypoxia and anaesthesia. *IRCS Med. Sci.* 1979c, 7, 207.
17. Rafałowska U., Erecińska M., Chance B.: The effect of aspartate on citrate metabolism in the cytosolic fraction of brain under conditions on normoxia, hypoxia and anaesthesia. *J. Neurochem.* 1975, 25, 497—501.
18. Rafałowska U., Książak H.: Subcellular localization of enzymes oxidizing citrate in the rat brain. *J. Neurochem.* 1976, 27, 813—815.
19. Rafałowska U., Pastuszko A.: Molecular weight of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from rat brain cytosol under normoxia and hypoxia. *Neurochem. Res.* 1979, 4, 241—247.
20. Rafałowska U., Książak H.: Uptake of citrate by synaptosomes and synaptosomal mitochondria from rat brain. *IRCS Med. Sci.* 1979, 7, 7.
21. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F.: Energy metabolism in rat brain synaptosomes from nembutal anesthetized and nonanesthetized animals. *J. Neurochem.* 1980a, 34 (6), 1380—1386.
22. Rafałowska U., Erecińska M., Wilson D. F.: The effect of acute hypoxia on synaptosomes from rat brain. *J. Neurochem.* 1980b, 1, 1160—1165.
23. Shephard D., Garland P. B.: The kinetic properties of citrate synthase from rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 1969, 114, 597—610.
24. Siesjö B. H.: Hypoxia, W: Brain energy metabolism. Red. B. H. Siesjö; J. Wiley and Sons, Interscience Publ. Chichester — New York, Brisbane—Toronto, 1978, 398—452.
25. Szutowicz A., Stepien M., Lysiak W., Angielski S.: The activity of ATP citrate lyase in rat brain and liver under various physiological conditions. *Acta Biochim. Polon.* 1974, 21, 331—338.
26. Szutowicz A., Lysiak W., Angielski S.: Udział liazy ATP-cytrynianowej w biosyntezie acetylocholino w mózgu. *Ann. Acad. Med. Gedan* 1978, 8, 11—25.
27. Tućek S.: Acetylcholine synthesis in neurons. W: Acetylcholine synthesis in neurons. Red. S. Tućek; A. Halsted Press Book John Wiley and Sons, New York, London Chapman and Hall, 1978, 33—61.
28. Weber K., Osborn M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 1969, 244, 4406—4412.
29. Whittaker V. P., Barker L. A.: The subcellular fraction of brain tissue with special reference to the preparation of synaptosomes and their component organelles. W: Methods of neurochemistry. Red. R. Fried; Marcel Dekker, New York 1972, 2, 1—52.
30. Williamson I. R., Corkey B. E.: Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods. W: Methods in Enzymology. Red. S. P. Colowick, N. E. Kaplan. Academic Press, New York, London 1969, 13, 434—513.

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

T R E Ś Ć

A. Loesch: ZIO-impregnowane kolbki synaptyczne w neuropilu jądra nadwzrokowego i przykomorowego szczura	157
L. Dydyk, M. Justyna: Wpływ enfluranu na synapsy w korze ruchowej królika w okresie rozwoju. Badania mikroskopowo-elektronowe metodą rutynową i po impregnacji ZIO	175
M. Owsianowski, M. Wender: Wbudowywanie (2— ¹⁴ C) DL— kwasu mewalonowego do cholesterolu mózgu w doświadczalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia	189
M. Skonieczna, M. Wierciak, I. Ścisłowska, W. Bicz: Wpływ chlorfenwinfosu i ipofosu na procesy oksydoredukcyjne w mitochondriach mózgu szczura podczas rozwoju	197
D. Sitkiewicz, G. Gietka, W. Bicz: Wpływ zatrucia fenchlorfossem na oddychanie mitochondriów mózgu szczurów w różnym wieku	209
A. K. Szilágyi, A. Tàtraaljai: Alfa-1-antytrypsyna w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym w chorobach wywołanych nadużywaniem alkoholu	217
A. Polewska-Jeske: Odczyny makrofagowe płynu mózgowo-rdzeniowego w przebiegu wirusowych i bakteryjnych zapaleń opon	227
K. Kucharska-Demczuk, H. Majchrowicz, A. Polewska-Jeske: Zmiany cytologiczne płynu mózgowo-rdzeniowego w przebiegu przewlekłych i przewlekających się zapaleń opon mózgowo-rdzeniowych i mózgu	243
M. J. Mossakowski: Doświadczalne modele encefalopatii wątrobowej	261
T. Majdecki: Zanik warstwy ziarnistej mózdzku w przypadku ostrej małopłytkowej skazy krwotocznej	277
U. Rafałowska: Metabolizm cytrynianu w mózgu szczura w warunkach normalnych i w niedotlenieniu. Streszczenie pracy habilitacyjnej	283
J. Dymecki: Kronika i informacje	188, 196
Oceny książek	226, 242

C O D E R Ż A N I E

A. Леш: ЗИО-импрегнированные синаптические колбочки в нейропиле супраоптического и перивентрикулярного ядер крысы	157
Л. Дыдык, М. Юстына: Влияние энфлурана на синапсы в моторной коре кролика в период их развития. Исследование обычным методом в электронном микроскопе и после импрегнации ЗИО	175
М. Овсяновски, М. Вендер: Встроивание (2- ¹⁴ C)DL — мевалоновой кислоты в холестерол мозга в экспериментальном аллергическом воспалению головного мозга и спинного мозга	189
М. Сконечна, М. Верцяк, И. Съцисловска, В. Бич: Влияние хлорфенвинфоса и ипофоса на оксидоредукционные процессы в mitochondриях мозга крысы во время развития	197
Д. Ситкевич, Г. Гетка, В. Бич: Влияние отравления фенхлорфосом на дыхание mitochondриев мозга крыс разного возраста	209
А. К. Силяди, А. Татраалjai: Альфа-1-антитрипсин в сыворотке и спинно-мозговой жидкости в болезнях вызванных злоупотреблением алкоголя	217
А. Полевска-Еске: Макрофаговые реакции спинно-мозговой жидкости в процессе вирусных и бактериальных менингитов	227
К. Кухарска-Демчук, Х. Майхрович, А. Полевска-Еске: Цитологические изменения спинно-мозговой жидкости в хронических менингитах	243
М. Я. Моссаковский: Экспериментальные модели печеночной энцефалопатии	261
Т. Майдецкий: Атрофия зернистого слоя мозжечка в случае острого тромбенического диатеза	277
У. Рафаловска: Метаболизм цитрата в мозге крысы в норме и гипоксии. Содержание диссертации на звание доцента	283

CONTENTS

A. Loesch: ZIO-impregnated boutons in neuropile of supraoptic and paraventricular nuclei of the rat	157
L. Dydak, M. Justyna: Influence of enflurane on the motor cortex synapses in rabbit, in the period of development (electron-microscopic studies by the routine method and after impregnation with ZIO)	175
M. Owsianowski, M. Wender: Incorporation of (2- ¹⁴ C) DL—mevalonic acid into brain cholesterol in experimental allergic encephalomyelitis (EAE)	189
M. Skonieczna, M. Wierciak, I. Ścisłowska, W. Bicz: Influence of chlorfenvinphos and ipofos on oxidoreducing processes in the rat brain mitochondria during development	197
D. Sitkiewicz, G. Gietka, W. Bicz: Effect of fenchlorphos intoxication on the respiration of brain mitochondria of rats at different age	209
A. K. Szilágyi, A. Tatraaljai: Alpha-1-antitrypsin in serum and cerebrospinal fluid especially with regard to alcoholic disorders	217
A. Polewska-Jeske: Macrophage reactions of the cerebrospinal fluid in the course of virus and bacterial meningitis	227
K. Kucharska-Demezuk, H. Majchrowicz, A. Polewska-Jeske: Cytological changes of the cerebrospinal fluid in the course of chronic and prolonged encephalo-meningitis	243
M. J. Mossakowski: Experimental modelling of hepatogenic encephalopathy	261
T. Majdecki: Atrophy of the cerebellar granular layer in the case of acute thrombopenic hemorrhagic diasthesis	277
U. Rafałowska: Citrate metabolism in the rat brain in normal and hypoxic conditions. Summary of the Ph. D. thesis	283

WARUNKI PRENUMERATY

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

- do dnia 25 listopada na I półrocze roku następnego i na cały rok następny,
- do 10 czerwca na II półrocze roku bieżącego.

Cena prenumeraty:

półrocznie	50 zł
rocznie	100 zł

Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach zaś, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych. Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w urzędach pocztowych i u doręczycieli.

Prenumeratę ze zleceniem wysyłki za granicę przyjmuje RSW „Prasa-Książka-Ruch” Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw, ul. Towarowa 28, 00-958 Warszawa, konto NBP XV Oddział w Warszawie nr 1153-201045-139-11. Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zleceniodawców indywidualnych i o 100% dla zleceniodawców instytucji i zakładów pracy.

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