

p. 105

II ep.

z dan

092 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

TOM 21

1983

ZESZYT 3

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 21

1983

ZESZYT 3

KOMITET REDAKCYJNY

Janusz Alwasiak, Maria Dąbwska, Jerzy Dymecki, Janusz Groniowski, Józef Kałuża,
Miroslaw B. Kozik, Jerzy Kulczycki, Adam Kunicki, Miroslaw J. Mossakowski,
Mieczyslaw Wender, Irmina Zelman

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczyslaw Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Miroslaw 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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1983.
Nakład: 550 egz. Objętość: ark. wyd. 9,50, ark. druk. 8, ark. A₁-17.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania
22 IV 1983. Podpisano do druku 3 X 1983. Druk ukończono w październiku 1983. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 2179/83. U-10.
Cena zł 100.—

1984-D-76
<http://rcin.org.pl>



ANNA TARASZEWSKA

OCENA ZABURZEŃ W TWORZENIU OSŁONEK MIELINOWYCH U KRÓLIKA PT NA PODSTAWIE BADAŃ RDZENIA KRĘGOWEGO W MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej CMDiK PAN, Mińsk Mazowiecki

Mielinizacja większości struktur ośrodkowego układu nerwowego u królika rozpoczyna się po urodzeniu i postępuje w pierwszych dwóch miesiącach życia (Dekaban 1956; Wender i wsp. 1969; Dąbska, Danielewicz-Kotowicz 1978; Mottet i wsp. 1979). U królika pt z dziedziczną drżączką porażną badania w mikroskopie świetlnym wykazały mniejsze zaawansowanie i przedłużenie czasu trwania mielinizacji we wszystkich strukturach mózgu oraz rdzenia w porównaniu ze zdrowymi królikami w tym samym wieku (Taraszevska, Zelman 1981). Również badanie mikroskopowo-elektronowe królików pt w wieku od 6 do 9 tygodni wykazało, że w tym okresie w rdzeniu kręgowym spotyka się wczesne stadia mielinizacji włókien oraz zmiany w osłonkach mielinowych, świadczące o nieprawidłowym przebiegu procesu tworzenia osłonek (Taraszevska 1979).

Rdzeń kręgowy należy do najwcześniej mielinizujących się struktur układu nerwowego. Pojawianie się mieliny w powrózkach tylnych rdzenia stwierdzono u królika na 2 dni przed urodzeniem, ale największy jej przyrost występuje w okresie od urodzenia do 12 dnia życia, później przyrost ten zmniejsza się i po 40 dniu życia zawartość mieliny w danej objętości pola nie ulega zmianie (Dekaban 1956). W niniejszej pracy postanowiono przeprowadzić badania na rdzeniu kręgowym, uwzględniając fakt, że u królika pt pierwsze objawy kliniczne występują około 11 dnia i w tym czasie możliwa jest identyfikacja zwierząt chorych, a równocześnie jest to okres najintensywniejszego tworzenia mieliny w rdzeniu. Podjęte badania mają na celu morfologiczną ocenę zaburzeń w tworzeniu mieliny u królika pt ze szczególnym uwzględnieniem ultrastrukturalnych cech osłonek mielinowych oraz próbę określenia dynamiki tych zaburzeń przez porównanie obrazu mielinizacji w okresie wczesnym z okresem późniejszym, gdy u normalnych królików mielinizacja powinna być już zakończona.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na królikach pt w 2 grupach wiekowych: grupa I — 4 króliki badane w pierwszych dniach po wystąpieniu objawów klinicznych w postaci drżeń całego ciała, w tym 2 króliki w 11, 1 w 13 i 1 w 15 dniu życia; grupa II — 8 królików pt w wieku powyżej 6 tygodni w okresie nasilonych objawów klinicznych z drzeniami i ciężkimi niedowładami lub porażeniami kończyn. W grupie tej były 2 króliki 7-tygodniowe, 3 8-tygodniowe i po jednym w 9, 10 i 12 tygodniu życia.

Materiał kontrolny stanowiły 3 króliki 11-dniowe oraz 3 króliki w wieku 8 tygodni, wszystkie klinicznie zdrowe, bez genetycznego obciążenia cechą pt, hodowane w takich samych warunkach jak stado pt.

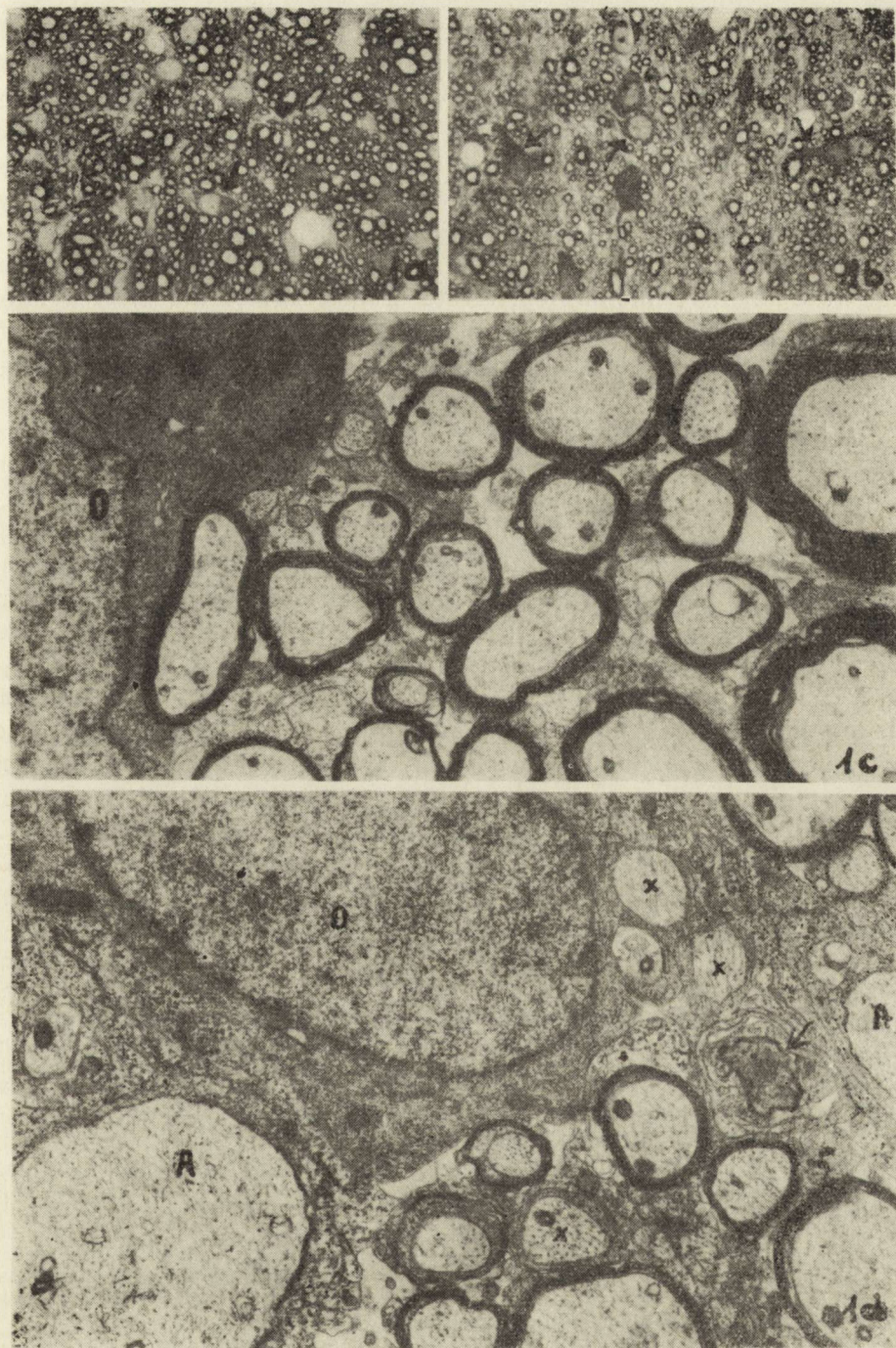
Zwierzęta usypiano wodzianem chloralu podawanym dootrzewnowo. W narkozie otwierano klatkę piersiową i przez aortę wstępującą wprowadzano płyn utrwalający, zawierający 3,9% aldehyd glutarowy w buforze fosforanowym według Sørensen. Po perfuzji wyjmowano mózg i rdzeń, następnie wycinki z istoty białej rdzenia przeznaczone do badania w mikroskopie elektronowym utrwalano w 2% OsO₄, odwadniano w alkoholach i zatapiano w Eponie 812. Skrawki półcienkie o grubości 1 μm barwiono błękitem toluidyny i oglądano w mikroskopie świetlnym. Skrawki ultracienkie kontrastowano octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Zdjęcia wykonywano w mikroskopie elektronowym JEM 7A i JEM 100B.

WYNIKI

Grupa I

Na półcienkich skrawkach rdzenia 11-dniowych królików kontrolnych stwierdzono, że prawie wszystkie włókna były otoczone osłonkami mielinowymi wykazującymi równomierną grubość w zależności od wielkości aksonów. Pomędzy włóknami osłonkowymi występowały liczne mielinizacyjne komórki oligodendrogleju charakteryzujące się dużym jasnym jądrem i nieco ciemniejszą wielobiegunową cytoplazmą z wypustkami oraz astrocyty z jasną cytoplazmą i jądrem, przeważnie owalnym (ryc. 1a).

W preparatach rdzenia królików pt nie było wyraźnej różnicy między zwierzętami 11-, 13- i 15-dniowymi. W porównaniu do królików kontrolnych stwierdzano mniejszą ilość włókien posiadających osłonki mielinowe, zwłaszcza wśród drobnych aksonów. Aksony duże i średnie z osłonkami podobnej grubości jak w kontroli były rzadziej rozsiane, a ich osłonki wykazywały nierówną barwliwość z przejaśnioną warstwą środkową. We włóknach tej samej wielkości, grubość osłonek mielinowych była różna (ryc. 1b). Komórki glejowe były liczne, ale oligodendrocyty mielinizacyjne charakteryzowały się cytoplazmą znacznie ciemniejszą niż u królików kontrolnych, często o ułożeniu jednobiegunowym.



Ryc. 1. Różnica w ilości i grubości osłonek mielinowych oraz wyglądzie komórek oligodendrogleju (strzałki) między królikiem kontrolnym i królikiem pt. a. Królik kontrolny 11-dniowy. b. Królik pt. 15-dniowy. a—b. Półcieńskie skrawki. Błękit toluidyny. Pow. 400 X. c. Królik kontrolny 11-dniowy. Aksony z jednakowymi, dobrze wykształconymi osłonkami mielinowymi. Oligodendrocyt (O). Pow. 9500 X. d. Królik pt 15-dniowy. Widoczne aksony niezmielinizowane, otoczone wypustkami

W badaniu mikroskopowo-elektronowym królików kontrolnych osłonki mielinowe wokół dużych i średnich aksonów były dobrze wykształcone (ryc. 1c) oraz wykazywały ścisły równy układ blaszek gęstych i pośrednich, których liczba wahała się w granicach 10 wokół średnich aksonów i od kilkunastu do 20 wokół większych aksonów (ryc. 2a). Cytoplazma wypustek oligodendrocytów była widoczna jedynie na wewnętrznym i zewnętrznym obwodzie osłonek. Drobne aksony były otoczone wypustkami cytoplazmatycznymi oligodendrocytów w sposób charakterystyczny dla wczesnej fazy mielinizacji, często z obecnością kilku blaszek mielinowych na zewnętrznej części wypustki cytoplazmatycznej. Aksony w fazie przedmielinizacyjnej bez widocznego kontaktu z cytoplazmą oligodendrocytów były nieliczne i wyłącznie małego kalibru.

U królików pt liczba aksonów niezmielinizowanych była większa. W odróżnieniu od królików zdrowych również duże i średnie aksony u królików pt często nie posiadały osłonek mielinowych (ryc. 1d). Część z nich była otoczona wypustkami cytoplazmatycznymi oligodendrogleju, jak we wstępnej fazie mielinizacji, przeważnie jednak były widoczne różnego rodzaju nieprawidłowości. Spotykano aksony otoczone wypustkami astrocytarnymi wyłącznie lub razem z wypustkami oligodendrocytów, lub leżące wolno w przestrzeni pozakomórkowej.

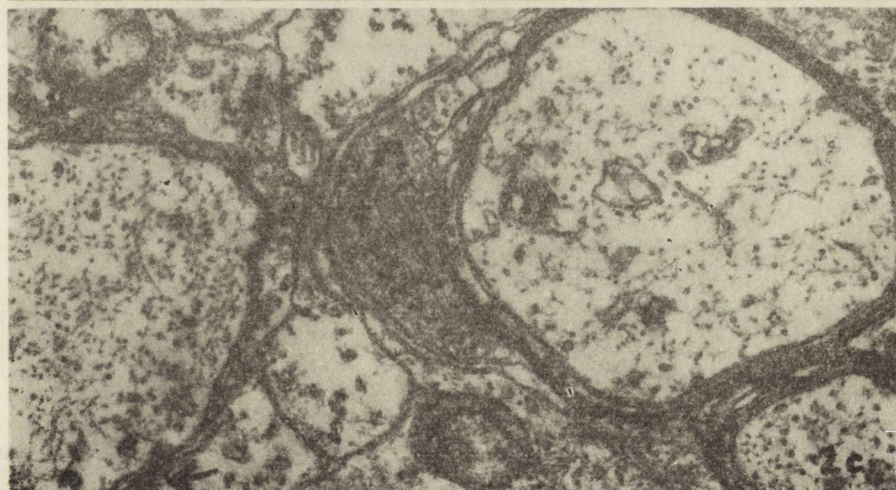
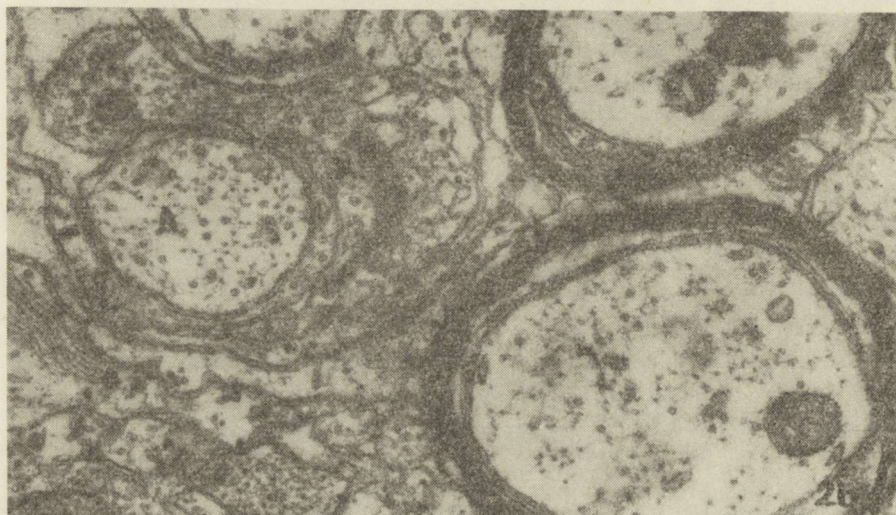
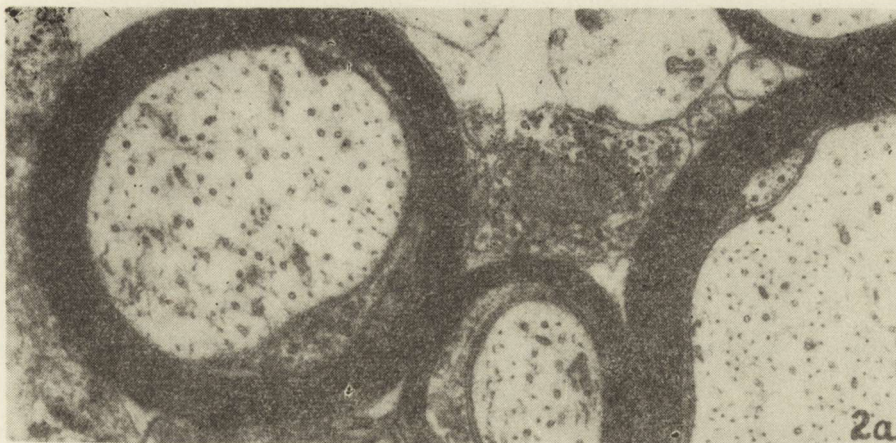
Wypustki mielinizacyjne oligodendrocytów otaczały aksony niekompletnie lub niekiedy po kilka wokół pojedynczego aksonu (ryc. 2b,c). Wytworzone osłonki mielinowe charakteryzowały się słabszym kontrastem w małych powiększeniach, natomiast w większych stwierdzano roz-

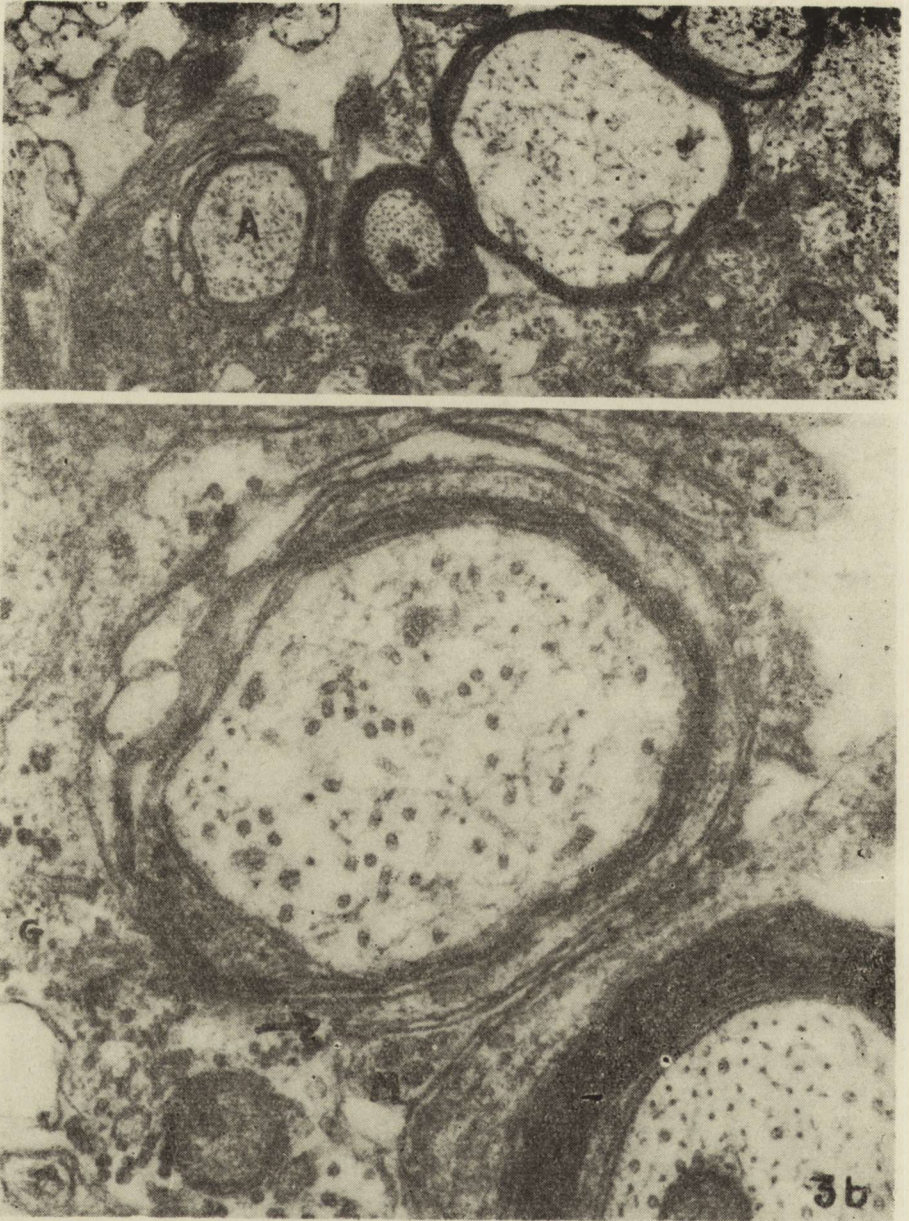
astrocytarnymi (A) oraz aksony w fazie wczesnej mielinizacji (x). Pojedynczy akson zwyrodniał (strzałka). W cytoplazmie oligodendrocyta (O) rozproszone wolne rybosomy. Pow. 7500 \times

Fig. 1. Difference in the amount and thickness of myelin sheaths and in appearance of oligodendroglial cells (arrows) between control and pt rabbits *a.* 11-day control rabbit. *b.* 15-day pt rabbit. Semithin sections. Toluidine blue. $\times 400$. *c.* 11-day control rabbit. Axons with uniform, well developed myelin sheaths. Oligodendrocyte (O). $\times 9500$. *d.* 15-day pt rabbit. Unmyelinated axons are surrounded by astrocytic processes (A). Some axons show early stage of myelination (x). One degenerated axon (arrow). In cytoplasm of oligodendrocyte (O) dispersed free ribosomes. 7500 \times

Ryc. 2a. Królik kontrolny 11-dniowy. Osłonki mielinowe o ścisłej strukturze blaszkowej. Pow. 32300 \times . *b.* Królik pt 15-dniowy. Drobny akson (A) otoczony wypustką oligodendrocyta, tworzącą jedno spiralne okrażenie oraz dodatkowo drugą szeroką wypustką (x) zawierającą w cytoplazmie liczne pęcherzyki. W osłonkach mielinowych rozluźniony, nieregularny układ blaszek. Pow. 35400 \times . *c.* Królik pt 11-dniowy. Cienka osłonka mielinowa z dużym mezaksonem zewnętrznym (M). Poszerzone wypustki astrocytarne, niektóre w bezpośrednim kontakcie z aksonem niezmielinizowanym (strzałka). Pow. 27800 \times

Fig. 2a. 11-day control rabbit. Well-compacted myelin sheaths. $\times 32300$. *b.* 15-day pt rabbit. Small axon (A) ensheathed by one turning of oligodendroglial process and by additional another process (x) containing numerous vesicles. Myelin sheaths with loose and irregular lamellar arrangement. $\times 35400$. *c.* 11-day pt rabbit. Thin myelin sheath with large outer mesaxon (M). Enlarged astrocytic processes, some of them about the unmyelinated axon (arrow). $\times 27800$





Ryc. 3a. Królik pt 15-dniowy. Różna grubość osłonek mielinowych, jeden z aksonów (A) otoczony pojedynczymi blaszkami mielinowymi i kilkoma warstwami cytoplazmatycznymi. Pow. 15700 \times . *b.* Większe powiększenie z ryciny poprzedniej wykazuje wypustkę astrocytarną wnikającą między blaszki mielinowe (strzałka). Mezakson zewnętrzny (M), włókienka glejowe (G). W sąsiedniej osłonce mielinowej odległości między blaszkami gęstymi nieregularnie poszerzone. Pow. 53100 \times

Fig. 3a. 15-day pt rabbit. Variable thickness of myelin sheaths. One of axons (A) ensheathed by a few myelin lamellae and cytoplasmic layers. \times 15700. *b.* Higher magnification of previous figure shows an astrocytic process penetrating between the myelin lamellae (arrow). Outer mesaxon (M). Gliofilaments (G). In neighbouring myelin sheath the distance between major dense lines are irregularly expanded. \times 53100

luźniony i nierówny układ blaszek mielinowych, nieregularnie poszerzone warstwy elektronowo jasne i całkowity lub odcinkowy brak blaszek pośrednich. Liczba blaszek mielinowych ciemnych była mniejsza niż w kontroli; w osłonkach wielu aksonów średniego i większego kalibru wynosiła od 4 do 6.

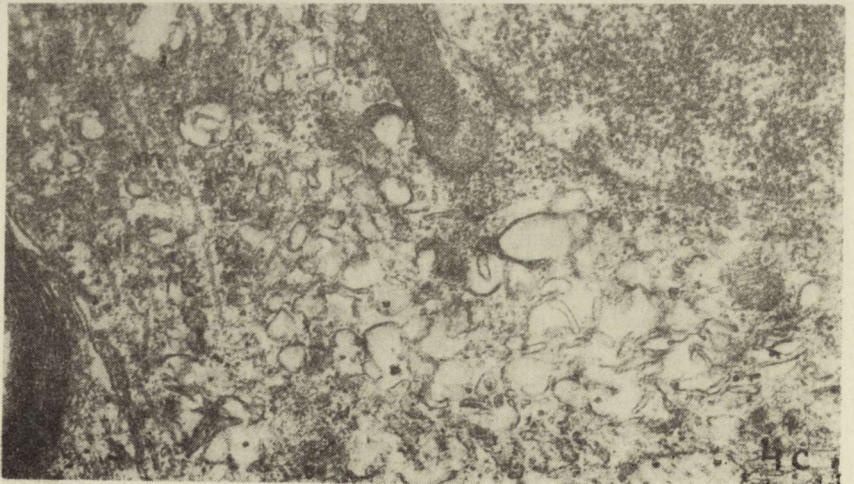
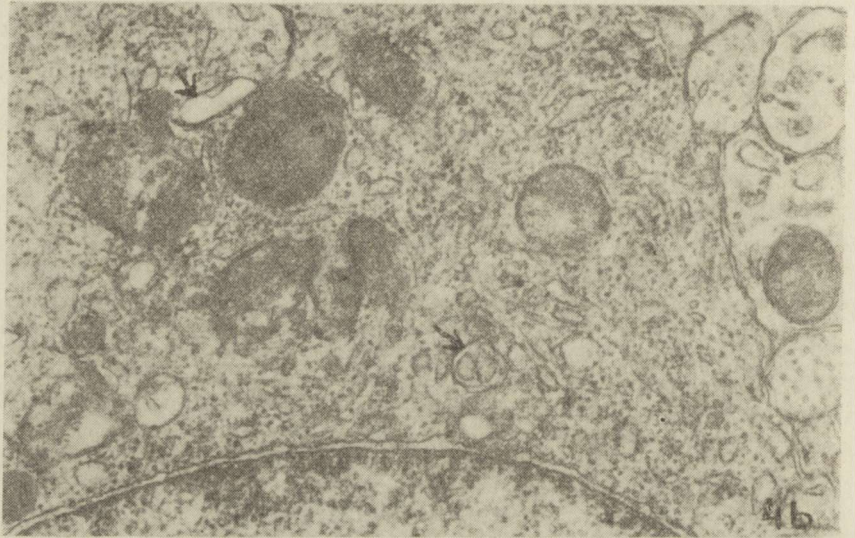
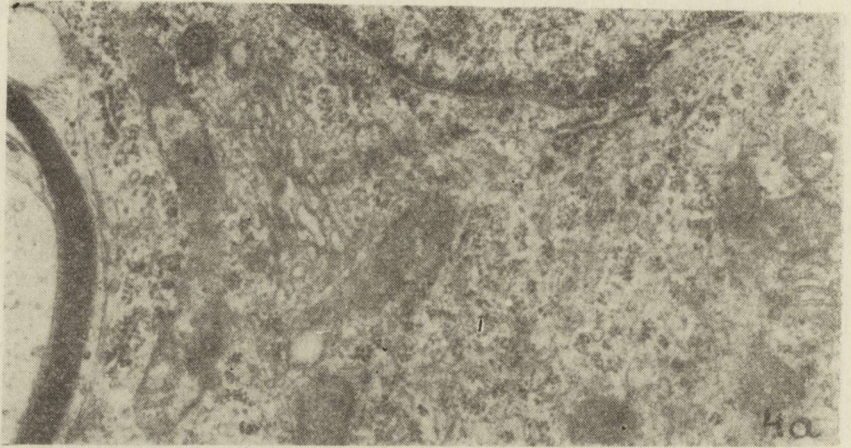
W niektórych osłonkach część blaszek gęstych pozostawała rozdwojona i obecne były odcinkowe lub okrężne warstwy cytoplazmy oligodendrogleju; ponadto spotykano osłonki rozwarstwione przez cytoplazmę wypustek astrocytarnych, wnikającą między blaszki mielinowe (ryc. 3a,b). Komórki oligodendrogleju u królików kontrolnych i pt miały podobne jądra z homogenną chromatyną, różniły się natomiast cytoplazmą. U królików pt widoczne było zubożenie siatki śródplazmatycznej szorstkiej, zwiększenie ilości wolnych rozproszonych rybosomów i rozrost błon cytoplazmatycznych gładkich, tworzących drobne pęcherzyki i kanały oraz małe fragmenty blaszkowatych struktur błoniastych, luźno rozsiane w cytoplazmie (ryc. 4a,b). Obecne były również dość liczne mikrotubule. Niekiedy zmiany te były bardziej nasilone — w cytoplazmie oligodendrocytów stwierdzano nagromadzenie drobnych pęcherzyków i nieregularnych fragmentów błon (ryc. 4c). U królików pt oprócz zmienionych oligodendrocytów spotykano komórki z cytoplazmą wypełnioną kroplami lipidowymi (ryc. 5a). Od oligodendrocytów różniły się one wyglądem jądra i cytoplazmy oraz morfologicznie odpowiadały komórkom glejowym opisanym przez Vaughna i Petersa (1968) jako trzeci typ neurogleju. Takie same komórki, ale bez ciał tłuszczowych, spotykano również u zdrowych królików (ryc. 5b). U królików pt obserwowano ponadto zwiększenie liczby i przerost wypustek astrocytarnych zawierających liczne włókienka glejowe.

Grupa II

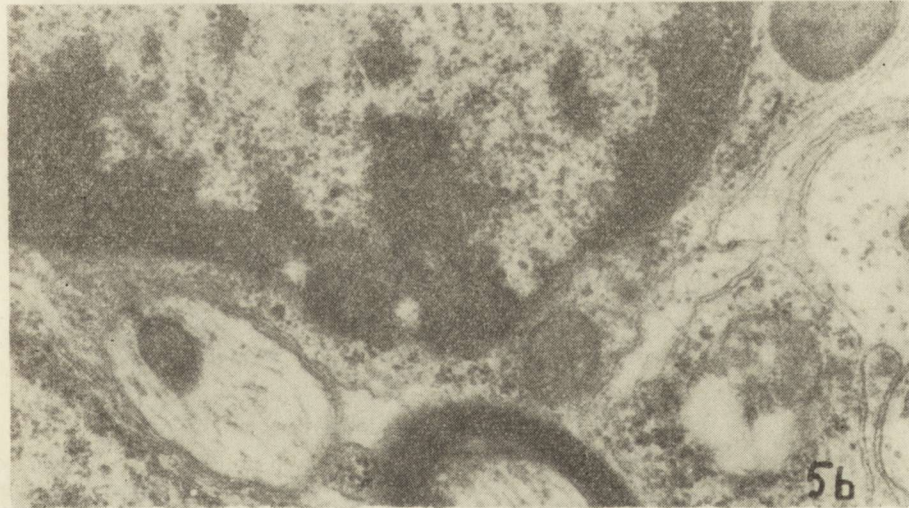
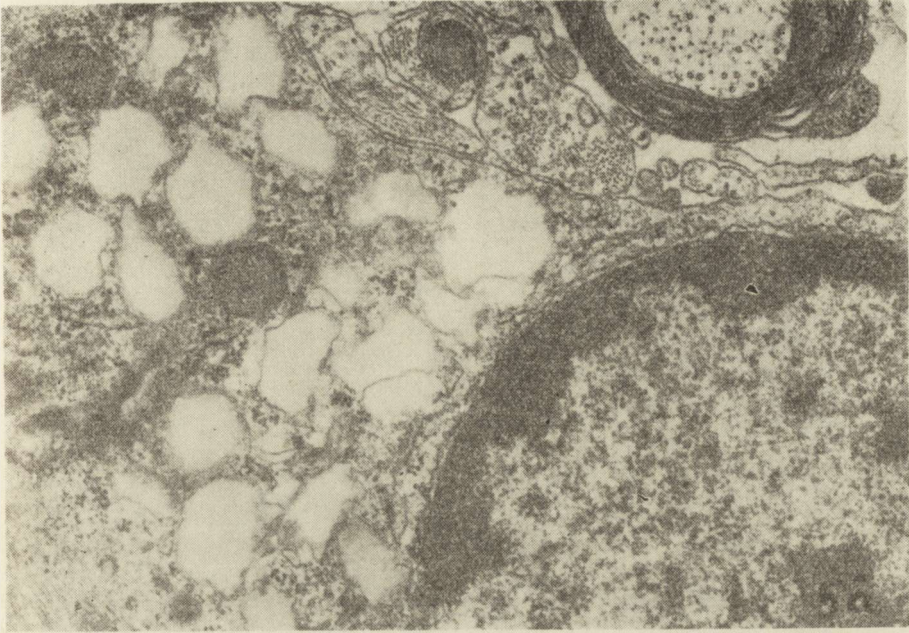
W mikroskopie świetlnym u 8-tygodniowych królików kontrolnych obserwowano w rdzeniu zwarty układ włókien mielinowych z osłonkami o regularnej grubości (ryc. 6a), natomiast u królików pt zarówno 8-, jak również 10- i 12-tygodniowych osłonki mielinowe we włóknach tego samego kalibru były nierówne, w większości bardzo cienkie. Zagęszczenie

Ryc. 4a. Królik kontrolny 11-dniowy. Prawidłowy obraz cytoplazmy oligodendrocyta zawierającej siatkę śródplazmatyczną szorstką, polirybosomy oraz mikrotubule. Pow. 22100 \times . b. Królik pt 11-dniowy. W cytoplazmie oligodendrocyta widoczne wolne rozproszone rybosomy, mikrotubule, liczne struktury drobnych pęcherzyków i kanałów błon śródplazmatycznych oraz małe fragmenty struktur blaszkowych (strzałka). Pow. 30300 \times . c. Królik pt 15-dniowy. Zmiany wielopęcherzykowe w cytoplazmie oligodendrocyta. Mikrotubule (m). Pow. 27800 \times .

Fig. 4a. 11-day control rabbit. Normal oligodendrocyte cytoplasm containing rough endoplasmic reticulum, polyribosomes and microtubules. \times 22100. b. 11-day pt rabbit. In oligodendrocyte cytoplasm are visible free dispersed ribosomes, microtubules, numerous small vesicular and tubular profiles of endoplasmic membranes and small fragments of lamellar structures (arrow). \times 30300. c. 15-day pt rabbit. Multivesicular changes in oligodendrocyte cytoplasm. Mikrotubules (m.) \times 27800.



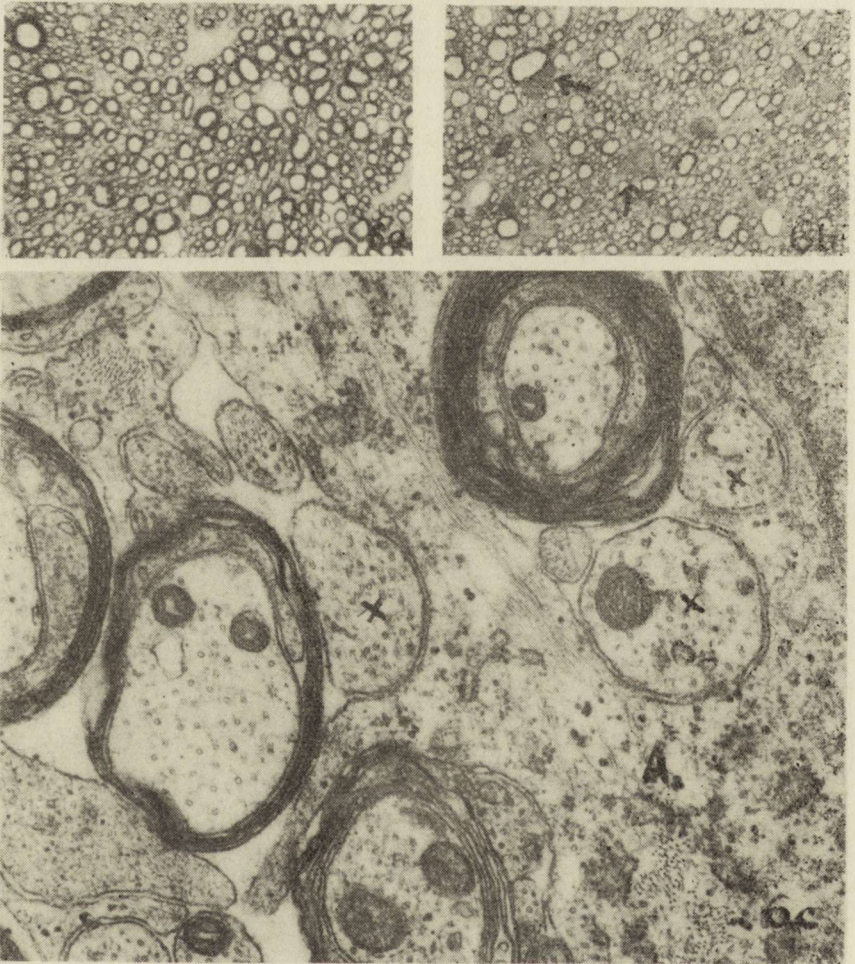
komórek glejowych było większe niż w materiale kontrolnym. Nadal występowały komórki oligodendrogleju z ciemną cytoplazmą (jak w grupie I) oraz duże jasne oligodendrocyty mielinizacyjne i przerosłe astrocyty (ryc. 6b).



Ryc. 5a. Królik pt 13-dniowy. Krople lipidowe w cytoplazmie komórki glejowej, której jądro z gęstymi skupieniami chromatyny i cytoplazma z krótkimi zbiornikami siatki śródplazmatycznej szorstkiej są typowe dla trzeciego typu neurogleju. Pow. 45700 \times . *b.* Królik kontrolny 11-dniowy. Podobna komórka jak na rycinie poprzedniej ale bez ciał lipidowych. Pow. 44900 \times

Fig. 5a. 13-day pt rabbit. Lipid droplets in cytoplasm of the glial cell in whose the nucleus containing dense chromatin clumps and the cytoplasm with short strands of rough endoplasmic reticulum are typical of Type III glial cell. \times 45700. *b.* 11-day control rabbit. Similar cell as in previous figure, but without cytoplasmic lipid droplets. \times 44900

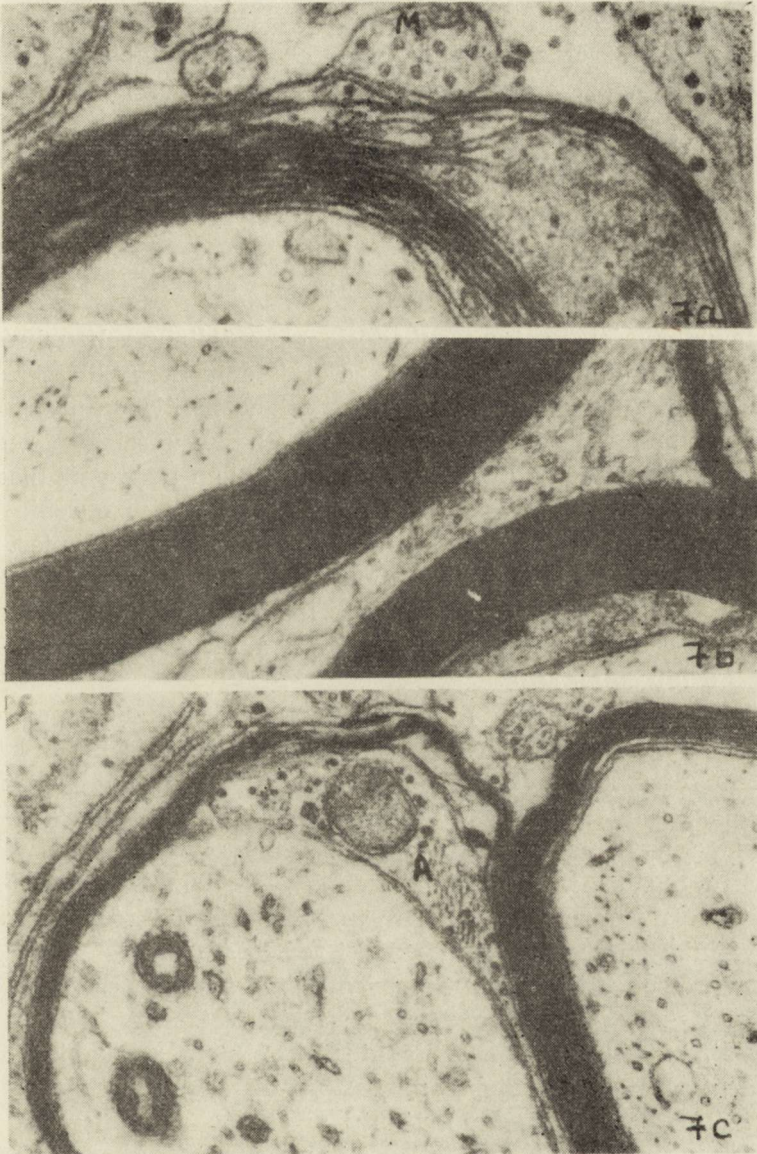
W mikroskopie elektronowym u królików pt stwierdzano takie same zmiany, jak opisane w grupie I, z niewielkimi tylko różnicami ilościowymi. Rzadziej niż w grupie I obserwowano włókna wykazujące wczesną fazę mielinizacji, częściej natomiast spotykano aksony niezmielinizowane otoczone przez wypustki astrocytów (ryc. 6c). Ośłonki mielinowe były cienkie, o rozluźnionej strukturze blaszkowej, ze zwiększoną odległością między blaszkami gęstymi i z zaburzonym układem blaszek rozwarstwio-



Ryc. 6a. Królik kontrolny 8-tyg. Skrawek półcienki. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times . b. Królik pt 8-tyg. Słabsza mielinizacja i zwiększona gęstość komórek glejowych w porównaniu do ryciny a. Widoczne młode oligodendrocyty (strzałki). Skrawek półcienki. Błękit toluidyny. Pow. 400 \times . c. Królik pt 9-tygodniowy. W ośłonkach mielinowych rozluźniony i nieregularny układ blaszek i powiększone wypustki cytoplazmatyczne wewnętrzne. Aksony niezmielinizowane (x) częściowo otoczone przez cytoplazmę astrocyta (A). Pow. 30600 \times

Fig. 6a. 8-week control rabbit. Semithin section. Toluidine blue. \times 400. b. 8-week pt rabbit. Depressed myelination and increased number of glial cells as compared to fig. a. Young oligodendrocytes are present (arrows). Semithin section. Toluidine blue. \times 400. c. 9-week pt rabbit. Myelin sheaths with loose and irregular arrangement of lamellae and enlarged inner cytoplasmic tongues. Unmyelinated axons (x) partially surrounded by astrocytic cytoplasm (A). \times 30600

nych przez cytoplazmę oligodendrocyta (ryc. 7a) lub przez wypustki astrocytarne znajdujące się wewnątrzosłonkowo, często w bezpośrednim



Ryc. 7a. Królik pt 9-tygodniowy. Fragment osłonki mielinowej, rozwarstwionej przez cytoplazmę oligodendrogleju. Odległości między zachowanymi blaszkami gęstymi zwiększone, nierówne. Mezakson zewnętrzny (M) Pow. 73100 \times . b. Królik kontrolny 8-tygodniowy. Zwarta prawidłowa struktura wieloblaszkowa osłonek mielinowych. Pow. 59800 \times . c. Królik pt. 8-tygodniowy. Osłonka mielinowa odwarstwiona od aksonu przez wypustkę astrocytarną (A). W sąsiednim włóknie osłonka dość cienka ale o prawidłowej, zwartej strukturze blaszkowej. Pow. 56400 \times

Fig. 7a. 9-week pt rabbit. A portion of myelin sheath with splitting by pockets of oligodendroglial cytoplasm. The distance between intact major dense lines are expanded and unequal. Outer mesaxon (M). \times 73100. b. 8-week control rabbit. Multilamellar compacted normal structure of myelin sheaths. \times 59800. c. 8-week pt rabbit. The myelin sheath separated from the axon by astrocytic process (A). In neighbouring fiber a thin sheath with normal compacted structure. \times 56400

kontakcie z aksonem (ryc. 7c). W porównaniu z królikami pt 11- i 15-dniowymi, w grupie tej część osłonek mielinowych wykazywała bardziej zwartą strukturę blaszkową z obecnością blaszek pośrednich i cyklicznością blaszek gęstych zbliżoną do mieliny u normalnych królików, tj. około 12,5 nm, jednak nie osiągały one tej regularności struktury blaszkowej ani grubości, jaką wykazywały osłonki mielinowe u zdrowych królików 8-tygodniowych (ryc. 7b). Zmiany opisane w komórkach glejowych w grupie I były widoczne również u królików pt 7—12-tygodniowych.

OMÓWIENIE

Nieprawidłowości w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt w badanym materiale polegają na: 1) zmniejszeniu liczby blaszek mieliny i tym samym zmniejszonej grubości osłonek w porównaniu z włóknami tej samej średnicy u królików zdrowych; 2) braku ścisłego zespolenia blaszek mielinowych, które wiąże się z zaburzeniem tworzenia blaszek pośrednich i z obecnością warstw cytoplazmatycznych w obrębie osłonek mielinowych. Równocześnie liczba zmielinizowanych aksonów jest zmniejszona w porównaniu z królikami kontrolnymi w tym samym wieku. Stwierdzone zmiany świadczą zarówno o ilościowych, jak i jakościowych zaburzeniach w tworzeniu mieliny u królika pt, które można określić ogólnie jako hipomielinizację.

Wadliwa mielinizacja *oun* na podłożu genetycznym znana jest u wielu gatunków zwierząt, dotychczas nie była jednak opisana u królików. Z przeglądu literatury dotyczącej mutantów u myszy i innych zwierząt z zaburzeniami mielinizacji ośrodkowego układu nerwowego (Hogan 1977; Baumann 1980; Baumann i wsp. 1981) wynika, że stwierdzane zmiany strukturalne w osłonkach mielinowych u królika pt są najbardziej zbliżone do opisywanych u myszy *Quaking*, u których występuje również redukcja blaszek mielinowych i rozwarstwienie struktury blaszkowej przez wypustki cytoplazmatyczne (Samorajski i wsp. 1970; Berger 1971). Wydaje się jednak, że nasilenie tych zmian u królika pt jest mniejsze niż u mutantu *qk*. Podobnie jak u myszy *Quaking* również u królika pt występuje zwiększona gęstość oligodendrocytów w porównaniu z normą, co różni oba mutanty w sposób zasadniczy od myszy *Jimpy* i *Jimpy msd* (Billings-Gagliardi i wsp. 1980).

Zmiany opisywane w oligodendrocytach u myszy *Quaking* w postaci ziarnisto-błoniastych wakuoli w cytoplazmie i wakuolizacji wypustek (Watanabe, Bingle 1972) nie były jednak obserwowane w badanym materiale królików pt. Oba mutanty różni też sposób dziedziczenia — recesywny autosomalny u myszy *Quaking* i recesywny w sprzężeniu z płcią u królika pt.

Dziedziczenie w sprzężeniu z płcią u mutantów z hipomielinizacją *oun* jest częste i występuje u myszy *Jimpy* i *Jimpy msd* (Billings-Gagliardi

1980), u szczurów Wistar md (Barron i wsp. 1980), u prosiąt Landrace z wrodzonym drżeniem typu AIII (Patterson i wsp. 1972), wreszcie u ostatnio opisanego mutanta u szceniąt rasy spaniel (Griffiths i wsp. 1981). Wszystkie te mutacje wykazują jednak różnice w rozległości, nasileniu i podstawowych defektach mielinizacji, co wskazuje na raczej odrębny mechanizm molekularny tych zaburzeń.

W tym zestawieniu również królik pt reprezentuje mutację różną od dotychczas znanych mutantów z zaburzeniami mielinizacji. Zasadnicza różnica polega na tym, że u królika z dziedziczną drżączką porażną występują zmiany neuronalne znane dotychczas jedynie z badań w mikroskopie świetlnym (Osetowska i wsp. 1975, 1976; Taraszewska, Zelman 1981). Fakt ten może mieć podstawowe znaczenie w interpretacji mechanizmu zaburzeń mielinizacji u królika pt. Pomimo że niedomoga syntezy i utrzymania osłonek mielinowych wiąże się najczęściej z nieprawidłowościami komórek oligodendrogleju, istnieją też dane świadczące o tym, że aksony i komórka nerwowa uczestniczą w złożonym procesie prawidłowego tworzenia mieliny (Weinberg, Spencer 1976). Czynniki odgrywające rolę w tym procesie są jednak mało dotychczas poznane, a przedstawione w niniejszym doniesieniu badania nie upoważniają do szerszego analizowania tego problemu.

Zmiany w oligodendrocytach występujące u królika pt mogą natomiast w jakimś stopniu tłumaczyć niedostateczne i wadliwe tworzenie mieliny. Obserwowane na skrawkach półciennych i elektronogramach komórki oligodendrogleju wykazują mniejszy stopień dojrzałości w porównaniu do królików kontrolnych, co wyraża się u królików 11-dniowych i starszych zwiększeniem gęstości cytoplazmy, w której występuje duża ilość wolnych rozproszonych rybosomów i drobnych pęcherzyków błoniastych, mało natomiast wykształconych struktur siatki śródplazmatycznej szorstkiej. Komórki te zachowują więc pewne cechy morfologiczne glioblastów, chociaż ich zróżnicowanie w kierunku oligodendrocytów jest potwierdzone obecnością licznych mikrotubul w cytoplazmie i wypustkach oraz tworzeniem wypustek mielinizacyjnych. Wydaje się, że wypustki oligodendrocytów posiadają zdolność zapoczątkowania pierwszej fazy mielinizacji polegającej na spiralnym okręceniu aksonu, natomiast główne zaburzenia dotyczą dalszych stadiów tworzenia osłonki, w których następuje zespalanie błon plazmatycznych wypustki oligodendrocyta i wytwarzanie zwartej wieloblaszkowej struktury mieliny. W normalnym procesie mielinizacji owo zespolenie błon plazmatycznych następuje prawie natychmiast w czasie okręcania się wypustki mielinizacyjnej wokół aksonu i proces mielinizacji, już rozpoczęty, postępuje bardzo szybko (Raine 1977; Webster, Sternberger 1980). Niektórzy badacze uważają, że w stosunku do blaszek gęstych blaszki pośrednie tworzą się z pewnym opóźnieniem (Caley, Butler 1974), stąd też ich brak

i zwiększona cykliczność blaszek mielinowych jest charakterystyczna dla mieliny niedojrzałej. Uszkodzenia znajdujące u królika pt mogą więc polegać na opóźnieniu i osłabieniu dojrzewania mieliny, podobnie jak w procesie tzw. „zatrzymania mielinogenezy” — koncepcji przyjmowanej przez niektórych autorów dla myszy Quaking (Wiśniewski, Morell 1971; Hogan 1977), a podstawowy błąd może dotyczyć błon plazmatycznych komórki oligodendrocyta. Zmiany w cytoplazmie oligodendrocytów świadczą, że wytwarzanie prawidłowo zorganizowanych struktur błon śródplazmatycznych jest zakłócone.

Obecność komórek tzw. trzeciego typu neurogleju z cytoplazmą obladowaną kroplami lipidowymi może wiązać się ze zmianami ilościowymi w tworzeniu osłonek mielinowych. Komórki te występują już u królików w wieku od 11 do 15 dni, przy braku wyraźnego rozpadu mieliny, stąd też należy raczej sądzić, że nagromadzenie lipidów w ich cytoplazmie powstaje w następstwie zmniejszonego wykorzystania prekursorów lipidowych w procesie mielinogenezy.

ОЦЕНКА НАРУШЕНИЙ ОБРАЗОВАНИЯ МИЕЛИНОВЫХ ОБОЛОЧЕК У КРОЛИКА pt НА БАЗЕ ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СПИННОГО МОЗГА

Резюме

Были проведены электронно-микроскопные исследования белого вещества спинного мозга у кроликов pt в возрасте 11, 13, 15 дней и 7, 8, 9, 10, 12 недель и у здоровых кроликов в возрасте 11 дней и 8 недель.

У контрольных кроликов в 11 дне жизни большинство аксонов имели хорошо сформированные миелиновые оболочки соответственно периоду наиболее интенсивной миелинизации спинного мозга в первых 2 неделях после рождения, зато в возрасте 8 недель констатируется полную миелинизацию волокон.

У кроликов pt в возрасте 11—15 дней и 7—12 недель наблюдались значительное уменьшение количества миелизированных волокон в сравнении с контрольными кроликами в соответствующем возрасте, а также изменения в строении миелиновых оболочек, которые заключались в: 1) меньшей толщине оболочек в результате уменьшенного числа миелиновых пластинок на около половину в сравнении с контрольным материалом; 2) расслаблении строения пластинок в связи с частично несформированными межучасточными пластинками; 3) отсутствии в некоторых участках соединения густых пластинок; 4) наличии слоев цитоплазматических отростков олигодендритов или некогда астроцитов внутри оболочек. Количество глиозных клеток было увеличено. Констатируются признаки морфологической незрелости олигодендритов в форме слабо сформированной шероховатой средиплазматической сетки и увеличенного количества свободных рассеянных рибосом; кроме того наблюдались многопузырьковые изменения в их цитоплазме. Астроциты проявляли реактивные изменения. Кроме того находились клетки с цитоплазмой нагруженной липидными каплями. Представленные исследования свидетельствуют об ослабленном и неправильном образовании миелиновых оболочек у кролика pt, а констатированные изменения указывают на сохранение структуральной незрелости миелина.

EVALUATION OF DISTURBANCES IN MYELIN SHEATHS FORMATION
IN pt RABBIT. ELECTRON MICROSCOPIC STUDY OF SPINAL CORD

Summary

Electron microscopic study was performed on spinal cord white matter in 11, 13, 15 days old and 7—12 weeks old pt rabbits and in 11 days and 8 weeks old normal rabbits.

In normal rabbits in 11 day of age, the majority of axons presented well developed myelin sheaths, in accordance to the most intensive myelination period, and in 8 weeks old rabbits the spinal white matter was fully myelinated.

In pt rabbits 11—15 days and 7—12 weeks old the myelinated axons were remarkably less numerous than in the control in respective age and structural abnormalities of myelin sheaths were present. These abnormalities included: 1) diminution of myelin sheaths thickness due to reduced number of myelin lamellae about half part of that in the control; 2) loosening of lamellar arrangement of myelin related to the partially undeveloped intraperiod lines; 3) failure of major dense lines in some parts of sheaths; 4) the presence of cytoplasmic sheets of oligodendroglial and sometimes astroglial processes within myelin sheaths.

Glial cells were increased in number. In oligodendroglial cells features of morphological immaturing appeared in the form of poorly developed rough endoplasmic reticulum and increased amounts of free dispersed ribosomes; moreover multivesicular cytoplasmic changes were observed. Astrocytes exhibited reactive changes. Lipid-laden glial cells also occurred.

The presented results are suggestive for impaired and defective myelin sheaths formation and indicate on persistent structural immaturity of the myelin in pt rabbit.

PIŚMIENNICTWO

1. Barron K. D., Dentinger M. P., Csiza C. K.: Ultrastructural observations on myelin deficiency (md), a dysmyelinating neurologic mutant in the Wistar rat. [W:] Neurological mutations affecting myelination, INSERM Symp. No 14. Red. N. Baumann. Elsevier, Amsterdam New York, Oxford, 1980, 99—106.
2. Baumann N.: Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symp. No 14. Red. N. Baumann. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1980.
3. Baumann N., Bourre J. M., Jacque C., Hauw J. J., Lachappelle F., Zalc B., Castaigne P.: Dysmyélinisations génétiques de la souris. Leur apport à la pathologie humaine. *Rev. Neurol.*, (Paris) 1981, 137, 133—136.
4. Berger B.: Quelques aspects ultrastructuraux de la substance blanche chez la souris Quaking. *Brain Res.*, 1971, 25, 35—53.
5. Billings-Gagliardi S., Adcock L. H., Wolf M. K.: Hypomyelinated mutant mice: description of jp msd and comparison with jp and qk on their present genetic backgrounds. *Brain Res.*, 1980, 194, 325—338.
6. Caley D. W., Butler A. B.: Formation of central and peripheral myelin sheaths in the rat. An electron microscopic study. *Am. J. Anat.*, 1974, 140, 339—348.
7. Dąbska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelination of some structures of rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 203—218.
8. Dekaban A.: Oligodendroglia and axis cylinders in rabbits before, during, and after myelination. *Anat. Rec.*, 1956, 126, 111—122.
9. Griffiths I. R., Duncan I. D., McCulloch M., Harvey M. J. A.: Shaking pups: a disorder of central myelination in the spaniel dog. Part. 1. Clinical, genetic and light-microscopical observations. *J. neurol. Sci.*, 1981, 50, 423—433.

10. Hogan E. L.: Animal models of genetic disorders of myelin. [W:] Myelin. Red. P. Morell. Plenum Press, New York 1977, 489—520.
11. Mottet S., Matthieu J. M., Cohen S. R.: Myelin deposition in the rabbit optic system. *Brain Res.*, 1979, 164, 338—341.
12. Osetowska E., Luszawski F., Taraszewska A.: Morfologia i klinika poronnych i ciężkich przebiegów choroby u królika pt. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 71—85.
13. Osetowska E., Taraszewska A., Luszawski F.: VI. Występowanie zwapnień neuronalnych u królika pt w zależności od wieku i przebiegu klinicznego. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 85—95.
14. Patterson D. S. P., Sweasey D., Harding J. D. J.: Lipid deficiency in the central nervous system of Landrace piglets affected with congenital tremor A III, a form of cerebrospinal hypomyelinogenesis. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2791—2799.
15. Raine C. S.: Morphological aspects of myelin and myelination. [W:] Myelin. Red. P. Morell, Plenum Press, New York 1977, 1—49.
16. Samorajski T., Friede R. L., Reimer P. R.: Hypomyelination in the Quaking mouse. A model for the analysis of disturbed myelin formation. *J. Neuropat. exp. Neurol.*, 1970, 29, 507—523.
17. Taraszewska A.: Zmiany ultrastrukturalne w rdzeniu kręgowym u królika pt w okresie objawowym choroby. *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 19—37.
18. Taraszewska A., Zelman I. B.: Charakterystyka topografii zmian w mózgu królika pt w okresie rozwoju objawów klinicznych i w przewlekłym przebiegu choroby. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 441—459.
19. Watanabe I., Bingle G. J.: Dysmyelination in quaking mouse. Electron microscopic study. *J. Neuropat. exp. Neurol.*, 1972, 31, 352—369.
20. Webster H. de F., Sternberger N. H.: Morphological features of myelin formation. [W:] Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symposium No 14. Red. N. Baumann, Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1980, 73—86.
21. Weinberg H. J., Spencer P. S.: Studies on the control of myelinogenesis. II. Evidence for neuronal regulation of myelin production. *Brain Res.*, 1976, 113, 363—378.
22. Wender M., Kozik M., Owsianowski M.: Histoenzymatic study of neuroglia during myelination of the rabbit brain. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1969, 7, 135—150.
23. Wiśniewski H., Morell P.: Quaking mouse. Ultrastructural evidence for arrest of myelinogenesis. *Brain Res.*, 1971, 29, 63—73.
24. Vaughn J. E., Peters A.: A third neuroglial cell type. An electron microscopic study. *J. comp. Neurol.*, 1968, 133, 269—288.

Adres autorki: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej CMDiK PAN, ul. Warszawska 126, 05—300 Mińsk Mazowiecki

ANDRZEJ GONCERZEWICZ

APPLICATION OF ELECTRON IMMUNOCYTOCHEMISTRY TO THE
STUDY OF DISTRIBUTION OF MYELIN-ASSOCIATED
GLYCOPROTEIN IN THE EARLY PERIOD OF WALLERIAN
DEGENERATION IN THE OPTIC SYSTEM *

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

The study of central Wallerian degeneration (WD) in adult animals makes possible an insight into the slowly progressing processes, which precede and accompany the myelin disintegration. One of these events is the disruption of the myelin-axonal connection. This connection is believed to be formed and maintained with participation of myelin-associated glycoprotein (MAG), as was found by means of light microscopy immunocytochemistry by Sternberger et al. (1979) in oligodendroglial cytoplasm before the beginning as well as in the initial stage of myelination. In further stages of development the immunostaining intensity declined and, when compact myelin sheaths were formed, it was confined to the periaxonal region.

In a pathological condition, Itoyama et al. (1980) in a light-microscopic study of multiple sclerosis (MS) plaques demonstrated the occurrence of early changes in MAG immunoreactivity in this periaxonal region, what may indicate a pathobiochemical alteration of still morphologically unchanged myelin-supporting cells. The importance of investigation of very early changes in myelin in the course of central WD, which may contribute to better understanding of the nature of the myelin-axon interrelationship, was also stressed by Wender et al. (1979). Hence, analysis of pathological events affecting simultaneously both axons and myelin-glial units requires the use of high-resolution microscopic techniques for precise topographical localization of specific membrane antigens. For these reasons, it seemed interesting to establish the morphological pattern of MAG immunoreactivity at the ultrastructural level in

* This investigation was supported by the research grant J-05-092-N.

the experimental condition, in which the axoplasm is rapidly breaking down, whereas the investing myelin retains its physical structure for a relatively longer period of time.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was performed on adult guinea pigs and rats subjected to unilateral removal of the eye ball in Nembutal anesthesia. Two and five days after the operation the animals were perfused via the aorta with modified Karnovsky fixing solution (4.6% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer 0.2 M, pH \pm 7.4). The optic nerve and optic tract from the injured as well as from the intact side were sampled (in these animals all optic nerve fibers pass through the chiasma to the contralateral side forming the optic tract). Most of the sampled material was routinely embedded in paraffin. Simultaneously, the remaining portions of the material were cut transversely with a specially designed device (razor blades attached to a handle) into very small pieces of roughly uniform size. After short postfixation in cold fixative and careful washing with cacodylate buffer, these sections were processed for electron immunocytochemistry. Immediately before application of immunostaining procedures, 60 μ m thick paraffin sections were deparaffinized.

The unlabeled peroxidase-antiperoxidase (PAP) method after Sternberger (1979) has been used in this study. Sections were incubated sequentially in: 1) 3% normal goat serum in 0.5 M phosphate saline buffer (PBS), pH 7.6 for 30 min; 2) rabbit antiserum to rat MAG diluted 1:500 to 1:1000 with paraffin sections and 1:2000 with those for ultrastructural study; antiserum was diluted in the same PBS buffer containing 1% normal goat serum, incubation time ranges from 30 to 90 min at room temperature; 3) goat-antirabbit IgG, diluted 1:20 in 0.5 M Tris-saline for 30 min; 4) rabbit PAP diluted 1:100 (or 1:200 for electron microscopy) in PBS containing 1% normal goat serum for 30 min; 5) 0.01% hydrogen peroxidase and 0.05% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in 0.1 M Tris-saline buffer pH 7.6 for 6—8 min for light and 3 min for electron microscopy. Careful washing with PBS and blotting was performed between individual steps, when necessary.

Paraffin sections were then treated for 5 min with 2% buffered OsO₄ and mounted in glycerol for viewing in a Zeiss microscope using differential interference contrast (Nomarski) optics. Sections for ultrastructural study were processed routinely, beginning with 1-hour postfixation

with 2% buffered osmium, and embedded in Epon. These sections were cut in a Reichert ultramicrotome and photographed in a JEM 7A electron microscope. In most cases counterstaining with lead and uranium salts was omitted to avoid interference with the immunoreaction product.

Structures contralateral to injured ones served as morphological controls. As far as immunocytochemistry is concerned, absorbed primary antiserum was used in step 2 for control purposes, or this step was entirely omitted.

RESULTS

Paraffin sections as viewed in Nomarski optics revealed no difference between controls and 2 days after experimental injury. The immunoreaction product was scanty, but rather evenly distributed, delineating the inner parts of myelin sheath (Fig. 1). However, on 5th day the immunoreaction pattern was dramatically changed. This was readily visible, when uninjured white matter was compared with the neighbouring injured optic tract (Fig. 2). In this period immunopositive structures of different size and shape were seen unevenly distributed throughout the entire area of the lesion. At higher magnification (Fig. 3) it seemed justified to assume that the shape and distribution of the immunopositive deposits corresponded to those of disintegrated myelin.

Electron microscopy provided a more detailed picture of distribution of the immunoreaction product. On the 2nd day after operation granular electron dense deposits were sometimes observed in the periaxonal spaces, but in most instances appeared within the compact myelin sheath in places, where this structure had begun to split. The immunoreaction product appeared to be strictly confined to myelin leaflets bordering small and irregular intramyelinic clefts (Fig. 4).

On the 5th day after operation as the disintegration of myelin was in progress, the amount of the immunoreaction product confined to myelin had considerably increased. Within still unchanged axons it was present in periaxonal spaces; but more often, as the myelin leaflets became separated from each other or even tended to form ovoids, large accumulation of electron-dense deposits was seen in those particular regions of distorted myelin sheath (Fig. 5). More detailed distribution of immunopositive deposits is visible in Figure 6. Here separated membranes of disintegrated myelin are delineated by electron dense granules, whereas the borders of larger, ovoidal clefts formed within the myelin contain a much smaller amount of reaction product.

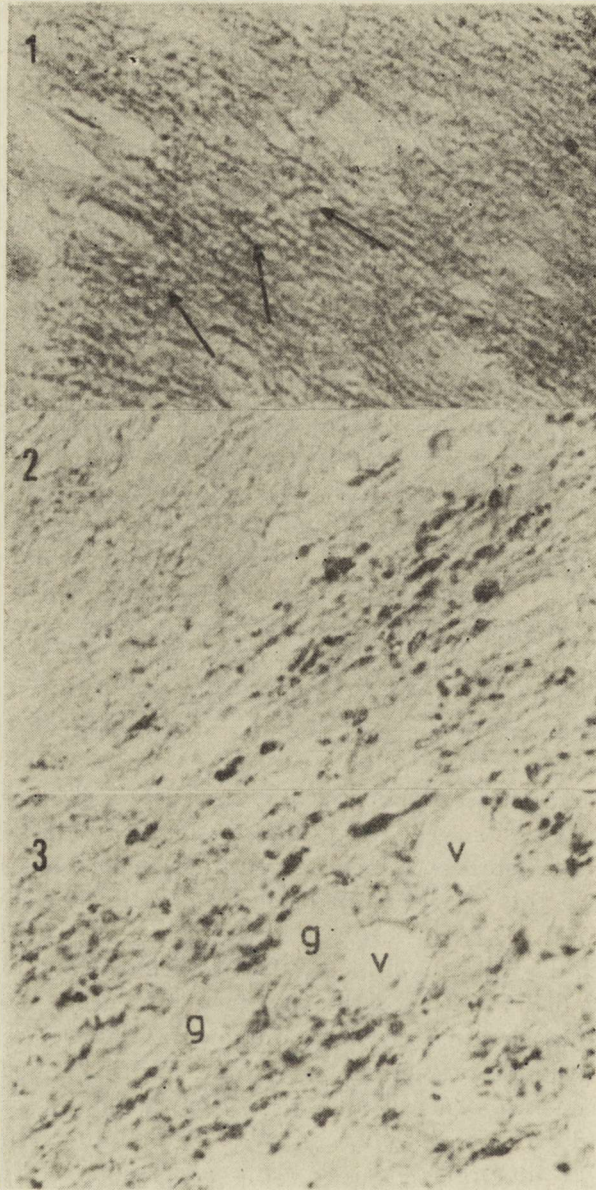


Fig. 1. Optic tract, contralateral side to injured one, used as control. Scanty immunoreaction product delineates the inner contour of myelin sheath (arrows). Nomarski optics. $\times 400$

Ryc. 1. Norma — nieszkodzone pasmo wzrokowe. Obecny w niewielkich ilościach produkt immunoreakcji obrysowuje wewnętrzne kontury osłonki mielinowej (strzałki). Optyka Nomarskiego. Pow. 400 \times

Fig. 2. Optic tract, 5 day of experiment. Irregular distribution of immunopositive structures of different size and shape (right side). Compare with the lack of im-

munoreactivity within neighbouring uninjured white matter (upper left). Nomarski optics. $\times 400$

Ryc. 2. Pasma wzrokowe, 5 dzień doświadczenia. Struktury wykazujące obecność produktu reakcji immunocytochemicznej o rozmaitych kształtach i wymiarach są nieregularnie rozrzucone w obrębie uszkodzonej istoty białej (prawa strona). Różnica nasilenia reakcji jest wyraźna, zwłaszcza w porównaniu z sąsiadującą nieuszkodzoną istotą białą (lewa strona). Optyka Normarskiego. Pow. $400 \times$

Fig. 3. Higher magnification of injured optic nerve, 5 day of experiment. The size and distribution of immunopositive structures seem to be similar as that of myelin sheath. Glial cytoplasm (g) and vessel walls (v) are free of reaction product. Nomarski optics. $\times 560$

Ryc. 3. Większe powiększenie uszkodzonego nerwu wzrokowego w 5 dniu doświadczenia. Wielkość i rozmieszczenie immunopozytywnych struktur wydają się odpowiadać znamionemu dla osłonek mielinowych. Cytoplazma gleju (g) i ściany naczyń (v) nie wykazują obecności produktu reakcji. Optyka Normarskiego. Pow. $560 \times$

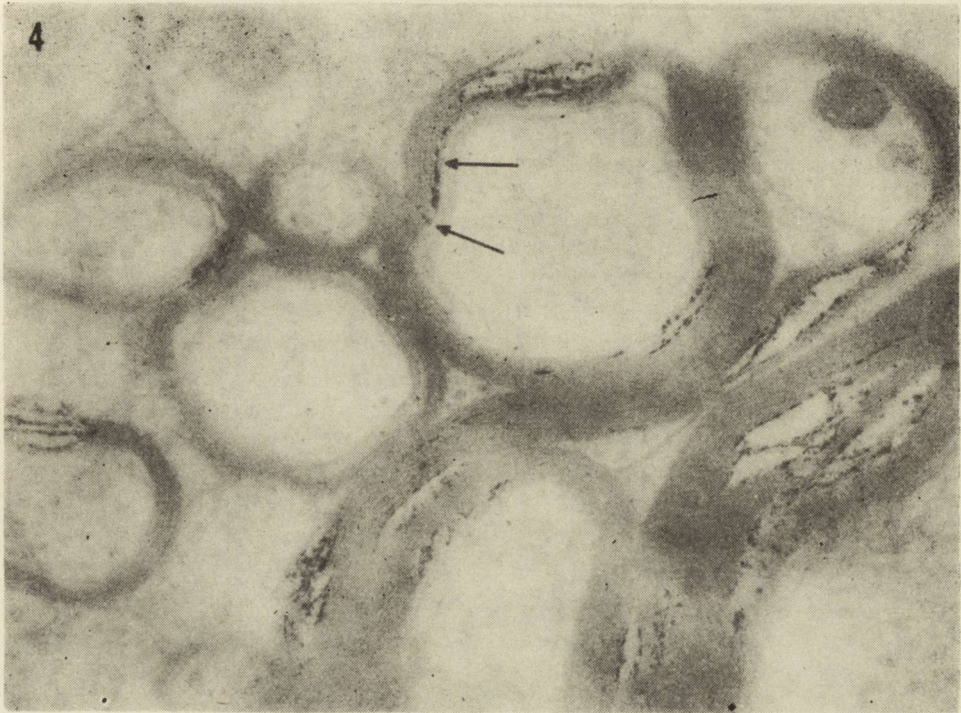


Fig. 4. Optic nerve, 2 day of experiment. Granular electron-dense immunoreaction product is deposited within periaxonal space of morphologically intact axon (arrows). Every myelin leaflet bordering irregular intramyelinic cleft is studded with electron-dense deposits. Unstained ultrathin section. $\times 52\,000$

Ryc. 4. Nerw wzrokowy w 2 dniu doświadczenia. Ziarnisty, elektronooptycznie gęsty produkt immunoreakcji obecny jest w przestrzeni okołoaksonalnej włókna osiowego bez morfologicznych cech uszkodzenia (strzałki). Każda blaszka mielinowa ograniczająca nieregularne szczeliny wewnątrzosłonkowe wykazuje na swej powierzchni obecność ziaren produktu reakcji. Skrawek ultracienki, nie kontrastowany solami ołowiu i uranu. Pow. $52.000 \times$

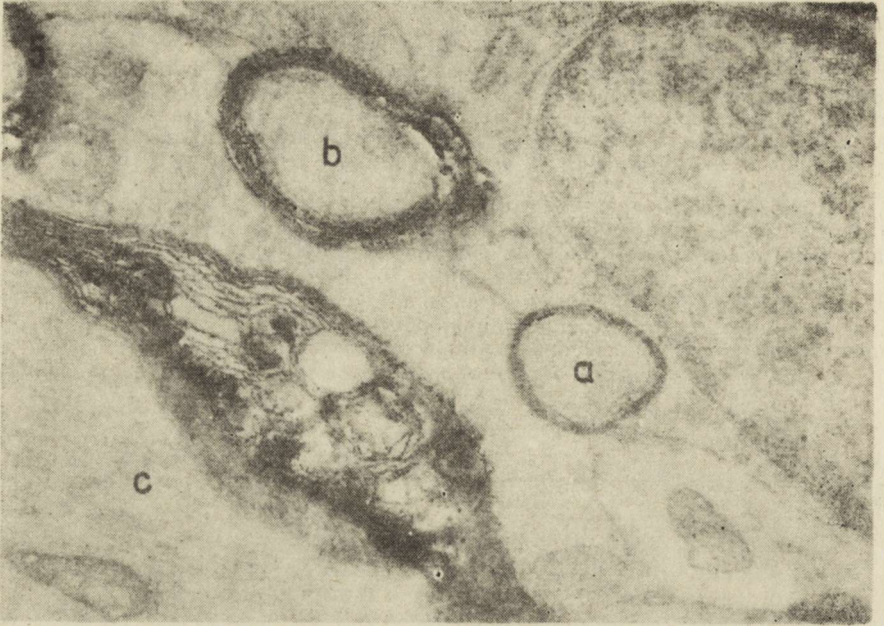


Fig. 5. Optic nerve, 5 day of experiment. Small, morphologically unchanged axon reveals the reaction product in part of its periaxonal space (a); in the other axon (b), reaction product is packed between individual myelin lamellae, which begin to split and is also more heavily accumulated in the border of larger cleft; finally, in case of advanced destruction of myelin invested large axon (c), reaction product is deposited in large amounts between separated myelin leaflets. Unstained ultrathin section. 19500 X

DISCUSSION

Up till now only several papers dealing with the morphology of MAG in pathological conditions have appeared. Among them there is the excellent work of Itoyama et al. (1980), who demonstrated the altered immunoreactivity of periaxonal MAG, preceding the myelin breakdown around fresh plaques in multiple sclerosis (MS). The authors attribute the decreased immunoreactivity to the loss or degradation of the MAG molecules which are necessary to maintain the myelin integrity. On the other hand, recently Ulrich and Heitz (1982) examining various glial antigens in leukodystrophies found that the distribution of MAG was surprisingly little altered within all their specimens.

Biochemically, there is some evidence of definite loss of MAG content in the tissue subjected to autolytic changes (Mathieu et al. 1977), as well as in the samples from MS brains or in cases of experimental Wallerian degeneration (Mathieu 1981). Contrary to that, Wender et al. (1982) when studying the MAG content in early stages of Wallerian degeneration in the rabbit optic nerve by means of radioactive fucose incorporation did not detect serious involvement of this glycoprotein in the biochemical events occurring in this period.

The here presented data show an unusual pattern of highly immunopositive structures five days after experimental injury. In an attempt to explain this phenomenon, the high-resolution technique of localization of antigenic sites, offered by electron microscopy was employed. However, application of the ultrastructural cytochemistry of MAG, to the morphological study of nervous tissue arouses some technical problems.

Antibodies used in the triple-layered PAP method do not penetrate unfixed tissue, but the fixative should preserve both the antigenicity of membrane-associated MAG as well as the whole ultrastructure of the myelin sheath. In this respect, concentration of glutaraldehyde seems to be of a critical importance (van Ewijk et al. 1980). In this experiment,

Ryc. 5. Nerw wzrokowy w 5 dniu doświadczenia. Małe, niezmiennione morfologicznie włókno osiowe wykazuje obecność produktu reakcji w części przestrzeni okołoksonalnej (a), ale nie w mielinie; w innym aksonie (b) produkt reakcji upakowany jest między blaszki mielinowe, które tracą już swoją zwartość, oraz występuje w znaczniejszej ilości na brzegu większej szczeliny; zaawansowany proces zniszczenia osłonki mielinowej otaczającej dużych rozmiarów akson (c); produkt reakcji odkłada się w znacznej ilości między rozdzielonymi blaszkami mielin. Skrawek ultracienki, niekontrastowany ołowiu i uranu. Pow. 19500 ×

Fig. 6. Optic nerve, 5 day of experiment. Separated myelin leaflets are studded with granular reaction product. These deposits have appeared neither in the lumen of larger, ovoidal intramyelinic cleft (arrow), nor in connection with other membraneous structures. Unstained ultrahin section. 40500 ×

Ryc. 6. Nerw wzrokowy w 5 dniu doświadczenia. Produkt reakcji powiązany jest wyłącznie z oddzielnymi od siebie błonami mielinowymi. Nie występuje ani w świetle dużej, wewnątrzmielinowej owoidalnej szczeliny, ani też w powiązaniu z niemielinowymi strukturami błoniastymi. Skrawek ultracienki, niekontrastowany solami ołowiu i uranu. Pow. 40500 ×

for the sake of better preservation of the ultrastructure, a somewhat higher (0.5%) than that generally recommended concentration of glutaraldehyde was used. And, although Sternberger et al. (1978) stress the superiority of fixatives containing saturated HgCl_2 for immunocytochemical purposes, the fixative used in the present study makes possible immunocytochemical localization concomitant with adequate preservation of ultrastructure. The latter point is of great importance in view of Novikoff's (1980) remark: "*in vivo* enzyme sites and location of reaction product could coincide only in well preserved cells" — what seems to be equally valid for immunocytochemistry.

Application of the pre-embedding unlabeled PAP method to the study of central nervous tissues has also offered some advantages. Generally, its high sensitivity allows to use high dilutions of primary antiserum and to avoid in this way non-specific staining. Although false negative results may occur in some circumstances, positive staining can be safely accepted (Eng, Bigbee 1978). Specifically, the structure of myelin itself restricts the orientation of molecules of PAP-antibodies giving a resolution which is far below the theoretically estimated values (Sternberger 1979).

Bearing all this in mind it may be assumed that the presence of the immunoreaction product within slowly degenerated myelin sheaths can by no means be recognized as artifactual. On the 2nd day after injury the immunoreaction product is present in some small intramyelinic clefts, which are beyond the resolution power of light microscopy techniques. As the extent of myelin disruption progresses, on the 5th day, the reaction product becomes visible in larger areas of the myelin sheath between separated myelin lamellae. This may be detected in paraffin sections as irregular immunopositive structures. At the same time, immunoreactivity being connected in intact myelinated axons with periaxonal spaces becomes no longer visible, what may be interpreted as a consequence of early axonal changes leading to structural modification of periaxonal membranes. As the axonal damage in Wallerian degeneration is not uniformly distributed and starts usually from axons of larger sizes (Goncerzewicz 1982), on the 5th day of experiment the spectrum of changes of various intensity from negligible to far advanced appeared simultaneously. This led to irregular distribution of immunopositive structures as seen in light microscopic pictures.

The appearance of the immunoreaction product within as yet compact myelin may be explained as a consequence of the exposure of antigenic determinants of myelin membranes, caused by an opening of myelin-associated extracellular compartments. But the process of physicochemical degradation of myelin ovoids is known to progress very slowly, and that is why individual myelin membranes retain their antigenic pro-

perties for a time. In these particular conditions the highly sensitive PAP method reveals a great number of MAG antigenic determinants as an intensive deposition of the immunoreaction product in this early stage of myelin injury.

*

Acknowledgement: The primary antibody was kindly donated by Dr. Nancy Sternberger.

ZASTOSOWANIE IMMUNOCYTOCHEMII ULTRASTRUKTURALNEJ DO BADAŃ
LOKALIZACJI WYSOKOCZĄSTECZKOWEJ GLIKOPROTEINY MIELINY (MAG)
WE WCZESNYM OKRESIE ZWYRODNIENIA WALLERA
W UKŁADZIE WZROKOWYM

Streszczenie

Badano zmiany morfologicznej lokalizacji wysokocząsteczkowej glikoproteiny mieliny (MAG), odgrywającej ważną rolę w utrzymywaniu połączenia między włóknem osiowym a osłonką mielinową w przebiegu ośrodkowego zwyrodnienia Wallera. Zastosowaną technikę nieznakowanych przeciwciał przeciwko peroksydazie (PAP) z powodzeniem zaadaptowano do badań ultrastrukturalnych. Podjęto próbę wyjaśnienia faktu pojawienia się dużej liczby nieregularnie rozmieszczonych struktur wykazujących dodatnią reakcję immunochemiczną w 5 dniu doświadczonego schorzenia. Okazało się, że produkt reakcji powiązany jest z błonami mielinowymi ograniczającymi wewnątrzosłonkowe szczeliny, których liczba wzrastała w miarę postępu zmian degeneracyjnych osłonki. Tempo tych zmian było jednak wolniejsze niż w przypadku błon otaczających przestrzeń okołoaaksonalną i jest prawdopodobne, że przynajmniej we wczesnym okresie zmiany te nie prowadzą do utraty własności antygenowych blaszek mielinowych umiejscowionych w części wewnętrznej degenerującej osłonki.

Dyskutowano także techniczne aspekty wprowadzenia wysoce swoistej i czulej metody wykrywającej lokalizację antygenów tkankowych do badań na poziomie podkomórkowym.

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ИММУНОХИМИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛОКАЛИЗАЦИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЛЮКОПРОТЕИДА МИЕЛИНА (MAG)
В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ВАЛЛЕРОВСКОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ
В ЗРИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

Резюме

Исследовано изменения морфологической локализации высокомолекулярного глюкпротеида миеллина (MAG): играющего важную роль в сохранении связи между аксоном и миелиновой оболочкой в течение центральной валлеровской дегенерации. Для ультраструктурных исследований была успешно приспособлена техника немаркированных антител против пероксидазы (PAP). Автор предпринял попытку выяснить факт появления большого числа нерегулярно размещенных структур проявляющих положительную иммунохимическую реакцию на 5 дне экспериментального заболевания. Оказалось, что продукт реакции связан с миелиновыми оболочками отграничивающими внутриоболочковые щели, которых число возрастало по мере прогресса дегенеративных изменений оболочки. Однако

темп этих изменений был более медленен, чем в случае оболочек окружающих околоаксиональное пространство. Кажется вероятным, что по крайней мере в раннем периоде эти изменения не ведут к потере антигенных свойств миелиновых пластинок локализованных во внутренней части дегенерированной оболочки. Обсуждено технические аспекты применения очень оригинального и чувствительного метода локализации тканевых антигенов в исследованиях на субклеточном уровне.

REFERENCES

1. Eng L. F., Bigbee J. W.: Immunochemistry of nervous system specific antigens. [In:] *Advances of Neurochemistry*. Ed. B. W. Agranoff, M. M. Aprison, Plenum Publ. Corp., New York 1978, 43—98.
2. Ewijk van W., Coffman R. C., Wiessman I. L.: Immunoelectron microscopy of cell surface antigens: a quantitative analysis of antibody binding, after different fixation protocols. *Histochem. J.*, 1980, 12, 349—361.
3. Goncerzewicz A.: Electron microscopic study of astrocytic reaction in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. *Neuropatol. Pol.*, 1982, 20, 47—60.
4. Itoyama Y., Sternberger N. H., Webster H. de F., Quarles R. H., Cohen S. R., Richardson E. P. Jr.: Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.*, 1980, 7, 167—177.
5. Matthieu J. M.: Glycoproteins associated with CNS myelin: a review. Abstracts of VIIIth Meeting of the Intern. Soc. Neurochem., 1981, 18—19.
6. Matthieu J. M., Koelreutter B., Joyet M. L.: Changes in CNS myelin proteins and glycoproteins after *in situ* autolysis. *Brain Res. Bull.*, 1977, 2, 15—21.
7. Novikoff A. B.: DAB cytochemistry: artifacts problem in its current uses. *J. Histochem. Cytochem.*, 1980, 28, 1036—1038.
8. Sternberger L. A.: The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. [In:] *Immunocytochemistry*. Eds. S. Cohen, R. T. McCluskey. Wiley, New York 1979, 104—169.
9. Sternberger N. H., Itoyama Y., Kies M. W., Webster H. de F.: Immunocytochemical method to identify basic protein in myelin-forming oligodendrocytes of newborn rat C.N.S. *J. Neuropathol.*, 1978, 7, 251—263.
10. Sternberger N. H., Quarles R. H., Itoyama Y., Webster H. de F.: Myelin associated glycoprotein demonstrated immunocytochemically in myelin and myelin-forming cells of developing rats. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1979, 76, 1510—1514.
11. Ulrich J., Heitz Ph. U.: Immunocytochemistry of leukodystrophies. Abstracts of IXth Intern. Congr. Neuropathol., Vienna 1982, 102—102.
12. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Goncerzewicz A.: Myelin lipids in Wallerian degeneration of the rabbit optic nerve. *Exp. Pathol.*, 1979, 17, 334—339.
13. Wender M., Wajgt A., Tokarz E.: Metabolism of the myelin-associated glycoprotein (MAG) in Wallerian degeneration of the optic nerve. Abstracts of IXth Intern. Congr. Neuropathol., Vienna 1982, 17.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, 49, Przybyszewskiego Str., 60-355 Poznań

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ

EFFECT OF A FATTY ACID ENRICHED DIET ON MYELIN
LIPIDS OF THE DEVELOPING RAT BRAIN *

Department of Neurology, School of Medicine, Poznań

The myelin sheath of the nervous tissue is a structure that is highly sensitive to various exogenous factors acting during the ontogenetic development. Alimentary deficiencies constituting one of such factors (Smith, Benjamins 1977). Feeding of an abnormal composition of the diet or a generally deficient one during early stages of myelinogenesis results in both qualitative and quantitative changes in the myelin (Dobbing 1968). Alterations in the lipid content, mainly the lack of essential fatty acids of the linoleic and linolenic family caused not only a delayed maturation of the brain but also irreversible changes in various cerebral structures (White et al. 1971; Wiggins et al. 1976). In our own publications (Wender et al. 1982, 1983) we have presented the effects of a fatty acid deficient diet on cerebral lipids and on the fatty acid composition of myelin lipids. In the herewith presented study we are dealing with a reverse situation i.e. with the effect of a fat enriched diet fed to rats during their ontogenic development on cerebral myelin lipids. To our knowledge this very problem has not been investigated so far.

MATERIAL AND METHODS

Wistar rats served as the experimental animals. Pregnant rats were divided into two groups, the experimental group being fed with a diet containing 15% of rape seed oil and the control one with a diet containing only 2% of rape seed oil as the only fat component. The composition of both diets is shown in table 1.

The artificial diet was fed to the pregnant mothers, starting 6 days before the expected delivery, to the feeding mothers and to their progeny throughout the whole postnatal period under investigation. Both the so composed food and water were available *ad libitum*.

* The investigations were supported by Research Agreement No. 10.4.06.3.2.

The experimental animals were killed at the age of 21, 30 and 60 days postnatal. Each age group of animals, both of control and experimental ones, was made up of 6 rats of either sex.

Biochemical methods. The myelin fraction was isolated according to the method of Norton and Poduslo (1973). The brain homogenates were layered on top of a discontinuous sucrose gradient (0.32 M and 0.85 M, p H 7.0) and centrifuged in horizontal rotor. The crude myelin fraction was then dispersed in distilled water and sedimented at 70 000 g for 20 min. The washing procedure was repeated 3 times.

The myelin lipids were extracted according to the method of Folch-Pi et al. (1957) and the extracted total lipids were then separated by means of column and thin-layer chromatography (TLC). Cerebrosides, sulfatides and cholesterol were separated according to the method of Svennerholm (1964). Quantitation of cholesterol from TLC plates was accomplished with the method of Sperry and Webb (1950), and the content of cerebrosides and sulfatides by means of the method described by Radin et al. (1955). Phospholipids were separated by means of bidimensional TLC according to Singh et al. (1971), and quantitated on the basis of the phosphorus content of the individual phospholipid fractions, that was determined according to the method of Bartlett (1958).

The obtained results were evaluated statistically by means of the Student's "t" test.

Table 1. Composition of diets

Tabela 1. Skład diet

| | Control Kontrolna | Experimental Doświadczalna |
|---|----------------------|-------------------------------|
| Sucrose Sacharoza | 20% | 20% |
| Wheat flower Mąka pszenna | 58% | 40% |
| Caseine Kazeina | 10% | 15% |
| Rape seed oil Olej rzepakowy | 2% | 15% |
| Potato starch Mączka kartoflana | 4% | 4% |
| Sodium chloride Chlorek sodu | 2% | 2% |
| Choline chloride Chlorek choliny | 1% | 1% |
| Vitamins (Biovit) Witaminy (preparat Biovit) | 3% | 3% |

RESULTS

On comparison of results obtained in the control and experimental groups it appeared that animals maintained on a lipid enriched diet over a period ranging from the last week of intrauterine life till sacrifice develop a myelin differing only slightly with respect to its lipid composition from the myelin obtained from control animals. In the developmental period at which the most intense myelination take place (21 day postnatal) the myelin fraction was appreciably enriched in cholesterol and plasmalogen, yet the content of cholesteryl esters as well as that of lysophosphatidylcholine was only one half that of the control myelin. The myelin fraction obtained from the experimental group of rats and investigated after completion of the active phase of myelinogenesis showed elevated contents of several lipid species cholesteryl esters, sulfatides, phosphatidylserine plus phosphatidylinositide, phosphatidylethanolamine and plasmalogens). These results are presented in table 2.

Table 3 presents results of the myelin lipid composition that is expressed in percentages of the individual lipid species constituting myelin lipids. It appears that similarly as when expressed in absolute values, feeding of a high fat diet did not influence appreciably the percent lipid composition of central myelin. In the youngest group of rats (21 day old) significant differences between the control and experimental group were seen only in the percent content of cholesterol and plasmalogens (increase) as well as in cholesteryl esters and lysophosphatidylcholine (decrease).

In the next group of 30 day animals cerebrosides showed decreased percentages, whereas phosphatidylcholine a comparable increase of the percent contributions. The myelin fraction of rats fed the lipid rich diet till the age of 60 days was enriched in cholesteryl esters, sulfatides, des, phosphatidylserine plus phosphatidylinositide and plasmalogens, but showed decreased percentages of lysophosphatidylcholine.

DISCUSSION

In the presented study we are dealing with a qualitatively abnormal alimentary model, in which the experimental animals were maintained on a diet with an undue, high proportion of rape seed oil fats that lead to a substantial increase of fatty acid supply. The experimental diet was fed over a period ranging from the last week of intrauterine life till the death of the animal.

In spite of the undue load of ingested fat the myelin fraction was only slightly affected in its lipid composition. In the early period of myelinogenesis occurring under conditions of the high fat intake the myelin fraction appeared enriched in total lipids in about 20%, the two main myelin lipid constituents i.e. cholesterol and plasmalogens showing

Tabl. 2. Composition of cerebral myelin lipids from rats maintained on a fat enriched diet (results expressed in mg/g of myelin wet weight)

Tabela 2. Skład lipidów mózgowej mieliny u szczurów rozwijających się na diecie wzbogaconej w lipidy (w mg/g świeżej mieliny)

| | 21 day rats | | 30 day rats | | 60 day rats | |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Zwierzęta 21 dniowe | | Zwierzęta 30 dniowe | | Zwierzęta 60 dniowe | |
| | Control diet | Experimental diet | Control diet | Experimental diet | Control diet | Experimental diet |
| | Dieta kontrolna | Dieta doświadczalna | Dieta kontrolna | Dieta doświadczalna | Dieta kontrolna | Dieta doświadczalna |
| Cholesterol | 7.3 ± 0.41 | 11.9 ± 0.61 | 16.2 ± 1.45 | 16.8 ± 1.11 | 13.8 ± 0.94 | 17.4 ± 1.38 |
| Cholesteryl esters | 0.6 ± 0.05 | 0.3 ± 0.04 | 0.3 ± 0.05 | 0.3 ± 0.04 | 0.1 ± 0.06 | 0.4 ± 0.08 |
| Estry cholesterolu | | | | | | |
| Total galactolipids | 11.7 ± 1.02 | 13.9 ± 0.37 | 21.8 ± 0.50 | 20.6 ± 0.88 | 12.6 ± 0.69 | 16.8 ± 0.95 |
| Całkowite galaktolipidy | | | | | | |
| Cerebrosides | 8.6 ± 0.81 | 10.2 ± 0.45 | 16.9 ± 0.47 | 15.9 ± 0.39 | 10.1 ± 0.57 | 12.8 ± 0.43 |
| Cerebrozydy | | | | | | |
| Sulfatides | 3.1 ± 0.40 | 3.7 ± 0.40 | 4.9 ± 0.19 | 4.8 ± 0.75 | 2.5 ± 0.37 | 4.0 ± 0.54 |
| Sulfatydy | | | | | | |

| | | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Total phospholipids Całkowite fosfolipidy | 18.0±0.97 | 22.2±0.98 | 25.8±0.80 | 28.8±0.73 | 22.6±0.93 | 33.9±0.96 |
| Sphingomyelins Sfingomielin | 1.6±0.19 | 1.5±0.19 | 2.0±0.15 | 1.9±0.15 | 2.3±0.09 | 2.9±0.62 |
| Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina | 6.1±0.44 | 7.8±0.97 | 7.5±0.44 | 9.4±0.63 | 6.2±0.49 | 8.4±0.76 |
| Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina | 1.3±0.15 | 0.7±0.08 | 1.2±0.15 | 1.1±0.14 | 2.1±0.25 | 2.1±0.38 |
| Phosphatidylserine + Phosphatidylinositide Fosfatydyloseryna + Fosfatydyloinozytol | 1.4±0.29 | 1.4±0.24 | 2.5±0.28 | 3.1±0.19 | 2.1±0.23 | 4.6±0.36 |
| Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina | 2.9±0.37 | 3.9±0.43 | 4.2±0.32 | 4.5±0.41 | 2.5±0.16 | 5.2±0.78 |
| Plasmalogens Plazmalogeny | 3.7±0.37 | 5.8±0.75 | 7.7±0.39 | 7.9±0.46 | 5.4±0.31 | 8.6±0.76 |

Number of animals in each groupie — 6
Liczba zwierząt w każdej grupie — 6

Mean ± S.E.
Średnia ± S.E.

Significant differences underlined
Różnice statystycznie istotne pogrubiono

Table 3. Composition of the cerebral myelin fraction from rats maintained on a fat enriched diet (in % of total lipids)
 Tabela 3. Skład lipidów mózgowej mieliny u szczurów rozwijających się na diecie wzbogaconej w lipidy (w % całkowitych lipidów)

| | 21 day rats Zwierzęta 21 dniowe | | 30 day rats Zwierzęta 30 dniowe | | 60 day rats Zwierzęta 60 dniowe | |
|--|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|------------------------------------|---------------------|
| | Control diet | Experimental diet | Control diet | Experimental diet | Control diet | Experimental diet |
| | Dieta kontrolna | Dieta doświadczalna | Dieta kontrolna | Dieta doświadczalna | Dieta kontrolna | Dieta doświadczalna |
| Cholesterol | 21.5±1.4 | 26.0±1.3 | 28.3±2.4 | 26.3±1.7 | 24.4±2.3 | 24.8±1.4 |
| Cholesterol esters Estry cholesterolu | 1.8±0.3 | 0.5±0.1 | 0.4±0.1 | 0.5±0.1 | 0.3±0.04 | 0.5±0.05 |
| Total galactolipids Całkowite galaktolipidy | 31.9±1.6 | 30.4±1.5 | 33.7±2.1 | 29.0±1.7 | 25.3±1.0 | 25.5±2.4 |
| Cerebrosides Cerebrozydy | 23.0±1.0 | 21.9±1.7 | 26.6±2.1 | 21.7±1.9 | 21.2±1.3 | 19.2±1.9 |
| Sulfatides Sulfatydy | 8.8±0.9 | 8.6±1.0 | 7.1±0.8 | 7.3±0.5 | 4.0±1.0 | 7.0±0.9 |
| Total phospholipids Całkowite fosfolipidy | 44.8±2.1 | 43.0±1.7 | 37.6±0.8 | 42.2±1.5 | 50.0±1.7 | 49.4±1.5 |

| | | | | | | |
|--|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Sphingomyelins Sfingomielin | 4.0±0.6 | 2.7±1.0 | 2.8±0.2 | 3.0±0.3 | 5.1±0.2 | 4.2±0.4 |
| Phosphatidylcholine Fosfatydylocholina | 15.3±1.4 | 15.0±0.8 | 10.8±0.7 | 14.5±0.8 | 14.0±1.1 | 11.9±1.2 |
| Lysophosphatidylcholine Lizofosfatydylocholina | 3.2±0.2 | 1.4±0.1 | 1.7±0.2 | 1.8±0.1 | 4.6±0.5 | 3.0±0.3 |
| Phosphatidylserine + Phosphatidylositide | 3.2±0.4 | 2.8±0.2 | 3.6±0.4 | 4.8±0.3 | 4.6±0.3 | 6.4±0.7 |
| Fosfatydyloseryna + Fosfatydyloinozytol | | | | | | |
| Phosphatidylethanolamine Fosfatydyloetanolamina | 7.5±1.1 | 7.6±0.4 | 6.3±0.3 | 6.4±0.4 | 5.6±0.2 | 6.2±0.9 |
| Plasmalogens Plazmalogeny | 9.0±0.6 | 11.3±0.6 | 11.2±0.5 | 12.3±0.5 | 11.0±0.5 | 13.3±1.0 |
| Unidentified Niezidentyfikowane | 2.7±0.5 | 2.2±0.3 | 1.2±0.3 | 1.4±0.1 | 5.2±0.6 | 3.5±0.8 |

Number of animals in each group — 6
Liczba zwierząt w każdej grupie — 6

Mean ± S.E.
Średnia ± S.E.

Significant differences underlined
Różnice statystycznie istotne podkreślono

significant increases. The galactolipid content remained unaffected by the applied dietary regime, although the developmental increase of that lipid fraction is reckoned as the basic chemical exponent of progressing myelinogenesis (Cuzner, Davison 1968; Norton, Poduslo 1973; Adamczewska 1978). Hence, we should assume that an increased supply of fatty acids in the diet does not enhance the process of chemical maturation of the lipid portion of the myelin sheath.

In adult animals, i.e. after completion of the active phase of myelinogenesis the content of total lipids was about 30% higher than controls. The total galactolipids, sulfatides as well as some phospholipids demonstrating significantly elevated contents in comparison to the control, age matched myelin fraction.

The results thus have shown that the overdue chronic intake of fat brings about an overroll (20—30%) overloading of the myelin membrane by its lipid components, the contribution of individual classes being age dependent.

However, since the myelin lipid spectrum (tab. 3) i.e. the proportions of the individual lipids constituting the myelin membrane showed only minor negligible changes we are not entitled to resume that chronic ingestion of a fat enriched diet over the whole ontogenic developmental period leads to formation of a chronically aberrant myelin.

Our earlier study (Wender et al. 1982, 1983) has shown that a fatty acid deficiency happened to affect the developing myelin membrane of the rat severely, causing a drastic reduction of the content of all basic myelin lipids. On comparison of the herewith presented results with those mentioned last (Wender et al. 1982, 1983) it could appear that a proper development of a highly specialized structure such as the myelin membrane, is very sensitive to changes in the dietary fatty acid supply when occurring during the development of the brain. However, it appears that only a fatty acid deficient diet leads to the formation of a chemically aberrant myelin.

CONCLUSIONS

1. Rats maintained during their ontogenic development on a fat enriched diet develop a myelin membrane that is slightly overloaded with lipid components.
2. During the early stage of myelinogenesis the overmaturation with lipids amounts to about 20%, with cholesterol and plasmalogens showing significantly increased contents.
3. The myelin fraction obtained from adult rats is still overloaded with lipids, the overload amounting to 30%, with sulfatides, plasmalogens, inositide, serine, and ethanalamine phosphatides showing significantly increased concentrations.

4. The lipid spectrum of the lipid enriched myelin, i.e. the proportions of individual lipids furnishing the myelin membrane remains essentially unaltered, hence feeding of a fat supplemented diet does not result in formation of a chemically aberrant myelin membrane.

5. Comparison with results obtained in rats maintained on a fat deficient diet indicates that the process of myelinogenesis is sensitive to both an overdue and undue supply of fatty acids in the diet but fatty acid deficiency only to formation of a chemically aberrant myelin membrane.

WPLYW DIETY WZBOGACONEJ W KWASY TŁUSZCZOWE NA LIPIDY MIELINY ROZWIJAJĄCEGO SIĘ MÓZGU SZCZURA

Streszczenie

Badano obraz lipidów mieliny szczurów utrzymywanych na diecie wzbogaconej w kwasy tłuszczowe w końcowym okresie życia płodowego oraz podczas całego życia pozapłodowego. Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków: szczury utrzymywane w czasie rozwoju ontogenetycznego na diecie wzbogaconej w kwasy tłuszczowe, we wczesnym okresie mielinogenezy wytwarzają mielinę lekko przeładowaną w składniki lipidowe, szczególnie w cholesterol i plazmalogeny. Przeładowanie lipidami osłonki mielinowej utrzymuje się również u zwierząt dojrzałych, ponieważ jednak proporcje poszczególnych składników mieliny nie są zmienione w sposób istotny, nie można przyjąć, że dieta wzbogacona w tłuszcze prowadzi do wytwarzania chemicznie nieprawidłowej błony mielinowej.

Porównanie uzyskanych wyników z badaniami wpływu diety beztłuszczowej wskazuje, że proces mielinogenezy jest wrażliwy zarówno na nadmiar, jak i na niedobór kwasów tłuszczowych w diecie, ale jedynie dieta niedoborowa prowadzi do wytwarzania chemicznie nieprawidłowej mieliny.

ВЛИЯНИЕ ДИЕТЫ ОБОГАЩЕННОЙ ЖИРНЫМИ КИСЛОТАМИ НА ЛИПИДЫ МИЕЛИНА РАЗВИВАЮЩЕГОСЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ

Резюме

Авторы исследовали картину липидов миеллина крыс кормленных диетой обогащенной жирными кислотами в конечном периоде эмбриональной жизни и во время всей внеэмбриональной жизни. Результаты исследований привели к следующим выводам: крысы кормленные во время онтогенетического развития диетой обогащенной жирными кислотами в раннем периоде миелиногенеза образуют миелин легко перегруженный липидными элементами, особенно холестерином и плазмалогенами. Перегрузка липидами миелиновой оболочки удерживается также у зрелых животных, но так как пропорции отдельных составных частей миеллина не изменены существенно, нельзя принять, что диета обогащенная жирами ведет к образованию неправильной в химическом отношении миелиновой оболочки.

Сопоставление полученных результатов с исследованиями влияния безжировой диеты указывает, что процесс миелиногенеза чувствителен как к избытку, так и к недостатку жирных кислот. Только низкокачественная диета ведет к образованию химически неправильного миеллина.

REFERENCES

1. Adamczewska Z.: Myelin lipids in the developing rat brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 11—23.
2. Bartlett G.: Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 466—468.
3. Cuzner M., Davison A.: The lipid composition of rat myelin and subcellular fraction during development. *Biochem. J.*, 1968, 106, 29—34.
4. Dobbing J.: Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system. [In:] *Malnutrition, learning and behaviour*. Eds. N. Serimshow, J. Gordon. MIT Press, Cambridge, Mass., 1968, 181—202.
5. Folch-Pi J., Lees J., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, 226, 497—511.
6. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—757.
7. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 759—773.
8. Radin N., Lavin F., Brown J.: Determination of cerebrosides. *J. Biol. Chem.*, 1955, 217, 789—796.
9. Singh H., Spritz M., Geyer B.: Studies of brain myelin in the "quaking mouse". *J. Lipid Res.*, 1971, 12, 473—483.
10. Smith H., Benjamins J.: Model system for study of perturbation of myelin metabolism. [In:] *Myelin*. Ed. P. Morell, Plenum Press, New York 1977, 447—488.
11. Sperry W., Webb M.: A revision of the Schoenheimer-Sperry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.*, 1950, 187, 97—106.
12. Svennerholm L.: The distribution of lipids in the human nervous system. *J. Neurochem.*, 1964, 11, 839—859.
13. White H. Jr., Galli C., Paoletti R.: Brain recovery from essential fatty acid deficiency in developing rats. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 869—882.
14. Wiggins R., Miller J., Benjamins J., Krigman M., Morell P.: Myelin synthesis during postnatal nutritional deprivation. *Brain Res.*, 1976, 107, 257—264.
15. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Żórawski A., Goncerzewicz A.: The effect of improper diet on the proces of myelination. II. *Inter. Symp. on Myelination and Demyelination, Varna, 1982. Abstracts* 10—11.
16. Wender M., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acids deficient diet on myelin lipids of the rat brain. *Neuropat. Pol.* 1983, 21, 35—43.

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

MIECZYŚLAW WENDER, ZOFIA ADAMCZEWSKA-GONCERZEWICZ, ANDRZEJ ŻÓRAWSKI

FATTY ACID COMPOSITION OF MYELIN LIPIDS IN DEVELOPING RATS KEPT ON A FAT DEFICIENT DIET *

Department of Neurology, Academy of Medicine, Poznań

Myelination of nerve fibers, one of the basic developmental event in the central and peripheral nervous system is a process which is strictly determined by the genome of cells generating the myelin sheath. However, in spite of this genetical determination, the process of myelino-genesis may be seriously affected by external factors, such as a quantitatively or qualitatively deficient diet. For a recent review of this subject the readers are referred to Smith and Benjamins (1977).

From our own observations made in an earlier study, it appeared that the maintenance of pregnant rats and of their offsprings on a lipid deprived diet results in a reduction of all basic myelin lipids, the deficit growing continuously with advancing postnatal age (Wender et al. 1983). In the herewith presented paper we are dealing with the effects of feeding a fat deficient diet on the fatty acid spectrum of myelin lipids. We were interested in the effects brought about by a long lasting fat deficiency ranging from the late stage of intrauterine life throughout the whole postnatal development till maturity. It was our aim to find out, whether under these experimental conditions the animals will develop some adaptative processes that would be able to normalize the fatty acid spectrum of myelin lipids, or whether the chemical aberration would persist.

MATERIAL AND METHODS

Wistar rats served as the experimental animals. The pregnant animals were divided into two groups, one the experimental groups was fed with an artificially composed diet containing 0.2% rape seed oil, and the other one, serving as the control group was fed with the same diet supplemented with 2% rape seed oil. The formula of the experimental diets is presented in table 1, and the mean percent composition of fatty

* Supported by the Research Grant 10.4.06.3.2. of Polish Academy of Sciences.

methyl esters of fatty acids were extracted with hexane and the extracts processed further as described by Kishimoto and Radin (1965). The fatty acyl methyl esters thus obtained were separated by means of gas-liquid chromatography on the Pye 104 gas chromatograph equipped with a flame ionizing detector. The column were packed with 15% diethylene-glycol-succinate (DEGS) adsorbed on gas-chrom G 100/120 mesh. Column temperature 280°C with Argon as the carrier gas. Gas flow 30 ml/min.

Table 2. Fatty acid composition of rape seed oil (in rel. %)

Tabela 2. Skład procentowy kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego

| | |
|------------------------------------|------|
| 16 : 0 | 2.5 |
| 16 : 1 | 0.1 |
| 18 : 0 | 0.6 |
| 18 : 1 | 10.8 |
| 18 : 2 | 12.3 |
| 18 : 3 | 7.2 |
| 20 : 0 | 0.2 |
| 20 : 1 | 6.2 |
| 20 : 2 | 0.5 |
| 22 : 0 | 0.3 |
| 22 : 1 | 57.9 |
| unidentified niezidentyfikowane | 1.4 |

The fatty acids were identified by comparison of the respective peaks of experimental chromatograms with those corresponding to a mixture of standard fatty acyl methyl esters (Applied Sciences Laboratory). The chromatograms were quantitated by computing the areas of the respective peaks from the retention times and heights of these peaks. The results were expressed in relative percentages.

Histological techniques. Celloidine embedded sections were stained using the methods of Woelcke, Nissl, H-E and those embedded in paraffin, with the methods of Kanzler, Nissl and Klüver-Barrera.

RESULTS

The comparison of results obtained in the control and in the experimental groups has shown that animals maintained on a fat deficient diet over a period ranging from the last week of intrauterine life till their sacrifice develop a myelin significantly altered in the fatty acids composition of the main lipid constituents.

All phospholipid fractions (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, sphingomyelin and plasmalogen) as well as both glycolipids (cerebrosides and sulfatides) demonstrated a marked decrease of the

Table 3. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in phosphatidylcholine of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 3. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych fosfatydylocholinoi mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days — dni | | 90 days — dni | | 180 days — dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 1.0±0.1 | 0.4±0.1 | 0.7±0.1 | 0.6±0.1 | 0.4±0.04 | 1.1±0.2 |
| 16 : 0 | 17.0±1.5 | 13.7±2.6 | 27.7±2.1 | 9.7±1.6 | 20.8±1.1 | 25.8±1.6 |
| 16 : 1 | 3.3±0.6 | 1.4±0.5 | 2.1±0.1 | 1.4±0.5 | 1.7±0.1 | 2.2±0.2 |
| 17 : 0 | 0.6±0.1 | 0.4±0.1 | 0.3±0.03 | 1.3±0.7 | 0.5±0.03 | 0.4±0.03 |
| 18 : 0 | 19.4±1.8 | 9.9±2.6 | 21.2±1.3 | 6.4±1.5 | 33.1±3.9 | 21.5±0.6 |
| 18 : 1 | 12.8±1.6 | 35.8±5.0 | 22.1±1.3 | 27.3±7.2 | 15.0±1.9 | 35.9±1.2 |
| 18 : 2 | 2.6±0.3 | 7.3±1.1 | 1.1±0.2 | 9.2±1.4 | 0.4±0.1 | 0.8±0.1 |
| 18 : 3 | 0.3±0.1 | 1.8±0.7 | 1.2±0.4 | 0.3±0.1 | 0.0 | 0.3±0.04 |
| 20 : 0 | 2.2±0.5 | 0.6±0.1 | 1.4±0.2 | 7.6±1.8 | 1.0±0.1 | 0.6±0.04 |
| 20 : 1 | 0.6±0.1 | 5.4±2.1 | 0.4±0.1 | 0.7±0.2 | 0.6±0.2 | 2.0±0.9 |
| 20 : 2 | 4.9±0.9 | 2.6±1.0 | 1.3±0.7 | 5.3±1.7 | 5.9±1.6 | 0.1±0.1 |
| 20 : 3 | 2.3±0.4 | 3.9±0.6 | 1.2±0.4 | 5.7±1.5 | 0.2±0.1 | 1.5±0.2 |
| 20 : 4 | 1.8±0.8 | 2.8±1.1 | 0.6±0.1 | 5.2±2.6 | 1.5±0.2 | 1.4±0.1 |
| 20 : 5 | 7.3±0.8 | 3.5±0.6 | 3.8±1.4 | 4.0±2.1 | 0.8±0.2 | 0.7±0.03 |
| 24 : 0 | 9.0±1.8 | 4.6±1.3 | 8.6±0.3 | 8.1±2.3 | 10.5±3.8 | 1.2±0.1 |
| 24 : 1 | 3.5±0.8 | 0.9±0.4 | 1.7±0.3 | 0.3±0.01 | 0.9±0.2 | 1.6±0.1 |
| Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe | 49.2±3.0 | 29.6±2.8 | 59.9±2.6 | 37.7±3.0 | 66.3±3.0 | 50.6±3.6 |
| Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe | 39.4±2.4 | 65.4±4.1 | 38.5±2.2 | 59.4±2.7 | 27.0±1.6 | 46.6±2.1 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 11.4±1.2 | 5.0±0.7 | 1.6±0.1 | 6.9±0.6 | 6.7±1.1 | 2.9±0.3 |

<http://rcin.org.pl>

Number of animals in each group: 6

Mean ± S.E.

Significant differences underlined

Table 4. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in phosphatidylethanolamine of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 4. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych fosfatydyloctanoaminy mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days — dni | | 90 days — dni | | 180 days — dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 0.8±0.1 | 1.1±0.2 | 1.6±0.2 | 0.9±0.1 | 0.5±0.03 | 1.4±0.2 |
| 16 : 0 | 19.4±1.4 | 7.6±0.8 | 18.1±2.4 | 9.6±0.8 | 17.0±0.6 | 16.7±2.0 |
| 16 : 1 | 1.5±0.1 | 1.1±0.2 | 3.4±0.4 | 1.4±0.4 | 1.1±0.2 | 3.1±0.2 |
| 17 : 0 | 0.4±0.03 | 2.7±0.6 | 0.4±0.1 | 1.1±0.3 | 0.6±0.1 | 0.5±0.04 |
| 18 : 0 | 12.7±1.9 | 16.2±1.8 | 21.1±3.0 | 12.4±1.4 | 29.6±2.9 | 29.9±1.7 |
| 18 : 1 | 13.6±0.5 | 19.1±1.8 | 19.4±2.5 | 16.5±1.6 | 18.8±1.2 | 23.3±0.9 |
| 18 : 2 | 1.1±0.2 | 6.3±0.6 | 2.6±0.6 | 8.1±1.1 | 0.6±0.1 | 0.7±0.1 |
| 18 : 3 | 0.3±0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.5±0.1 | 0.4±0.2 | 0.5±0.1 |
| 20 : 0 | 2.5±0.1 | 6.0±0.6 | 3.0±0.7 | 1.9±0.1 | 1.0±0.2 | 0.7±0.1 |
| 20 : 1 | 0.3±0.1 | 2.3±0.3 | 1.2±0.1 | 1.3±0.1 | 0.6±0.2 | 2.5±0.3 |
| 20 : 2 | 0.3±0.1 | 0.1±0.04 | 0.2±0.1 | 0.9±0.1 | 0.0 | 0.7±0.2 |
| 20 : 3 | 3.9±0.6 | 5.1±0.9 | 0.8±0.4 | 5.4±0.6 | 0.3±0.1 | 6.9±0.4 |
| 20 : 4 | 2.9±0.3 | 2.1±0.2 | 0.0 | 13.4±0.7 | 1.1±0.3 | 1.2±0.1 |
| 20 : 5 | 7.9±0.6 | 4.4±0.2 | 10.2±0.5 | 3.4±0.3 | 2.1±0.8 | 1.9±0.5 |
| 24 : 0 | 0.0 | 1.3±0.2 | 1.3±0.6 | 7.3±1.0 | 5.5±0.3 | 1.2±0.2 |
| 24 : 1 | 12.2±1.0 | 0.0±2.6 | 5.6±0.8 | 8.9±0.9 | 0.6±0.2 | 1.1±0.1 |
| Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe | 35.8±1.7 | 34.9±2.3 | 45.5±3.0 | 33.2±1.6 | 54.2±3.7 | 50.4±2.5 |
| Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe | 44.0±2.0 | 40.5±1.9 | 43.4±2.8 | 59.8±2.5 | 25.6±0.8 | 41.9±2.1 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 20.2±3.6 | 24.6±3.2 | 11.1±2.7 | 7.0±1.3 | 20.2±5.0 | 7.7±1.3 |

Number of animals in each group: 6 Mean ± S.E. Significant differences underlined
 Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Średnie ± S.E. Istotne różnice pogrubiono

Table 5. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in sphingomyelins of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)
 Tabela 5. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych sfingomielin mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days — dni | | 90 days — dni | | 180 days — dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 1.3±0.3 | 0.9±0.4 | 2.1±0.3 | 0.3±0.1 | 1.1±0.3 | 3.8±0.6 |
| 16 : 0 | 15.8±1.5 | 5.5±1.0 | 20.4±1.9 | 2.5±0.2 | 15.7±1.3 | 13.4±0.8 |
| 16 : 1 | 1.0±0.2 | 0.9±0.3 | 4.0±0.4 | 0.1±0.02 | 3.1±0.4 | 6.6±0.5 |
| 17 : 0 | 0.0 | 0.9±0.6 | 0.5±0.1 | 1.9±0.4 | 1.1±0.1 | 1.5±0.1 |
| 18 : 0 | 23.2±1.5 | 2.8±0.7 | 18.8±0.8 | 2.4±0.7 | 20.3±4.6 | 17.9±1.2 |
| 18 : 1 | 25.0±0.8 | 28.4±4.0 | 20.0±3.2 | 8.0±1.0 | 21.0±1.0 | 18.6±1.2 |
| 18 : 2 | 1.4±0.1 | 13.2±1.1 | 3.2±0.4 | 12.5±1.2 | 1.1±0.2 | 1.9±0.2 |
| 18 : 3 | 0.3±0.1 | 0.3±0.1 | 2.3±0.6 | 0.5±0.1 | 0.2±0.1 | 1.0±0.1 |
| 20 : 0 | 5.5±0.3 | 1.3±0.3 | 2.1±0.5 | 0.3±0.1 | 3.4±0.5 | 1.5±0.2 |
| 20 : 1 | 0.3±0.1 | 3.6±0.7 | 0.2±0.01 | 4.9±0.7 | 0.2±0.1 | 0.9±0.1 |
| 20 : 2 | 0.0 | 2.0±0.3 | 0.0 | 0.4±0.1 | 2.3±0.4 | 0.1±0.1 |
| 20 : 3 | 0.3±0.8 | 2.0±0.4 | 0.9±0.1 | 4.3±0.4 | 1.1±0.3 | 3.8±0.5 |
| 20 : 4 | 0.3±0.2 | 4.3±0.3 | 0.9±0.1 | 9.3±1.3 | 2.9±0.3 | 4.6±0.1 |
| 20 : 5 | 6.7±0.9 | 9.7±1.3 | 8.1±1.4 | 12.7±2.2 | 3.3±1.1 | 3.0±0.2 |
| 24 : 0 | 0.0 | 0.0 | 1.2±0.2 | 0.0 | 1.6±0.5 | 4.8±0.6 |
| 24 : 1 | 4.7±0.8 | 5.4±1.1 | 6.3±1.2 | 1.6±0.3 | 2.6±0.5 | 5.8±0.4 |
| Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe | 45.8±3.7 | 11.4±1.2 | 45.1±2.4 | 7.4±1.0 | 43.2±3.8 | 42.9±3.1 |
| Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe | 40.0±3.2 | 69.8±3.8 | 45.9±2.6 | 54.3±4.8 | 45.8±1.9 | 46.3±2.1 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 14.2±1.6 | 18.8±3.2 | 9.0±3.0 | 38.3±6.4 | 11.0±4.1 | 10.8±0.9 |

<http://rcin.org.pl>

Number of animals in each group: 6 Mean ± S.E. Significant differences underlined
 Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Średnie ± S.E. Istotne różnice pogrubiono

Table 6. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in plasmalogens of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)

Tabela 6. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych plazmalogenów mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days — dni | | 90 days — dni | | 180 days — dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 0.8±0.1 | 0.6±0.2 | 0.8±0.1 | 1.8±0.4 | 0.7±0.1 | 0.5±0.2 |
| 16 : 0 | 18.1±1.1 | 5.2±0.6 | 17.6±0.6 | 14.8±0.4 | 19.2±4.0 | 5.2±1.0 |
| 16 : 1 | 3.1±0.4 | 0.8±0.2 | 2.3±0.4 | 3.4±0.4 | 1.2±0.2 | 1.7±0.3 |
| 17 : 0 | 0.7±0.1 | 1.5±0.1 | 0.2±0.1 | 0.5±0.1 | 0.6±0.1 | 0.5±0.1 |
| 18 : 0 | 15.6±2.4 | 3.3±0.5 | 14.0±0.5 | 8.3±1.0 | 20.2±3.6 | 4.3±0.6 |
| 18 : 1 | 15.0±0.8 | 39.0±1.9 | 23.5±2.8 | 36.5±1.9 | 15.8±1.1 | 42.2±3.0 |
| 18 : 2 | 2.3±0.3 | 8.6±0.9 | 2.8±0.3 | 3.7±0.3 | 0.5±0.1 | 0.4±0.1 |
| 18 : 3 | 0.5±0.3 | 1.1±0.5 | 0.0 | 0.1±0.05 | 0.1±0.04 | 0.5±0.2 |
| 20 : 0 | 2.4±0.3 | 3.2±0.3 | 2.6±0.7 | 1.1±0.2 | 0.9±0.2 | 0.9±0.2 |
| 20 : 1 | 2.8±0.7 | 6.4±0.5 | 6.4±1.7 | 6.7±0.6 | 5.1±1.0 | 12.8±0.7 |
| 20 : 2 | 8.2±0.6 | 0.6±0.1 | 5.0±0.8 | 0.7±0.2 | 10.9±1.2 | 0.3±0.04 |
| 20 : 3 | 4.0±0.6 | 2.1±0.5 | 0.3±0.3 | 3.8±0.4 | 0.3±0.1 | 3.9±0.8 |
| 20 : 4 | 1.9±0.4 | 4.5±0.4 | 0.7±0.5 | 4.8±0.5 | 0.9±0.1 | 7.8±0.8 |
| 20 : 5 | 4.3±0.8 | 2.0±0.4 | 1.9±1.6 | 2.1±0.4 | 3.0±0.5 | 1.3±0.1 |
| 24 : 0 | 7.1±0.8 | 2.3±0.2 | 5.8±0.3 | 1.4±0.2 | 9.1±1.8 | 3.7±0.3 |
| 24 : 1 | 1.7±0.6 | 1.4±0.4 | 2.5±2.0 | 3.3±0.4 | 0.2±0.1 | 6.5±0.7 |
| Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe | 44.7±3.1 | 16.1±0.9 | 41.0±2.3 | 27.9±2.1 | 50.7±2.9 | 15.1±1.2 |
| Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe | 43.8±2.6 | 66.5±4.1 | 45.4±2.9 | 65.1±3.7 | 38.0±1.2 | 77.4±4.3 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 11.5±2.0 | 17.4±2.2 | 13.6±3.0 | 7.0±1.7 | 11.3±4.3 | 7.5±1.7 |

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnie ± S.E.

Significant differences underlined

Istotne różnice pogrubiono

Table 7. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in cerebrosides of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)
 Tabela 7. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych cerebrozydów mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days — dni | | 90 days — dni | | 180 days — dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 5.2±0.7 | 0.4±0.1 | 2.3±0.5 | 2.0±0.4 | 1.7±0.2 | 2.5±0.2 |
| 16 : 0 | 35.1±1.1 | 22.6±0.6 | 27.6±2.1 | 19.9±2.9 | 25.8±2.5 | 22.9±1.6 |
| 16 : 1 | 3.4±0.3 | 0.4±0.1 | 4.8±1.0 | 2.2±0.5 | 3.6±0.4 | 2.1±0.3 |
| 17 : 0 | 1.4±0.1 | 1.1±0.4 | 0.8±0.1 | 0.7±0.1 | 1.5±1.3 | 0.6±0.1 |
| 18 : 0 | 20.3±1.1 | 11.3±0.4 | 21.2±2.8 | 11.2±0.8 | 13.0±1.2 | 13.1±1.1 |
| 18 : 1 | 13.7±0.9 | 5.8±0.6 | 22.0±3.0 | 8.9±1.6 | 18.9±1.0 | 15.1±0.3 |
| 18 : 2 | 1.7±0.2 | 3.0±0.8 | 1.8±0.3 | 3.2±0.6 | 1.5±0.2 | 1.7±0.1 |
| 18 : 3 | 0.0 | 1.3±0.3 | 0.3±0.1 | 0.3±0.1 | 0.3±0.6 | 0.0 |
| 20 : 0 | 3.0±0.2 | 5.0±0.7 | 2.0±0.6 | 3.6±0.3 | 2.0±0.4 | 3.6±0.1 |
| 20 : 1 | 1.2±0.1 | 0.5±0.1 | 0.8±0.4 | 0.2±0.1 | 1.1±0.3 | 1.2±0.3 |
| 20 : 2 | 1.4±0.2 | 5.5±1.3 | 3.0±0.1 | 3.7±0.6 | 2.0±0.1 | 2.0±0.4 |
| 20 : 3 | 1.2±0.1 | 6.4±1.8 | 1.4±0.1 | 5.2±0.4 | 4.8±0.8 | 5.3±1.2 |
| 20 : 4 | 2.5±0.2 | 3.8±2.3 | 1.3±0.2 | 3.7±0.3 | 3.0±0.9 | 3.9±0.6 |
| 20 : 5 | 1.2±0.2 | 5.7±0.8 | 1.7±0.5 | 7.6±0.7 | 1.5±0.2 | 4.0±0.1 |
| 24 : 0 | 2.8±0.2 | 7.2±0.8 | 2.4±0.3 | 9.8±0.8 | 5.1±0.8 | 6.9±0.7 |
| 24 : 1 | 2.3±0.4 | 7.9±1.4 | 2.3±0.6 | 10.4±3.0 | 9.6±1.3 | 8.8±0.2 |
| Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe | 67.8±3.1 | 48.2±3.0 | 56.3±4.2 | 44.8±2.6 | 49.1±2.7 | 49.6±3.1 |
| Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe | 28.6±1.6 | 40.3±2.6 | 39.4±3.1 | 44.8±3.2 | 41.3±2.3 | 44.1±2.0 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 3.6±0.7 | 11.5±3.0 | 4.3±0.8 | 10.4±1.0 | 9.6±0.9 | 6.3±1.1 |

Number of animals in each group: 6 Mean ± S.E. Significant differences underlined
 Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Średnie ± S.E. Istotne różnice pogrubiono

<http://rcin.org.pl>

Table 8. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in sulfatides of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)
 Tabela 8. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych sulfatydów mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju (w %)

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days – dni | | 90 days – dni | | 180 days – dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 4.4±0.4 | 0.4±0.04 | 3.7±0.1 | 1.6±0.5 | 2.8±0.2 | 1.9±0.7 |
| 16 : 0 | 29.2±1.9 | 14.4±0.4 | 27.6±1.2 | 16.1±0.6 | 23.3±0.9 | 16.9±1.7 |
| 16 : 1 | 6.2±0.9 | 0.3±0.1 | 8.2±0.7 | 1.3±0.3 | 6.8±0.2 | 4.9±1.0 |
| 17 : 0 | 0.9±0.2 | 1.7±0.1 | 1.4±0.2 | 0.6±0.1 | 2.0±0.3 | 1.2±0.1 |
| 18 : 0 | 10.0±0.4 | 3.6±0.4 | 11.7±0.4 | 7.8±0.8 | 10.7±0.6 | 9.3±1.0 |
| 18 : 1 | 16.7±0.9 | 12.8±1.0 | 21.3±0.7 | 9.9±0.9 | 23.4±1.6 | 17.2±2.0 |
| 18 : 2 | 3.1±0.3 | 8.1±0.7 | 3.5±0.5 | 4.6±0.8 | 1.4±0.2 | 2.4±0.1 |
| 18 : 3 | 0.2±0.04 | 0.0 | 0.4±0.04 | 0.5±0.2 | 0.0 | 1.5±0.2 |
| 20 : 0 | 5.1±0.4 | 6.1±0.3 | 1.9±0.2 | 4.1±0.6 | 1.4±0.2 | 1.8±0.3 |
| 20 : 1 | 0.5±0.7 | 1.2±0.1 | 0.9±0.1 | 0.8±0.1 | 3.3±1.0 | 2.7±0.4 |
| 20 : 2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.6±0.9 |
| 20 : 3 | 2.3±0.2 | 8.9±0.8 | 1.8±0.4 | 8.1±1.7 | 1.1±0.5 | 7.1±0.6 |
| 20 : 4 | 0.3±0.05 | 4.9±0.7 | 0.9±0.1 | 3.8±0.3 | 4.1±0.2 | 5.5±1.3 |
| 20 : 5 | 10.2±1.0 | 4.3±0.5 | 8.3±0.4 | 8.1±1.5 | 6.9±0.5 | 2.9±0.6 |
| 24 : 0 | 2.3±0.3 | 1.1±0.1 | 3.8±0.3 | 3.1±0.6 | 5.4±0.5 | 5.1±1.9 |
| 24 : 1 | 6.6±0.7 | 7.9±1.0 | 2.1±0.4 | 9.4±0.3 | 6.8±0.8 | 8.4±0.9 |
| Total saturated FA Całkowicie nasycone kwasy tłuszczowe | 51.9±2.7 | 27.3±3.0 | 50.1±3.3 | 33.3±1.8 | 45.6±2.9 | 36.2±2.4 |
| Total unsaturated FA Całkowicie nienasycone kwasy tłuszczowe | 46.1±2.1 | 50.4±3.1 | 47.4±2.7 | 46.5±3.2 | 53.8±3.1 | 55.2±3.5 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 2.6±0.6 | 22.3±2.0 | 2.5±0.8 | 20.2±3.1 | 0.6±0.1 | 8.6±0.9 |

Number of animals in each group: 6

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6

Mean ± S.E.

Średnia ± S.E.

Significant differences underlined

Istotne różnice pogrubiono

Table 9. Effect of fatty acids deficiency in diet on composition of fatty acids in cholesteryl esters of the cerebral myelin of rats during development (in rel. %)
 Tabela 9. Wpływ niedoboru kwasów tłuszczowych w diecie na skład kwasów tłuszczowych estrów cholesterolu mózgowej mieliny szczurów w czasie rozwoju

| Fatty acids Kwasy tłuszczowe | 60 days — dni | | 90 days — dni | | 180 days — dni | |
|--|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie | control kontrola | experimental doświadczenie |
| 14 : 0 | 5.1±0.7 | 4.4±0.9 | 7.3±0.5 | 2.1±0.3 | 3.3±0.7 | 3.6±1.3 |
| 16 : 0 | 27.7±3.0 | 19.8±1.3 | 32.6±1.7 | 18.5±1.7 | 24.3±1.2 | 24.5±2.0 |
| 16 : 1 | 4.0±1.1 | 1.9±0.4 | 8.7±0.9 | 2.8±0.4 | 8.8±0.4 | 4.9±0.4 |
| 17 : 0 | 0.8±0.4 | 1.7±0.1 | 0.8±0.2 | 0.5±0.1 | 5.0±0.1 | 2.7±0.2 |
| 18 : 0 | 9.6±1.5 | 14.3±2.2 | 9.2±0.1 | 14.7±3.8 | 7.8±0.3 | 13.3±1.3 |
| 18 : 1 | 10.8±3.4 | 13.3±1.2 | 14.6±0.5 | 17.3±1.0 | 14.0±0.1 | 12.7±0.8 |
| 18 : 2 | 4.0±0.6 | 5.7±0.4 | 3.6±1.0 | 2.1±0.3 | 1.2±0.3 | 1.5±0.1 |
| 18 : 3 | 0.5±0.3 | 1.6±0.2 | 0.5±0.1 | 0.5±0.3 | 0.0 | 0.0 |
| 20 : 0 | 5.2±1.3 | 1.6±0.3 | 2.4±0.3 | 2.0±0.2 | 3.6±0.1 | 1.9±0.3 |
| 20 : 1 | 1.0±0.2 | 1.2±0.3 | 1.0±0.5 | 2.0±0.2 | 2.7±0.1 | 1.6±0.1 |
| 20 : 2 | 5.0±0.5 | 2.8±0.6 | 5.0±0.6 | 3.5±0.2 | 2.0±0.1 | 2.0±0.1 |
| 20 : 3 | 2.2±0.9 | 5.3±1.4 | 2.0±0.7 | 5.7±0.3 | 3.0±0.2 | 3.1±0.2 |
| 20 : 4 | 2.0±0.3 | 8.9±0.9 | 1.6±0.3 | 3.2±0.1 | 1.9±0.5 | 5.8±0.2 |
| 20 : 5 | 4.2±0.5 | 3.8±0.4 | 2.0±0.5 | 3.8±0.3 | 3.3±1.2 | 2.0±0.2 |
| 24 : 0 | 0.0 | 3.0±0.6 | 0.0 | 0.5±0.1 | 2.3±0.3 | 7.4±0.3 |
| 24 : 1 | 7.6±2.7 | 4.1±0.7 | 4.2±0.6 | 2.4±1.1 | 3.0±0.3 | 4.7±0.8 |
| Total saturated FA Całkowite nasycone kwasy tłuszczowe | 48.4±2.6 | 44.8±4.6 | 52.3±2.9 | 38.3±2.6 | 46.3±4.1 | 53.4±2.7 |
| Total unsaturated FA Całkowite nienasycone kwasy tłuszczowe | 41.3±2.1 | 48.6±3.1 | 43.2±2.4 | 42.4±3.1 | 39.9±2.6 | 42.3±2.4 |
| Total unidentified FA Całkowite niezidentyfikowane kwasy tłuszczowe | 10.3±4.0 | 6.6±2.2 | 4.5±0.7 | 19.5±1.2 | 13.8±2.0 | 4.3±0.4 |

<http://rcin.org.pl>

Number of animals in each group: 6 Mean ± S.E. Significant differences underlined

Liczba zwierząt w każdej grupie: 6 Średnie ± S.E. Istotne różnice pogrubiono

total saturated fatty acid percentage resulting from a drop of almost all individual saturated fatty acid percentages. Contrary to this, the proportions of unsaturated fatty acids were substantially increased. A full detailed account of results is presented in tables 3 to 8. The fatty acid pattern of cholesteryl esters was much less deviated, and changes lacking any particular direction were observed in all age groups of experimental animals (tab. 9).

Comparative histological examination of the brains under investigation revealed only a lessened stainability of the myelin of rats fed the deficient diet in comparison with those maintained on a fat supplemented chow. Signs of demyelination or dismyelination were not detected.

DISCUSSION

Feeding of a fat deficient diet does not seem to affect evidently the mature central nervous system. Contrary to that, immature animals maintained on a fat deprived diet demonstrate considerably delayed growth and maturation of the developing brain (Dobbing 1968; Galli et al. 1970; White et al. 1971; Paoletti, Galli 1972).

The developmental stage characterized by a very intensive growth of the brain, and thus by numerous cell divisions, rapid myelination as well as by enzymatic and metabolic maturation of many anatomical structures of the brain constitutes a critical period during which the animal is particularly sensitive to nutritional deficiencies, among others also to a reduced fat intake, that may lead to serious morphological and functional alterations (Dobbing 1972).

It would appear, that in a fat deprived dietary regime, it is the deficiency of essential fatty acids, particularly of linoleate and linolenate that will constitute the significant pathogenetic factor in this experimental condition. Thus, it was anticipated that myelin lipids of animals maintained on such a diet will show a fatty acid spectrum with markedly reduced proportions of unsaturated fatty acids. Instead, the results of our investigations have shown that along with a markedly reduced lipid content in the myelin — alterations in the fatty acid spectrum were opposite to those anticipated, i.e. a significant drop of percentages of saturated fatty acids and a marked increase of proportion of unsaturated, mainly of the polyunsaturated acids was found. Such a direction of changes was seen in all experimental age groups in the main phospholipid fractions (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine and plasmalogen). In the other myelin specific polar lipids, i.e. in cerebrosides and sulfatides this observation holds true only for the younger age groups.

The explanation of the general enrichment of unsaturated fatty acids of almost all myelin lipids following the long term fat deficiency in the diet on the basis of our results can only be a speculative one.

As shown in our previous report (Wender et al. 1983), the myelin fraction from rats maintained at the almost fat free diet remained severely deficient in its lipid content till the age of 180 days. Those findings seemed to justify our conclusion that deposition of lipids in the myelin was severely impaired under these experimental condition. Fatty acids incorporated into complex myelin lipids may originate from the circulating fatty acid pool or from *in situ* synthesis. Thus, the failure in myelin lipid deposition may depend either on a decrease of the exogenous fatty acids supply or depression of endogenous synthesis.

It is generally agreed that except for the period of active myelination the supply of fatty acids from the circulation constitutes the major source of fatty acids for synthesis of brain lipids, whereas the task of converting and retroconverting of the fatty acids taken up or synthesized *in situ* is performed by the brain itself. A long term fat free diet has been shown to increase the activity of the brain fatty acid synthetase by 40%, whereas exogenous fatty acids happened to inhibit the synthesis of both the fatty acid synthetase and acetyl-CoA carboxylase of the brain. Conversion and retroconversion of fatty acids in the brain is about by the interaction of desaturating and elongating enzymes (Horrocks, Herder 1981).

Thus, there does not seem to be much reason for assuming a decreased biosynthesis of fatty acids in the brain as the major cause for the deficient lipid content in the myelin. It should be rather a deficient supply of fatty acids by the circulation or eventually a decrease in the uptake of fatty acids by the brain that could limit the synthesis of myelin lipids whereas the evidently unimpaired, and thus relative high activity of desaturating enzymes could be responsible for the increased proportions of unsaturated fatty acids that were found in most myelin lipids under these experimental conditions.

The highest and most persistent (till the age of 180 days) undue accumulation of unsaturated fatty acids was found in the plasmalogens and phosphatidylcholine, whereas in cerebrosides and sulfatides some normalisation of the fatty acid spectrum occurred with advancement of the animal's age.

Esterified cholesterol, the content of which happened to increase distinctly during the first two-three months of age in the experimental animals, was the only lipid fraction, that did not demonstrate the characteristic accumulation of unsaturated fatty acids. Arachidonic acid was the only fatty acid that was found in elevated proportions throughout the whole period of observation. This finding is worth pointing out as, contrary to demyelinating processes — where the fatty acids composition of the accumulating cholesteryl esters was usually considerably altered (Wender et al. 1978), the appearance of cholesterol esters in the myelin of rats maintained on a fat deprived diet did not go in parallel with demyelination.

SKŁAD KWASÓW TŁUSZCZOWYCH LIPIDÓW MIELINY SZCZURÓW
UTRZYMYWANYCH W CZASIE ROZWOJU NA DIECIE BEZTŁUSZCZOWEJ

Streszczenie

Badano obraz kwasów tłuszczowych mieliny szczurów utrzymywanych na diecie beztłuszczowej w końcowym okresie życia płodowego oraz podczas całego życia pozapłodowego. Obraz kwasów tłuszczowych poszczególnych frakcji mielinowych wyodrębnionych drogą chromatografii kolumnowej i cienkowarstwowej określono przy użyciu chromatografii gaz-płyn. Wyniki badań doprowadziły do następujących wniosków:

1. Zwierzęta utrzymywane na diecie beztłuszczowej wytwarzają mielinę różniącą się istotnie od normalnej, składem kwasów tłuszczowych głównych składników mieliny.
2. Wszystkie podstawowe frakcje fosfolipidowe i glikolipidowe mieliny zwierząt doświadczalnych wykazują istotnie niższy odsetek nasyconych kwasów tłuszczowych oraz wyraźnie wyższy nienasyconych.
3. Wraz z rozwojem zwierząt spostrzega się tendencję do normalizacji obrazu kwasów tłuszczowych cerebrozydów i sulfatydów. Estryfikowany cholesterol był jedyną frakcją lipidową, która nie wykazywała charakterystycznego wzrostu nienasyconych kwasów tłuszczowych.

СОСТАВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ЛИПИДОВ МИЕЛИНА КРЫС КОРМЛЕННЫХ
ВО ВРЕМЯ РАЗВИТИЯ БЕЗЖИРОВОЙ ДИЕТОЙ

Резюме

Была исследована картина жирных кислот миеллина крыс кормленных безжировой диетой в конечном периоде эмбриональной жизни и во время всей постэмбриональной жизни. Картина жирных кислот отдельных миелиновых фракций путем колонковой и тонкослойной хроматографии была определена при помощи хроматографии газ-жидкость. Результаты исследований привели к следующим заключениям:

1. Животные кормленные безжировой диетой образуют миелин отличающийся существенно от нормального составом жирных кислот главных составных частей миеллина.
2. Все основные фосфолипидные и глюколипидные фракции миеллина экспериментальных животных проявляют существенно низший процент насыщенных жирных кислот и отчетливо высший ненасыщенных.
3. Вместе с развитием животных наблюдается тенденция к нормализации картины жирных кислот цереброзидов и сульфатидов. Этерифицированный холестерин оказался единственной липидной фракцией, которая не проявляла характерного роста ненасыщенных жирных кислот.

REFERENCES

1. Dobbing J.: Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system. [In:] Malnutrition, learning and behaviour. Eds. N. Serimshow and J. Gordon, MIT Press, Cambridge, Mass. 1968, 181—202.
2. Dobbing J.: Vulnerable periods of brain development. In: Lipids, malnutrition and the developing brain. Elsevier, North-Holland, Amsterdam 1972, 9—20.
3. Fölch-Pi J., Lees J., Sloane-Stanley G.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. biol. Chem., 1957, 226, 497—511.

4. Galli C., White Jr. H., Paoletti R.: Brain lipid modification induced by essential fatty acid deficiency in growing male and female rats. *J. Neurochem.*, 1970, 17, 347—355.
5. Horrocks A., Harder H.: Fatty acids and cholesterol. In: *Handbook of Neurochemistry*, Ed. A. Lajtha, Plenum Press, New York and London, vol. 3, 1981, 736—792.
6. Kishimoto Y., Radin N.: A reaction tube for methanolysis, instability of hydrogen chloride in methanol. *J. Lipid Res.*, 1965, 6, 435—436.
7. Norton W., Poduslo S.: Myelination in rat brain: method of myelin isolation. *J. Neurochem.*, 1973, 21, 749—757.
8. Paoletti R., Galli C.: Effects of essential fatty acids deficiency on the central nervous system in the growing rat. [In:] *Lipids, malnutrition and the developing brain*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam 1972, 121—140.
9. Smith H., Benjamins J.: Model system for study of perturbation of myelin metabolism. [In:] *Myelin*. Ed. P. Morell, Plenum Press New York 1977, 447—488.
10. Wender M., Adamczewska-Gonczewicz Z., Pankrac J., Talkowska D.: The effect of a fatty acid deficient diet on myelin lipids of the rat brain. *Neuropatol. Pol.*, 1983, 21, 35—43.
11. Wender M., Adamczewska Z., Pankrac J., Wajgt A.: Myelin lipids in cyanide encephalopathy. *Neuropatol. Pol.*, 1978, 46, 153—162.
12. Wender M., Stanisławska J., Filipek-Wender H.: Cerebral cholesteryl esters in cyanide encephalopathy. *Neuropathol. Pol.*, 1978, 16, 163—172.
13. White Jr. H., Galli C., Paoletti R.: Brain recovery from essential fatty acid deficiency in developing rats. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 869—882.

Author's address: Department of Neurology, School of Medicine, 49, Przyby-
szewskiego Str., 60—355 Poznań

PAWEŁ P. LIBERSKI, JANUSZ ALWASIAK

NEUROPATHOLOGY OF EXPERIMENTAL TRANSMISSIBLE
SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY

(263 K STRAIN OF SCRAPIE IN GOLDEN SYRIAN HAMSTERS)
I. STANDARD PATHOLOGY AND DEVELOPMENT OF LESIONS

Department of Neurology and Department of Oncology, School of Medicine, Łódź

The transmissible spongiform encephalopathy group consists of four major disorders: kuru (Gajdusek et al. 1966) and Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) (Gibbs et al. 1968) in human beings, natural scrapie in sheep and goats (Dickinson 1976) and transmissible mink encephalopathy (Marsh, Hanson 1979). Some other conditions such as the familial Alzheimer disease (Goudsmit et al. 1980), Gerstmann-Straussler syndrome (Masters et al. 1980), Leigh disease, progressive supranuclear palsy and Köhlmeier-Degos disease (Gajdusek et al. 1974) are probably of similar etiology.

Transmissible spongiform encephalopathy is caused by infection with a transmissible agent of almost completely unknown physico-chemical structure which represents a novel type of interaction between the pathogen and the host regulatory systems. The unusual physico-chemical and biological properties of the agent led several authors to speculation as to its very nature. Many hypotheses appeared suggesting that this agent may be represented by such an elusive structure as a self-replicating membrane (Gibson, Hunter 1967), small "naked" RNA similar to the plant viroids (Diener 1972), a spiroplasma-like organism (Bastian 1979), a small DNA moiety coated with protein (Malone et al. 1979), a hydrophobic virus (Prusiner et al. 1972) or a small molecule, participating in development and differentiation, beyond the hosts control genetic mechanisms (Dickinson, Outram 1979). Recently two novel terms were introduced into scientific literature — namely virino (Dickinson, Outram 1979) and prion (Prusiner 1982), to reflect the atypical properties of the agent. Our group prefers the term "virino" because of its neutral semantic position (Kimberlin 1982).

Scrapie propagated in small rodents represents not only prototypic

infection of the transmissible spongiform encephalopathy group (Outram 1976), but also a model to study other degenerative disorders of unknown etiology — multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer disease, Huntington chorea (Gajdusek 1977). The aim of this paper is to summarize the effort of our group to establish a useful model in the study of transmissible spongiform encephalopathy (263 K strain of scrapie in Syrian hamsters) and to describe both the distribution and intensification of lesions in this model.

MATERIAL AND METHODS

Two sets of experiments were performed. The first was intended to evaluate the standard pathology of scrapie in a chosen model. The second was performed to follow the development of pathological changes during infection. Fifteen animals were included into the first set and eight into the second (timing experiment). The control group consisted of nine animals. The strain of scrapie virino selected for these experiments was 263 K "quick" (kindly supplied by dr. R. H. Kimberlin, Neuropathogenesis Unit, Edinburgh) propagated through Syrian golden hamsters and stored at -20°C prior to usage. The brain tissues were homogenized in physiological saline as a 10% suspension and centrifuged at 1600 G for 10 minutes. The supernatant (0.02 ml) was used as inoculum and injected into the right cerebral hemisphere under mild ether anesthesia. The control animals were inoculated with saline under identical experimental conditions.

In the first set of experiments all animals were sacrificed after the appearance of doubtless signs of clinical scrapie. In the second (timing) animals were sacrificed 52, 58, 68, 75, 80, 89 and 92 days after inoculation.

After removal of the brains from the skull each one was divided into two halves. One intended for light microscopy was fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut into 7–8 μm thick sections and stained with hematoxylin and eosin and according to Masson's trichrome technique. Selected areas dissected from the second half were immediately immersion fixed in 4% glutaraldehyde and later routinely prepared for electron microscopy. The remaining tissue was frozen and stored at -20°C for further usage.

The halves of the brain for obtaining information concerning both the distribution and intensification of the lesions were cut into four transverse sections. From each, ten areas were selected for detailed examination. They included — the cortex on the convexity both from the first and second section, as well as the Ammon's horn cortex, the basal ganglia at the level of the first and the hippocampus formation at the level of the second section, the thalamus and hypothalamus at the level, the grey and white matter of the cerebellum, as well as brain stem from the fourth section. The anatomical areas were selected according to the data presented by Fraser and Dickinson (1968).

Analysis of intensity of the lesion was performed according to the scoring-system of five degrees of severity elaborated by Fraser and Dickinson (1968).

RESULTS

Clinical signs

The incubation period in the first set of experiments ranged between 76 and 83 days after inoculation. The first clinical signs included ataxia, specially of the hindlimbs (Fig. 1a), shaking tremor of the head (bobbing behavior) and difficulties of standing up from supine position (Fig. 1c). The hairs were characteristically ruffled (Fig. 1b), but the "scratching syndrome" according to Manuelidis et al. (1978) was never observed. In the terminal stage of the disease the animals lay quietly on the floor of the cage and exhibited massive tremor and strange movements when disturbed (Fig. 1d). Death followed a few days later.

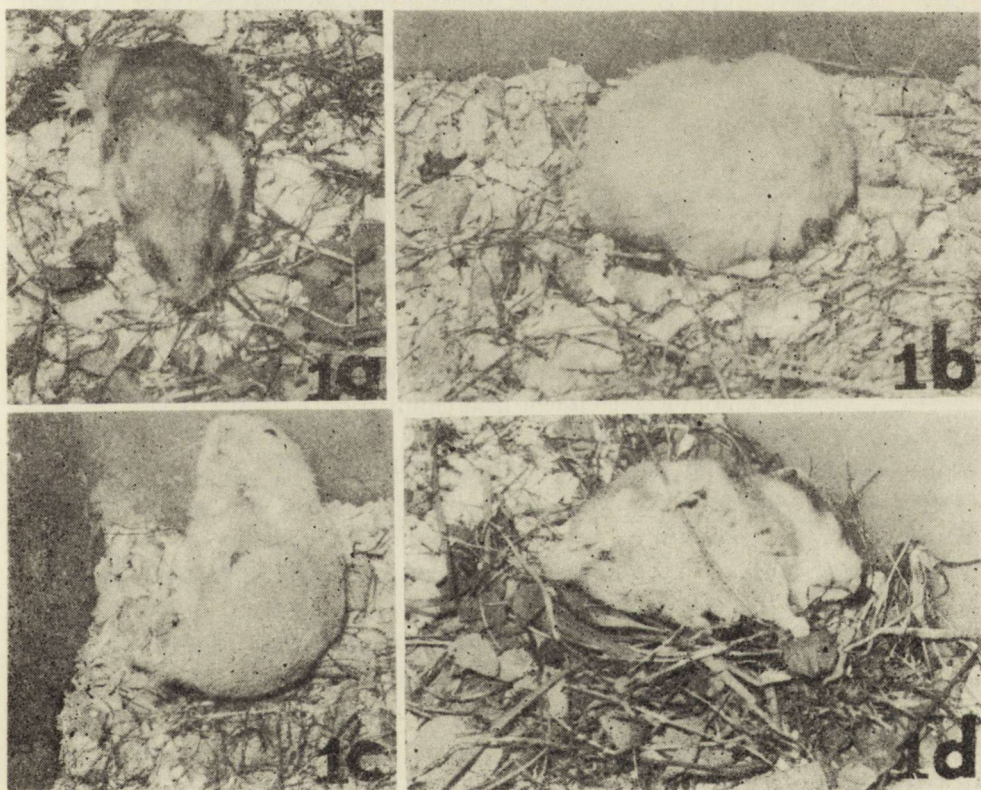


Fig. 1. Clinical signs of scrapie: *a* — ataxia of the hindlimbs, *b* — "ruffled" hair, *c* — difficulties in standing up from supine position, *d* — terminal stage

Ryc. 1. Kliniczne objawy scrapie: *a* — ataksja kończyn dolnych, *b* — „zmierzwiłone” włosy, *c* — trudności w stawianiu z pozycji leżącej, *d* — okres końcowy

Topography of the brain lesions

In the coronal sections the brains appeared normal, beside a mild broadening of the ventricular system in some cases. Massive hydrocephalus typical for some models of murine scrapie as well as for CJD propagated in small laboratory rodents was never observed in the first or in the second passage.

The hallmark of this disorder appeared to be microvacuolization of the neuropil (Fig. 2), accompanied by neuronal loss (Fig. 3) and astrocytic

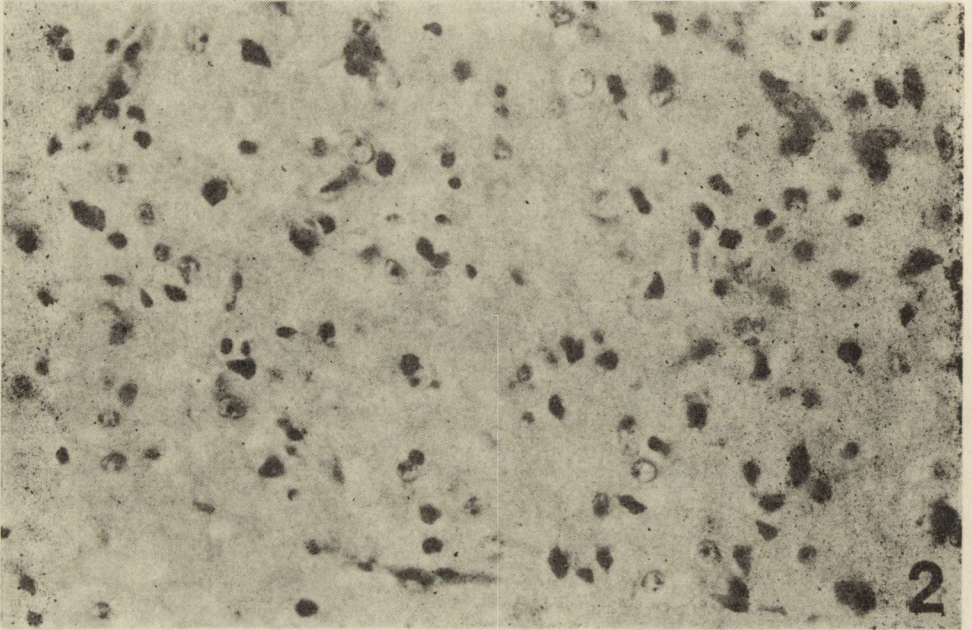


Fig. 2. Microvacuolization of the neuropil. H—E. $\times 160$
Ryc. 2. Mikrowakuolizacja neuropilu. H—E. Pow. 160 \times

proliferation. The vacuoles showed a typical “punched” appearance and their “budding” was often observed (Fig. 3). The microglial changes consisted of their proliferation with formation of rod-like cells.

The degree of vacuolization of the cortex on the convexity as well as the Ammon’s horn cortex varied between 1 and 2 never reached grade 3 or more (Fig. 4). The astrocytic reaction was scanty, in some cases minimal proliferation of microglial cells was visible. Gliocytosis as defined by Fraser (1979) was never noticed.

The basal ganglia presented a similar degree of vacuolization ranging between 1—2 grades to 2 grades and the astrocytic reaction was of the same magnitude. A mild microglial reaction was observed only incidentally.

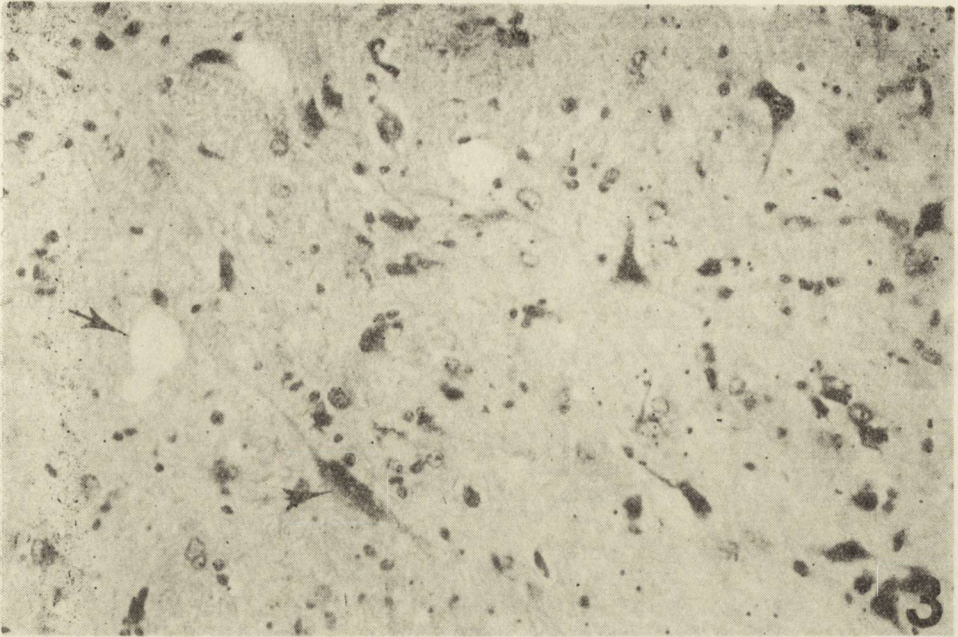


Fig. 3. Degenerative neurons (arrowhead) and "budding" vacuoles (arrow). H—E. $\times 160$

Ryc. 3. Wyrodnijące neurony (głównka strzałki) oraz „pączkujące” wakuole (strzałka). H—E. Pow. 160 \times

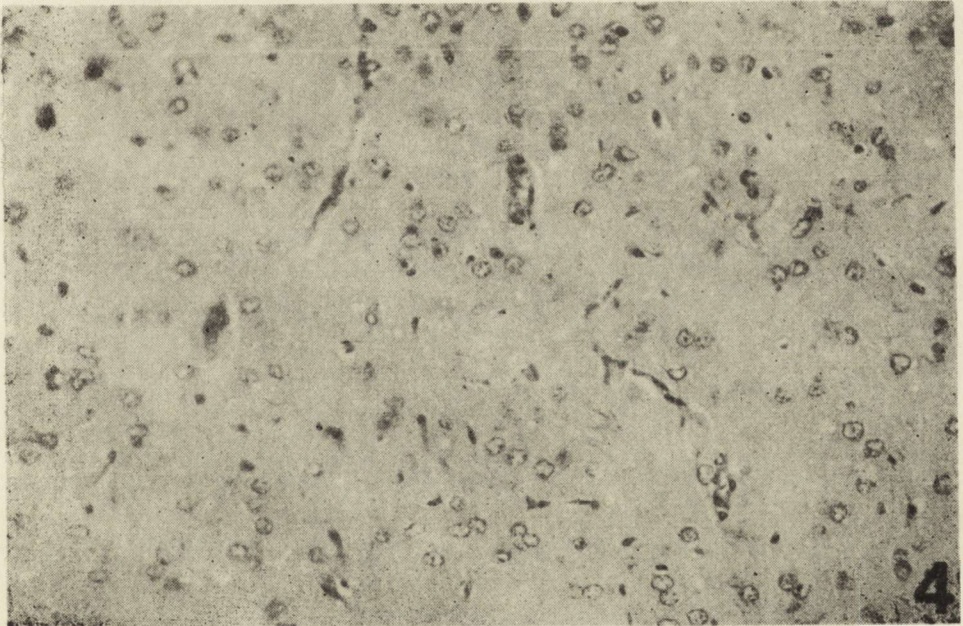


Fig. 4. The cortex on the convexity. Mild vacuolization. H—E. $\times 160$

Ryc. 4. Kora mózgu na sklepiści. Mierne nasilenie wakuolizacji. H—E. Pow. 160 \times

The hippocampal formation was characteristically destroyed (Fig. 5). The cell loss, specially of pyramidal cells was high and the degree of vacuolization varied, reaching maximally 4. The astrocytic reaction was severe and accompanied by microglial proliferation. In some cases formation of Rosenthal fibers was observed against the background of intense proliferation of astrocytes, presenting dividing forms, in the close vicinity of the hippocampal formation (Fig. 6). Nuclei similar to the "naked" nuclei of Alzheimer were distinctly visible.

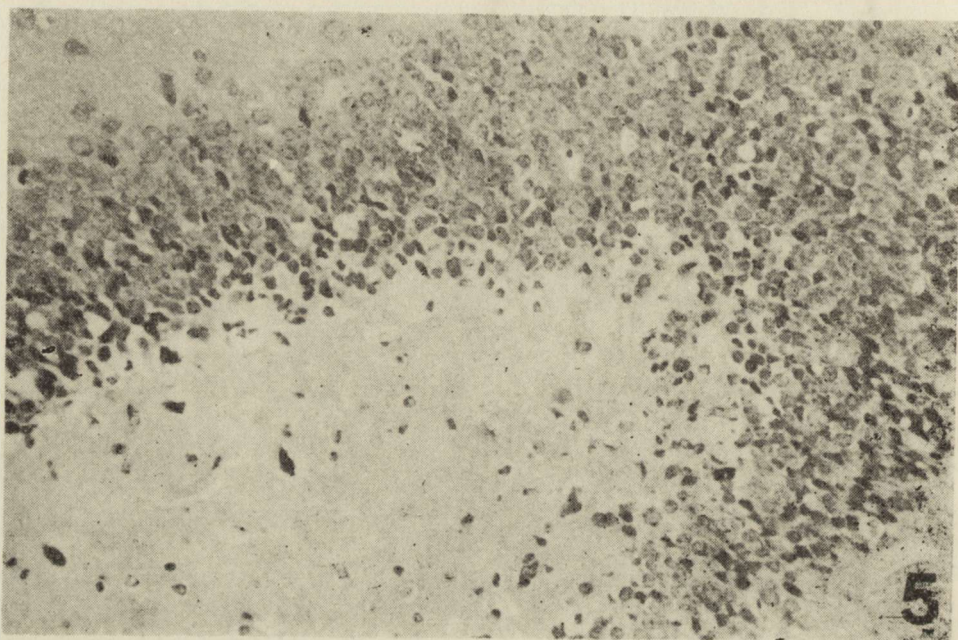


Fig. 5. Hippocampal formation. Intensive vacuolization. H—E. $\times 160$
Ryc. 5. Formacja hipokampa. Znaczone nasilenie wakuolizacji. H—E. Pow. 160 \times

The thalamus and hypothalamus were similarly destroyed. Vacuolization ranged between 1—2 and 3—4 grades, the astrocytic reaction was deep and accompanied by many microglial cells (Fig. 7). In some cases the vacuolization associated with marked proliferation of astroglial cells accompanied by rod-like microglial cells seemed to lead to gliocytosis similar to that described in murine scrapie by Fraser (1979). In other cases the vacuolization was rather an isolated phenomenon and gliocytosis was not observed.

The changes in the cerebellum were of moderate intensity. The granular cell layer was mostly affected and the Purkinje cells were typically almost completely spared (Fig. 8). The proliferation of Bergmann glia was intense but white matter was affected only incidentally and probably secondarily.

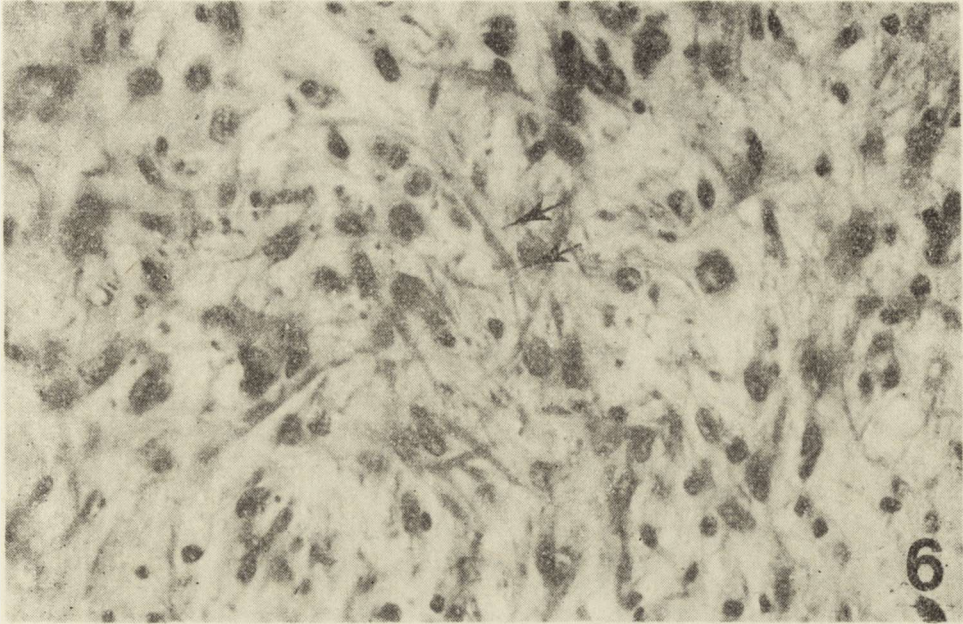


Fig. 6. Abundant formation of Rosenthal fibers (arrows) and massive astrocytosis.
H—E. $\times 400$

Ryc. 6. Masywne formowanie włókien Rosenthala (strzałki) na tle znacznej proliferacji astrocytów. H—E. Pow. 400 \times

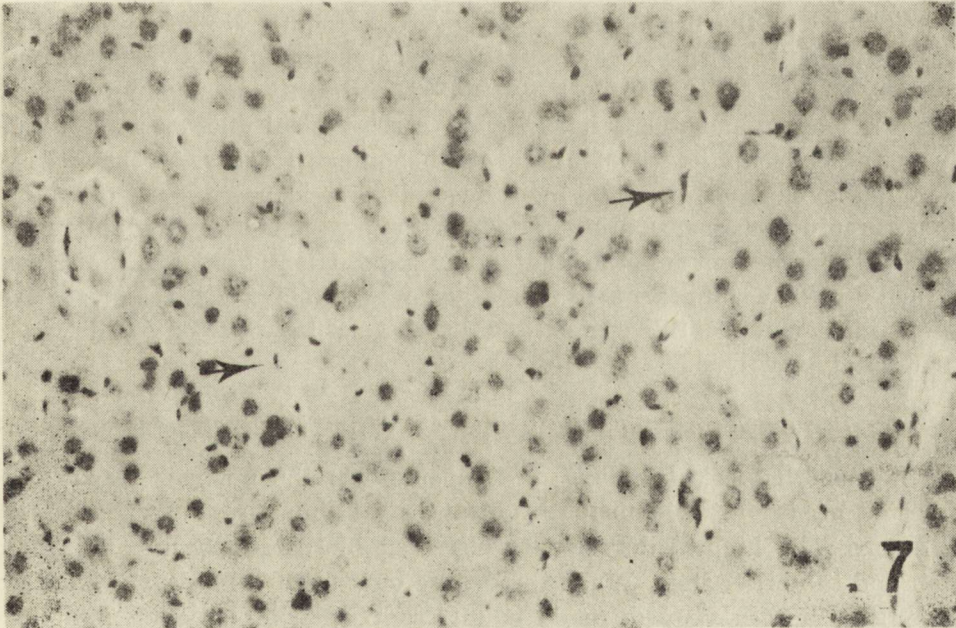


Fig. 7. Microglial proliferation (arrows). H—E. $\times 160$

Ryc. 7. Proliferacja mikrogleju (strzałki). H—E. Pow. 160 \times

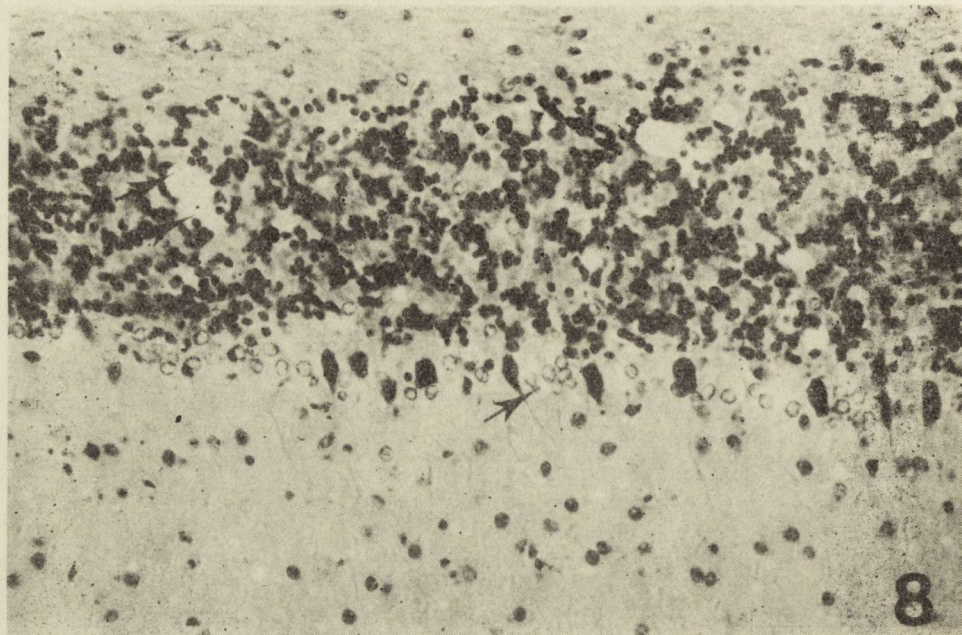


Fig. 8. Typical changes in the cerebellum. Note proliferation of Bergmann glia (arrows). H—E. $\times 160$

Ryc. 8. Typowe zmiany w mózdzku. Widoczna proliferacja gleju Bergmanna. H—E Pow. 160 \times

Changes in the brain stem were severe, of similar intensity as those encountered in either the thalamus or hypothalamus. Vacuolization ranged from 2 to 4 and was associated with intense proliferation of both astrocytes and microglia. In some cases typical gliocytosis resulted from the concomitance of all these phenomena (Figs 9, 10, 11).

On the basis of the aforementioned data it is possible to conclude that scrapie in hamster brain follows an antero-posterior gradient with largest involvement of the thalamus, hypothalamus and brain stem structures. The hippocampal formation was affected with almost the same intensity but the cortex and basal ganglia were only mildly or moderately involved.

Sequence of pathological lesions — “timing experiment”

In the 8th week (52 days post inoculation) the changes in all the selected areas of the hamster brains were minimal, ranging from 1 to 2 grades. The highest degree was observed in the hippocampal formation and the brain stem. When the degree of vacuolization was estimated as only 1 it was very difficult to differentiate whether such minimal changes were actually associated with scrapie-related phenomena or reflected only artefactual or incidentally formed vacuoles.

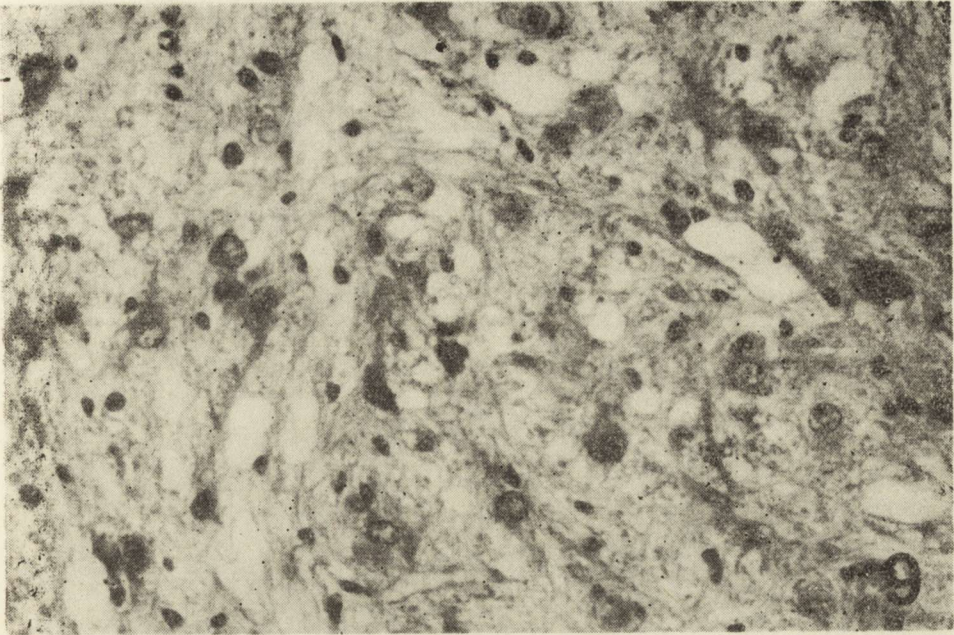


Fig. 9. Gliocytosis in the brain stem. Note massive vacuolization of the neuropil and many reactive astrocytes. H—E. $\times 160$

Ryc. 9. Gliocytoza w pniu mózgu. Masywna wakuolizacja oraz liczne reaktywne astrocyty. H—E. Pow. 160 \times

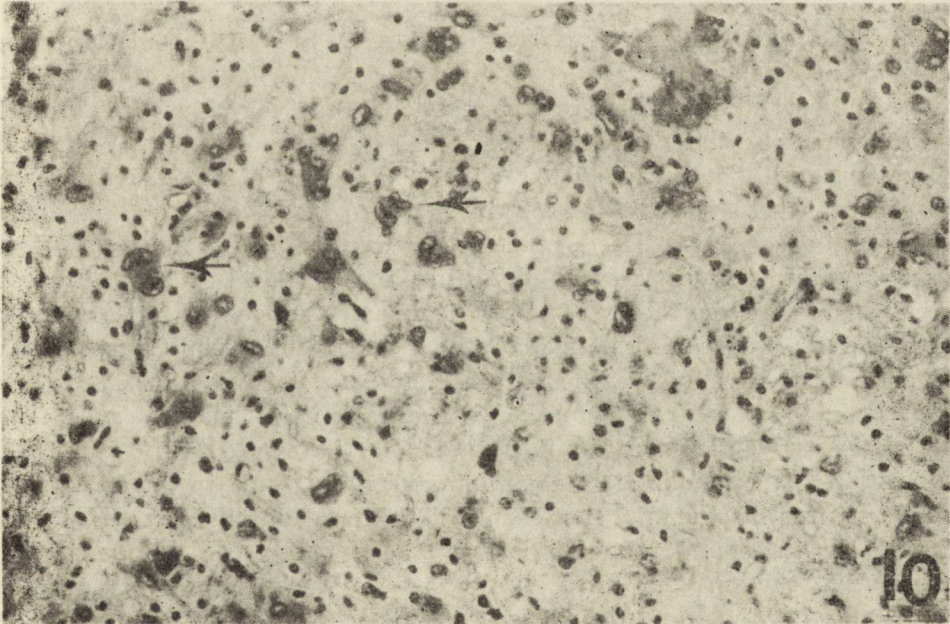


Fig. 10. Gliocytosis in the brain stem. Note dividing astrocytes (arrows) and mild vacuolization. H—E. $\times 160$

Ryc. 10. Gliocytoza w pniu mózgu. Zwracają uwagę dzielące się astrocyty (strzałki) oraz mierne nasilenie zmian gąbczastych. H—E. Pow. 160 \times

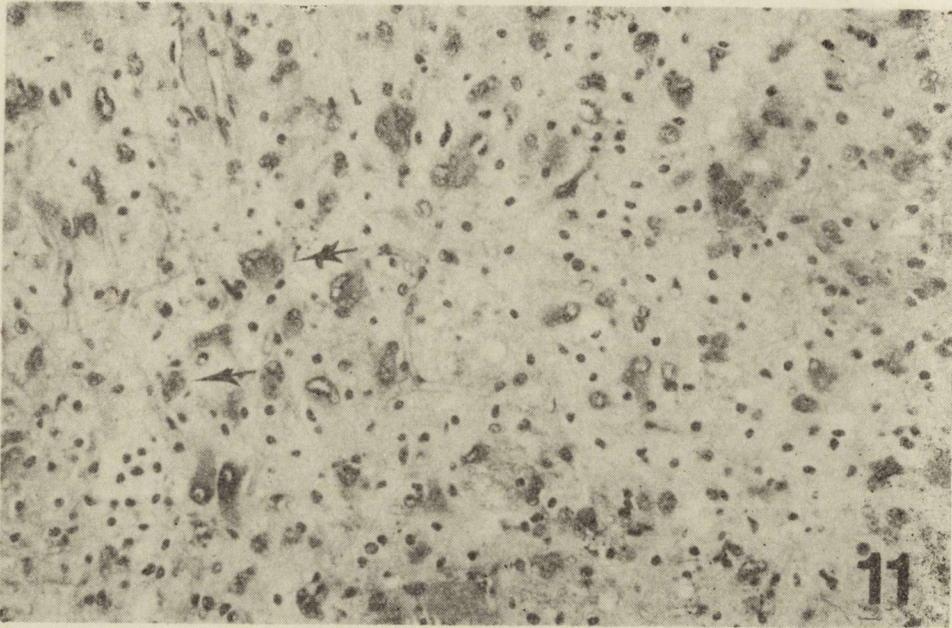


Fig. 11. Gliocytosis in the brain stem. Note multinucleated astrocytes (arrows).
H—E. $\times 160$

Ryc. 11. Gliocytoza w pniu mózgu. Zwracają uwagę wielojądrowe astrocyty (strzałki). H—E. Pow. $160 \times$

Between 8th and 10th week (58 to 68 days post inoculation) the changes in all examined areas presented a very stable degree of vacuolization. The astrocytic and microglial reactions were very scanty. The level of the vacuolization ranged between 1 and 2 grades, and the highest grade was intimately associated with the brain stem structures. In the 11th week (75 days post inoculation) the changes undoubtedly representing scrapie-related phenomena were more pronounced. The vacuolization and associated glial response were mild in all three cortical areas examined, viz. the cortex at the convexity as well as the Ammon's horn cortex and varied between 1 and 2 degree, a similar spectrum of changes was visible in the basal ganglia. In the thalamus, hypothalamus and hippocampal formation vacuolization reached 2 degree, but both the astrocytic and the microglial reaction were still scanty. In the cerebellum vacuolization was minimal (grade 1) and in the cerebellar white matter it was not noticeable. The greatest changes developed in the brain stem, vacuolization was estimated as 1—3, and the astrocytic reaction and microglial response were quite well visible.

In the 12th week (80 days post inoculation) the changes began to reflect the typical topography of the lesions as previously described. Vacuolization in both cortex and basal ganglia was estimated as 1, and in the thalamus and hypothalamus as 2, in the cerebellar gray matter

as 1, and in the brain stem as 2—3. The astrocytic reaction was almost fully developed, but typical gliocytosis was not yet visible. In one case minimal hydrocephalus was observed. Between the 13th and 14th week (89 and 92 days post inoculation) the pathological changes reached the highest level and entirely reflected the topography of the lesion characteristic for this model. In all the cortical areas the changes were rather mild, vacuolization varied between 1 and 1—2 grades, the astrocytic reaction was mild but visible, and the number of microglial cells was scanty. A similar situation was observed in the basal ganglia. In the thalamus and hypothalamus vacuolization reached 2—3 at the top level, and the astrocytic reaction was typically developed. In cerebellar gray matter vacuolization was as high as 3—4 grades, with abundant proliferation of Bergmann glia. The granular cell layer was mostly affected and the majority of Purkinje cells spared. The greatest changes were observed in the brain stem structures. Vacuolization was 3—4 or more, the proliferation of astrocytes as well as microglial cells formed typical gliocytotic pattern.

DISCUSSION

Various considerations may guide the selection of the animal model to study transmissible spongiform encephalopathies. Laboratory mice are in common usage, but the incubation period in murine scrapie is very long, lasting maximally one year or more (Outram 1976; Fraser 1979a). This not only prolongs the experiments, but makes the experimental work highly tedious. All the aforementioned difficulties can be by-passed the usage of the K "quick" strain of scrapie virino propagated through golden Syrian hamsters (Marsh, Kimberlin 1975). In comparison with the murine scrapie the selected model has several advantages (Brown et al. 1981). The incubation period is much shorter (in hamster — minimum incubation period for high-titer material is 60 days, in mice 180 days) and the titer of infectivity is much higher ($1 \times 10^{10}LD_{50}$ for hamsters and $8.4 \times 10^7LD_{50}$ for mice). The two aforementioned properties are responsible for the majority of the total infectivity estimated per cage as $2.4 \times 10^{11}LD_{50}$ in the hamster model, but only $1 \times 10^9LD_{50}$ in the murine one.

On the other hand, the hamster model has one, very serious disadvantage, which if not recognized may lead to important biases. Replication of the scrapie virino, as well as some other properties, namely, the incubation period and partly topography of the lesions in the form of what is called the lesion profile is under strict genetic control overridden by the host genotype. In mouse scrapie the Sinc gene influences the virino replication (Dickinson, Fraser 1977; Dickinson, Outram 1979, 1981) and the Sip gene operates in sheep (Dickinson 1976).

This means that probably all, or almost all hitherto described phenomena reflect only a combination of the given strain of virino replicated by the given host genotype. In other words, when studying scrapie-reflecting phenomena one must take into account the isolated findings cannot be justifiably extended to models of a different combination of the virino strain and host genotype.

One, important rationale of our group research program is to contribute to the understanding of the diversity of pathological lesions. The preliminary data presented in this study clearly showed the antero-posterior gradient of pathological lesions, with a distinct predilection for the axis structures — thalamus, hypothalamus and the brain stem. The hippocampal formation, cerebellum, basal ganglia, Ammon's horn cortex and the cortex on the convexity were less affected, in this order. The changes consisted of vacuolization of the neuropil, accompanied by astrocytic hypertrophy and microglial proliferation. Typical differences from case to case were observed. The most interesting were changes observed in the brain stem structures, in which a full picture of gliocytosis appeared. The term "gliocytosis" introduced into the literature by Fraser (1979 a, b) depicts astrocytosis (viz. increasing number of astrocytes) accompanied by an increasing number of rod-like microglial cells and severe neuronal loss. In his investigations gliocytosis was encountered mainly in the thalamus and hippocampal formation, but in the present study the hippocampal formation was only moderately affected and the main site of gliocytosis appearance were the brain stem structures and their rostral extensions — the thalamus and hypothalamus. In some cases the marked hypertrophy of astrocytes was accompanied by Rosenthal fibers formation. In the light of the above mentioned data it seems quite justifiable to postulate that gliocytosis is the uppermost level of tissue damage associated with spongiform encephalopathies, and may present some other probably secondary features (viz. Rosenthal fiber formation). In his detailed study based on examination of more than 10 000 murine brains Fraser found gliocytosis to be extremely rare. Only around 3% of cases presented it, but in some combinations of the virino strain and strain of mice (for example ME 7 strain of scrapie in VM, or VM × C 57Bl mice) it reached almost 100%. It is possible that the model selected for this study presented a much higher percentage of gliocytosis formation, as compared with the majority of murine scrapie models.

As mentioned above, many (if not all) features of the models selected for experimental work on scrapie are under strict control overridden by the host genotype. In murine scrapie the topography and intensification of the lesions in all combinations of scrapie virino replicated by the selected mouse genotype forms what is called the lesion profile (Fraser, Dickinson 1968; Fraser 1979). The lesion profile is stable over

a wide range of inoculated doses, but influenced by the route of inoculation. It is possible on the basis of the lesion profile only to differentiate between scrapie virino strains propagated in a constant mouse genotype. Noteworthy are also the wide differences in the pathology in the different selected combinations. They consist not only of different lesion profiles but also in the symmetry or asymmetry of the lesions, amyloid plaques formation, extent of gliocytosis and white matter damage. For example — spongiform encephalopathies were regarded as true poliо-encephalopathies, namely, disorders affecting exclusively they gray matter. The white matter was believed to have been destroyed only secondarily (Beck, Daniel 1979). From the work done by Fraser and his colleagues (Fraser 1979) it appeared that in murine scrapie (especially strains 79 A and 139 A) white matter vacuolization might be very severe. The white matter damage evolved quite independently from gray matter vacuolization, this leading to the suggestion of a different basis of both phenomena. They are not interrelated in the sense that white matter changes be considered as secondary only. Recent observations of the human scrapie counterpart, viz. CJD (Tateishi et al. 1979; Park 1980; Mizutami 1981) seemed to support the theory about much a larger diversity of pathology in transmissible spongiform encephalopathies that hitherto recognized. The topography of lesions due to 263 K strain of scrapie in hamster brains, with higher involvement of the brain stem structures and its rostral extensions but only limited changes in other brain areas are in striking contrast to the majority of published results concerning murine scrapie. For the majority of combinations of scrapie virino and strains of mouse the brain stem structures are affected to a much lesser degree than other brain areas. In some models, however, (87 A in C 57 Bl and VM, 22 A in C 57 Bl) the gray matter damage in the medulla is highly affected. On the other hand, in experimental CJD (Manuelidis, Manuelidis 1979) the brain stem and spinal cord manifested the highest degree of vacuolization.

The results of our "timing" experiment need only a few remarks. The first unequivocal signs of scrapie appeared in the 11th week after inoculation, and the brain stem, thalamus and hypothalamus were mostly affected. This corresponds to the results published by Marsh and Kimberlin (1975) who found microvacuolization of neuropil as the first scrapie-related pathological sign 11 weeks after inoculation. In their material, however, the hypertrophic astrocytes detected with Cajal gold sublimate were demonstrated as early as 9 weeks post inoculation. On the basis of their results one might speculate, that development of pathological lesions follows a quasi one-step mode of spreading. On the other hand, our results demonstrated that changes of mild intensity (no more than 2 grades) were possible to detect earlier, about 8 weeks after inoculation. This, in turn might suggest that the pathology of

scrapie (at least at the light microscopy level) reflects only steady accumulation of very limited changes, and not a one-step phenomenon. Detailed work with the usage of electron microscopy and immunohistochemistry are in progress in this laboratory to partly solve this problem.

NEUROPATHOLOGIA EKSPERYMENTALNEJ TRANSMISYJNEJ
ENCEFALOPATII GĄBCZASTEJ
(263 K SZCZEP SCRAPIE PASAŻOWANY PRZEZ ŻŁOTE CHOMIKI SYRYJSKIE)
I. STANDARDOWA PATOLOGIA I ROZWÓJ ZMIAN

Streszczenie

Badania przeprowadzono na złotych chomikach syryjskich, posługując się szczepem 263 K scrapie.

Pierwsze nie budzące wątpliwości neuropatologiczne wykładniki scrapie pojawiają się w 11 tygodniu po inokulacji, aczkolwiek bardziej subtelne zmiany można obserwować już w 8 tygodniu. Stwierdzono także tworzenie się obrazu tzw. „gliocytozy” w obrębie pnia mózgu i sąsiedztwie formacji hipokampa oraz formowanie się włókien Rosenthala, towarzyszące maksymalnemu nasileniu zmian.

Nasilenie zmian jest stopniowane począwszy od masywnego zajęcia struktur pnia mózgu oraz jego dogłównych przedłużeń, tj. wzgórze i podwzgórze, poprzez formację hipokampa, mózdzek, jądra kresomózgowia do kory mózgu.

НЕВРОПАТОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТРАНСМИССИОННОЙ ГУБЧАТОЙ
ЭНЦЕФАЛОПАТИИ (263 К ШТАММ SCRAPIE ПАССАЖИРОВАННЫЙ
ЗОЛОТЫМИ СИРИЙСКИМИ ХОМЯКАМИ).
I. СТАНДАРТНАЯ ПАТОЛОГИЯ И РАЗВИТИЕ ИЗМЕНЕНИЙ.

Резюме

Исследования были проведены с золотыми сирийскими хомяками, употребляя штамм 263 K scrapie.

Первые, не вызывающие сомнения, невропатологические показатели scrapie появляются на 11 неделе после инокуляции, хотя более тонкие изменения можно наблюдать уже на 8 неделе. Констатировано образование картины т. наз. „глиоцитоза” в области мозгового ствола и в соседстве формации гиппокампа, а также формирование волокон Розенталя, сопутствующее максимальной интенсивности изменений.

Интенсивность изменений градуирована, начиная от массивного захвата структур мозгового ствола и его удлинений идущих к голове — т. е. таламуса и гипоталамуса — через формацию гиппокампа, мозжечок и ядра конечного мозга к мозговой коре.

REFERENCES

1. Bastian F. O.: Spiroplasma-like inclusions in Creutzfeldt-Jakob disease. Arch. Neurol, 1979, 103, 665—670.
2. Beck E., Daniel P. M.: Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological lesions and their significance. [In:] Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 1. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow. Acad. Press, New York 1979, 253—270.

3. Brown P., Rohwer R. G., Moreau-Dubois M-C., Green E. M., Gajdusek D. C.: Use of Golden syrian hamster in study of scrapie virus. [In:] Hamster immune response in infectious and oncologic diseases. Eds. J. W. Streilein, D. A. Hart, J. Stein-Streilein, W. R. Duncan, R. E. Billingham. Plenum Press. New York, London 1981, 365—374.
4. Dickinson A. G.: Scarpie in sheep anda goats. [In:] Slow virus diseases of animals and man. Ed. R. H. Kimberlin. North-Holland, Amsterdam 1976, 210—241.
5. Dickinson A. G., Fraser H.: The pathogenesis of scrapie in inbred mice: an assesment of host control and response, involving many strains of agent. [In:] Slow virus infections. Eds. C. Van ter Meulen, M. Katz. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1977, 3—14.
6. Dickinson A. G., Outram G. W.: The scrapie replication — site hypothesis and its implications for pathogenesis. [In:] Slow transmissible diseases of the nervous system. Vol. 2. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow Acad. Press, New York 1979, 14—31.
7. Dickinson A. G., Outra G. W.: Operational limitations in the characterisation of the inefective units of scrapie. [In:] Unconventional viruses and central nervous system diseases. Ed. L. Court. Masson, Paris 1983 (in press).
8. Diener T. O.: Is the scrapie agent a viroid? *Nature New Biol.*, 1972, 272, 54—55.
9. Fraser H.: Neuropathology of scrapie: the precision of the lesions and their diversity. [In:] Slow transmissible diseases of the nervous system. vol. 1. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Acad. Press, New York 1979a, 387—406.
10. Fraser H.: Scrapie: a transmissible degenerative disease of the CNS. [In:] Progress in neurological research, with particular reference to motor neuron disease. Eds. P. O. Behan, F. C. Rose. Pitman Medical. London 1979b, 194—210.
11. Fraser H., Dickinson A. G.: The sequential development of the brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Pathol.*, 1968. 78, 301—311.
12. Gajdusek D. C.: Unconventional viruses and the origin and the disappearance of kuru. *Science*, 1977, 197, 943—960.
13. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M. P.: Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzee. *Nature*, 1966, 209, 794—796.
14. Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Earle K., Dammin G. J., Schoene G. J., Tyler H. R.: Transmission of subacute spongiform encephalopathy to chimpanzee and Squirrel monkey from a patient with papulosis atrophicans maligna of Köhlmeier-Degos. [In:] Proc. Int. Xth Vongr. of Neurology. Eds. A. Subirana, J. M. Espan-daler, E. H. Murrows, Excerpta Medica, Amsterdam 1974, 390—392.
15. Gibbs C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Alpers M. P., Beck E., Daniel P. M., Matthews W. B.: Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to chimpanzee. *Science*, 1968, 161, 388—389.
16. Gibson R. A., Hunter G. D.: Nature of the scrapie agent. *Nature*, 1967, 215, 1041—1043.
17. Goudsmit J., Morrow C. J., Gajdusek D. C., Asher D. M., Yanagihara R. T., Masters C. L., Gibbs C. J.: Evidence for and against the transmissibility of Alzheimer disease. *Neurology*, 1980, 30, 945—950.
18. Kimberlin R. H.: Scrapie agent: prions or virinos? *Nature*, 1982, 297, 107—108.
19. Malone T. G., Marsh R. F., Semancik J. S.: Evidence for the low molecular weight nature of the scrapie agent. *Nature* 1979, 278, 275—576.
20. Manuelidis E. E., Manuelidis L.: Observations on Creutzfeldt-Jakob disease propagated in small rodents. [In:] Slow transmissible diseases of the nervous system vol. 2. Eds S. B. Prusiner W. J. Hadlow, Academic Press, New York 1979, 147—173.

21. Manuelidis E. E., Gorgacz E. J., Manuelidis L.: Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease with scrapie-like syndrome to mice. *Nature*, 1978, 272, 778—779.
22. Marsh R. F., Hanson R. P.: On the origin of transmissible mink encephalopathy. [In:] *Slow transmissible diseases of the nervous system*, vol. 1. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Hadlow, Academic Press, New York, 1979, 451—460.
23. Marsh R. F., Kimberlin R. H.: Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J. Inf. Dis.*, 1975, 131, 104—110.
24. Masters C. L., Gajdusek D. C., Gibbs C. J.: The Gerstmann-Straussler syndrome and the various forms of amyloid plaques which occur in the transmissible spongiform encephalopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1980, 39, 374.
25. Mizutani T.: Neuropathology of Creutzfeldt-Jakob disease in Japan. With special references to the panencephalopathic type. *Acta Pathol. Jpn.*, 1981, 31, 903—922.
26. Outram G. W.: The pathogenesis of scrapie in mouse. [In:] *Slow virus infections of animals and man*. Ed. R. H. Kimberlin, North-Holland, Amsterdam 1976, 325—357.
27. Park T. S., Kleinman G. M., Richardson E. P.: Creutzfeldt-Jakob disease with extensive involvement of white matter. *Acta neuropath.*, (Berl.) 1980, 52, 239—262.
28. Prusiner S. B., Cochran S. P., Groth D., Grafm D. E., Baringer J. R., Hadlow W. J., Eklund C. M., Race R. E.: Evidence for hydrophobic domains of the scrapie agent. *Trans. Am. Neurol. Associat.*, 1972, 103, 1—3.
29. Prusiner S. B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 1982, 216, 136—144.
30. Tateishi J., Sato J., Koga M., Ohta M., Kuroiwa Y.: A transmissible variant of Creutzfeldt-Jakob disease with kuru plaques. [In:] *Slow transmissible diseases of the nervous system*, vol. 2. Eds. S. B. Prusiner, W. J. Haldlow. Academic Press, New York 1979 175—183.

Authors' address: Department of Neurology, Medical School, 22, Kopcińskiego Str., 90—153 Łódź

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, LUBOMIRA DYDYK, MIECZYSLAW SMIALEK

WCZESNE USZKODZENIA OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU ZWIĄZKAMI MANGANU

Zespół Neuropatologii i Pracownia Ultrastruktury Układu Nerwowego Centrum
Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Strukturalne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu mają zróżnicowany charakter i z reguły występują po długotrwałym kilkumiesięcznym podawaniu środków toksycznych (Pentschew i wsp. 1963; Mustaffa, Chandra 1971; Chandra 1972; Chandra, Shukla 1980). W znacznej większości przypadków dotyczą one formacji szarych i występują bądź w postaci zmian uogólnionych, przeważających w korze mózgu i mózdzku, bądź też selektywnie ograniczonych do struktur podkorowych, takich jak gałka biała, prążkowie, wzgórze, jądro niskowzgórzowe Luysa i substancja czarna (Makarzenko 1956; Pentschew i wsp. 1963; Neff i wsp. 1969; Jonderko 1970; Chandra, Srivastava 1970; Mustafa, Chandra 1971; Chandra 1972). W naszych poprzednich badaniach opisano zmiany patologiczne dotyczące przede wszystkim, jeśli nie wyłącznie, istoty białej mózgowia, z niewielkim tylko zajęciem formacji szarych (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1982). Miały one charakter uogólnionego zgąbczenia istoty białej z nieznacznym uszkodzeniem osłonek mielinowych i umiarkowanym włóknistym odczynem glejowym. Nieprawidłowości w strukturach szarych wyrażały się wybiórczym zwyrodnieniem i ubytkiem neuronów istoty czarnej oraz rozsianym zwyrodnieniem komórek nerwowych kory mózgu i mózdzku. Badania mikroskopowo-elektronowe ujawniły, że u podłoża zmian patologicznych stwierdzonych w mikroskopie świetlnym leżało masywne uszkodzenie mitochondriów włókien nerwowych we wszystkich ich odcinkach, włącznie z zakończeniami nerwowymi, prowadzące w skrajnych przypadkach do rozděcia aksonów. Dominującym nieprawidłowościom aksonalnym towarzyszyło obrzmienie astrocytów z cechami proliferacji cytoplazmatycznych elementów włóknienkowych. Zmiany te występowały u zwierząt,

które w celu ewentualnej eliminacji metalu nagromadzonego w ośrodkowym układzie nerwowym pozostawiano na jednomiesięczne przeżycie, po zakończeniu zatruwania trwającego przez 4 tygodnie (Hietanen i wsp. 1981). W celu prześledzenia ewolucji i dynamiki zmian przeprowadzono ich ocenę bezpośrednio po zatruciu.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono w identyczny sposób jak w poprzednich grupach doświadczalnych (Śmiałek, Mossakowski 1981). Szczury szczepu Wistar, samce w wieku 6 tyg. (ok. 150 g masy ciała) otrzymywały w okresie 4 tygodni 7 iniekcji dożylnych chlorku manganowego ($MnCl_2$) w fizjologicznym roztworze chlorku sodu. Pełna podana dawka środka toksycznego, w przeliczeniu na Mn^{++} , wynosiła 240 mg/kg masy ciała. Dwie pierwsze iniekcje w dawce po 20 mg Mn^{++} /kg masy ciała podano w odstępach jednodobowych, trzy dalsze po 40 mg Mn^{++} /kg masy ciała w dwudniowych odstępach w okresie jednego tygodnia, a dwie następne (40 mg Mn^{++} /kg ciężaru ciała) w odstępach jednotygodniowych. Zachowanie zwierząt w czasie zatruwania oraz ich śmiertelność nie różniły się od opisanych poprzednio (Śmiałek, Mossakowski 1981). Z ogólnej liczby 18 zwierząt w okresie prowadzenia doświadczenia 8 padło. Padały zazwyczaj albo w czasie podawania środka toksycznego, albo bezpośrednio po iniekcji. Przez cały okres doświadczenia zwierzęta nie wykazywały objawów neurologicznych. Stawały się jednak mniej ruchliwe, traciły łaknienie, a ich sierść była matowa. Zwierzęta podzielono na dwie grupy — pierwszą uśmiercano nazajutrz po ostatnim podaniu chlorku manganowego, a drugą po upływie 7 dni. W każdej grupie 3 szczury użyto do badań w mikroskopie świetlnym i po 2 — w mikroskopie elektronowym.

Zwierzęta przeznaczone do badań w mikroskopie świetlnym uśmiercano przez otwarcie klatki piersiowej i wykonanie przezsercowej perfuzji zubożonym do pH 7,2 10% roztworem formaliny. Perfuzję przeprowadzono pod ciśnieniem 80—100 mm Hg. Do badania pobierano mózgowie, które po wyjęciu z jamy czaszki krojono w płaszczyźnie czołowej na bloki, przechodzące na wysokość przednich i w pełni rozwiniętych zwojów podstawy, śródmózgowia, mostu z mózdzkiem i dolnego odcinka opuszki na pograniczu z rdzeniem kręgowym. Bloki tkankowe przeprowadzano do parafiny, a skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną-eozyną oraz według metod Klüvera-Barrery i Kanzler-Arendta.

U zwierząt przeznaczonych do badań mikroskopowo-elektronowych uśmiercanych w sposób identyczny perfuzję wykonywano przy użyciu 2% aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 7,3. Po wyjęciu mózgowia z jamy czaszki pobierano bloczki tkankowe z istoty białej półkul mózgu, z jąder kresomózgowia, wzgórze, istoty czarnej,

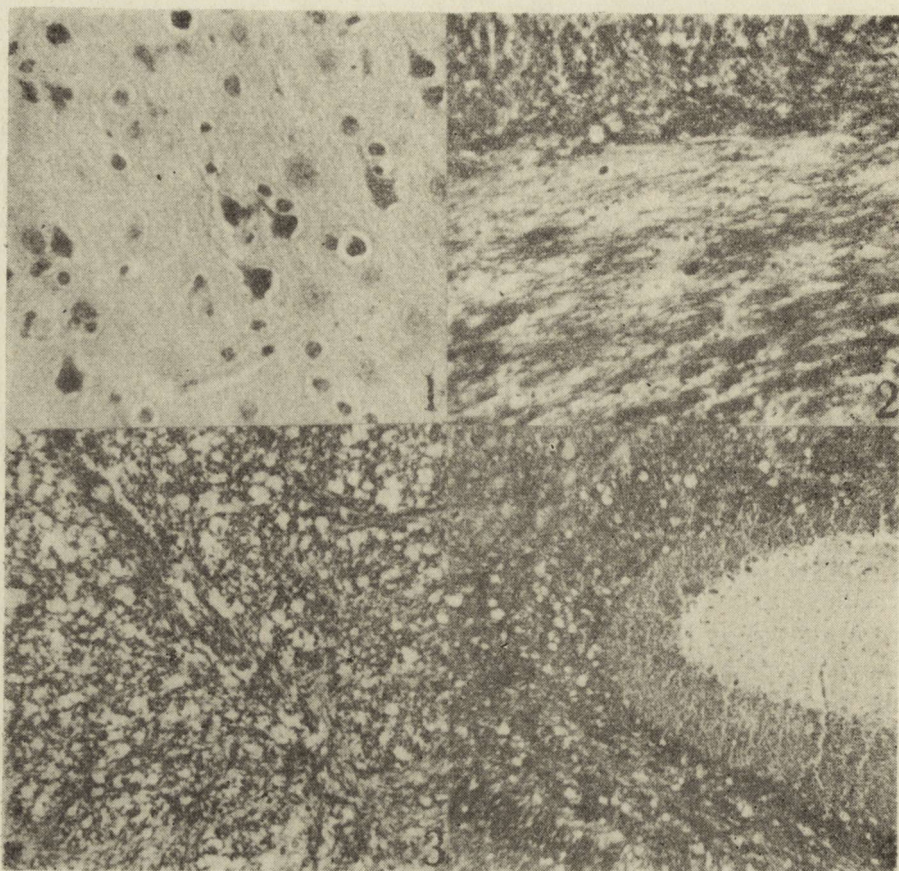
opuszki i istoty białej mózdzku. Błoczki płukano w 0,1 M buforze kakodylanowym przez 1 godz. Utrwalano je następnie dodatkowo przez okres 1 godz. w 2% czterotlenku osmu w 0,1 M buforze kakodylanowym, odwadniano w sposób rutynowy i zatapiano w Eponie 812. Półcienkie skrawki barwiono 1% błękitem toluidyny w 1% wodnym roztworze boraksu, a skrawki ultracienkie kontrastowano w octanie uranylu i cytrynianie ołowiu. Materiał oglądano w mikroskopie elektronowym firmy Jeol, JEM 7A.

WYNIKI

W obrazie makroskopowym mózgowia w obu grupach doświadczalnych nie stwierdzono nieprawidłowości strukturalnych.

Badanie mikroskopowe mózgow zwierząt grupy I ujawniło zmiany patologiczne zarówno w formacjach szarych, jak i białych, przy przewadze tych ostatnich. W korze czołowej i zakręcie hipokampa występowały nieliczne neurony obkurczone lub z cechami kwasochłonnego zwyrodnienia (ryc. 1). Były one obfitsze w korze mózdzku, gdzie wybiórczo dotyczyły komórek Purkinjego, oraz w strukturach formacji siatkowatej pnia mózgu, zwłaszcza opuszki. Obok neuronów obkurczonych, ciemnych stwierdzano niekiedy komórki nerwowe z cechami mikrowakuolizacji cytoplazmy. Zwyrodnienia komórek nerwowych nie stwierdzano w jądrach podstawy i we wzgórzu. Populacja komórkowa istoty czarnej była niezmieniona. Zmiany w istocie białej wyrażały się znacznym rozluźnieniem jej utkania, szczególnie wyraźnym w półkulach mózgu (ryc. 2), w powrózkach tylnych i bocznych górnego odcinka rdzenia kręgowego (ryc. 3) oraz obecnością licznych drobnych jamek, których zagęszczenia prowadziły do zgąbczenia tkanki. Ostro ograniczone, okrągłe lub owalne jamki występujące w istocie białej były w większości przypadków puste, rzadko tylko zawierały drobne, kwasochłonne, okrągłe struktury, mogące odpowiadać bądź jądom, bądź też obrzmiałym aksonom. Jamki te były stosunkowo nieliczne w istocie białej półkul mózgu, w tym również w pęczkach striopalidarnych. Znacznie obficie występowały w istocie białej mózdzku (ryc. 4), zarówno rdzennej, jak i blaszkowej oraz w zbitych strukturach pnia mózgu i rdzenia. W istocie białej mózdzku dochodziło do zlewania się ze sobą pojedynczych struktur jamkowych. W żadnym przypadku nie stwierdzono wykładników włóknistej reakcji gleju, jakkolwiek w istocie białej półkul populacja jąder glejowych widocznych w barwieniach przeglądowych była zwiększona.

W mózgow zwierząt grupy II zmiany komórkowe wykazywały również nieznaczne nasilenie, jakkolwiek były one bardziej uogólnione niż u zwierząt zabijanych w 24 godziny po zatruciu. Pojedyncze obkurczone neurony oraz komórki z cechami mikrowakuolizacji cytoplazmy wy-



Ryc. 1. I Grupa doświadczalna. Obkurczone, kwasochłonne neurony rozsiane w korze czołowej. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 1. Experimental group I. Shrunken eosinophilic neurons dispersed in the frontal cortex. H—E. × 400

Ryc. 2. I Grupa doświadczalna. Zblednięcie osłonek mielinowych oraz rozluźnienie utkania podkorowej istoty białej. Pojedyncze jamki na granicy kory mózgu. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 2. Experimental group I. Palor and loosening of the subcortical white matter. Some vacuoles seen in the cortico-subcortical junction. Klüver-Barrera. × 200

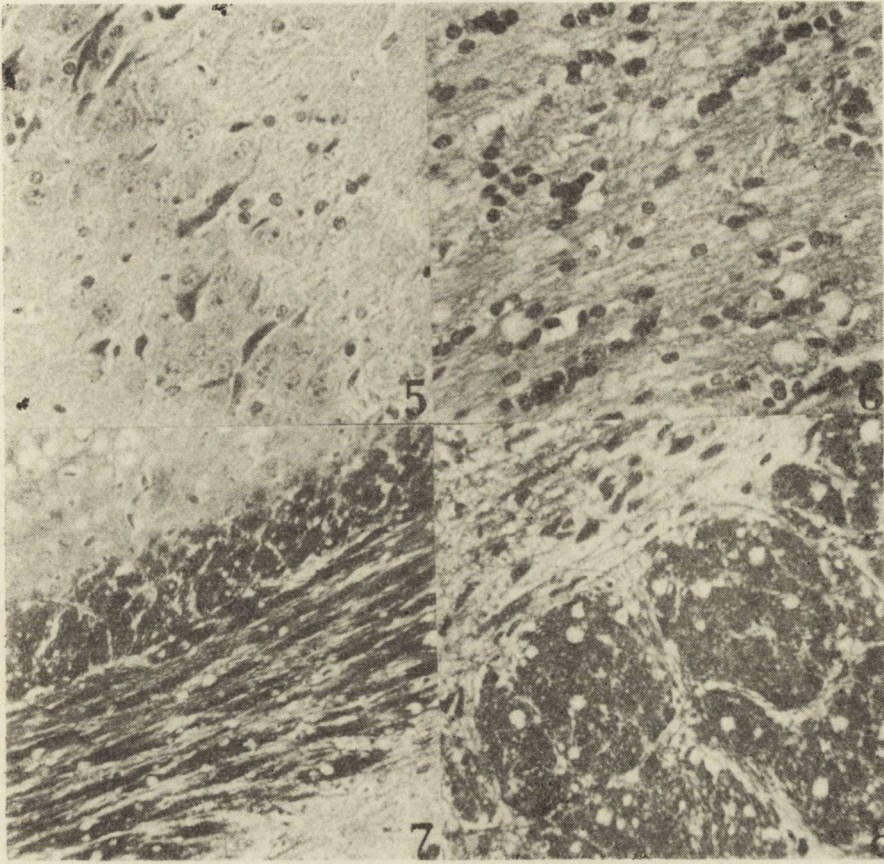
Ryc. 3. I Grupa doświadczalna. Znaczne rozluźnienie utkania powrózka tylnego w rdzeniu szyjnym. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 3. Experimental group I. Severe disintegration of the posterior funiculi of the cervical spinal cord. Klüver-Barrera. × 200

Ryc. 4. I Grupa doświadczalna. Liczne jamki w istocie białej mózdzku. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 4. Experimental group I. Abundant vacuolization of the cerebellar white matter. Klüver-Barrera. × 200

stępowały w korze nowej i w korze zakrętu hipokampa (ryc. 5) oraz w jądrach podstawy, wzgórz i w strukturach komórkowych pnia mózgu. Były one liczniejsze wśród komórek Purkinjego. Nasilenie zmian



Ryc. 5. II Grupa doświadczalna. Kwasochłonne neurony rozsiane w warstwie piramidowej rogu Amona. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 5. Experimental group II. Eosinophilic neurons dispersed in the pyramidal cell layer of Ammon's horn. H—E. × 400

Ryc. 6. II Grupa doświadczalna. Nieznaczne rozluźnienie utkania istoty białej z widocznymi drobnymi jamkami i niewielkie pomnożenie jąder gleju. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 6. Experimental group II. Slight loosening of the subcortical white matter with microcavitation and moderate glial proliferation. H—E. × 400

Ryc. 7. II Grupa doświadczalna. Rozsiane jamki w prawidłowej poza tym podkorowej istocie białej. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 7. Experimental group II. Delicate microcavitation of otherwise normal subcortical white matter. Klüver-Barrera. × 200

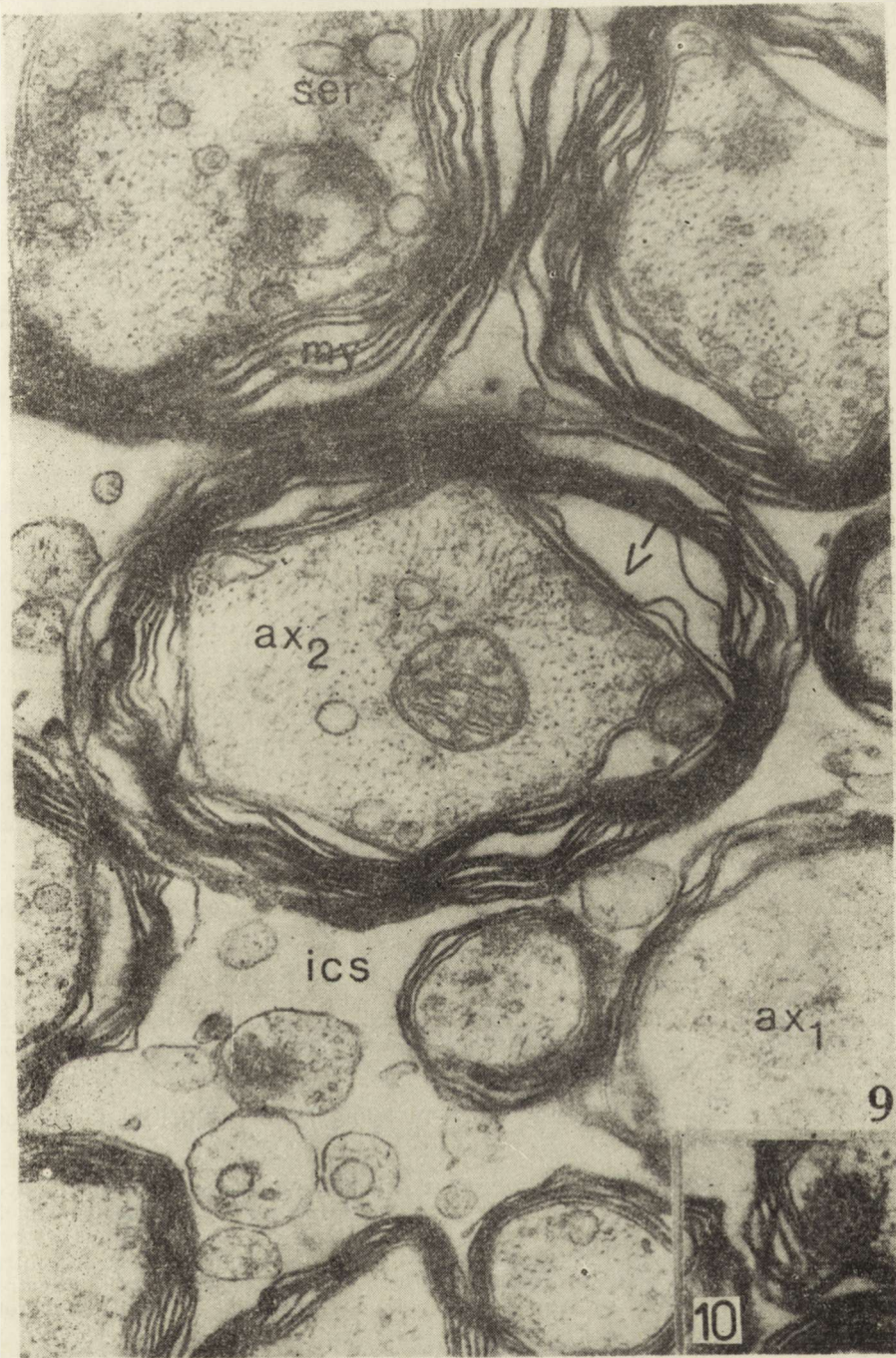
Ryc. 8. II Grupa doświadczalna. Rozsiane jamki w szlakach piramidowych mostu. Klüver-Barrera. Pow. 200 ×

Fig. 8. Experimental group II. Microvacuoles dispersed in the pyramidal fibers in the pons. Klüver-Barrera. × 200

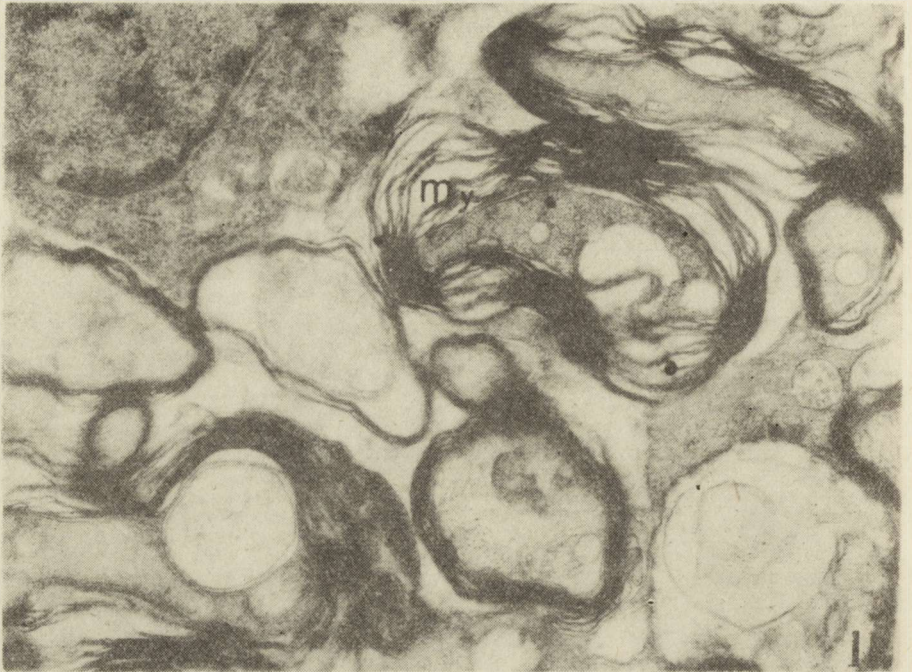
w istocie czarnej nie różniło się od pozostałych formacji szarych. W dolnych warstwach kory mózgu, we wzgórzu, formacji siatkowatej pnia mózgu i w rogach przednich rdzenia kręgowego występowały nieliczne jamki, nie różniące się od opisanych w poprzedniej grupie w istocie

białej. Rozluźnienie utkania istoty białej było wyraźnie mniejsze niż w grupie zwierząt zabijanych w 24 godziny po zatruciu (ryc. 6); utrzymywało się ono przede wszystkim w pęczkach rdzenia szyjnego. Natomiast ilość drobnojamkowych struktur była większa. Występowały one wyraźniej niż poprzednio w podkorowej istocie białej półkul mózgu (ryc. 7) w pęczkach striopalidarnych, w formacjach pnia (ryc. 8) i w półkulach mózdzku. Stwierdzano niewielkie namnożenie jąder glejowych w istocie białej, bez wyraźnego włóknistego odczynu glejowego.

W obrazie mikroskopowo-elektronowym istoty białej mózgu zwierząt grupy pierwszej zmiany patologiczne wyróżniały się znacznym poszerzeniem przestrzeni międzykomórkowych, nieprawidłowościami ultrastruktury aksonów, przy mniej zaawansowanym zajęciu osłonek mielinowych oraz znacznie nasilonymi uszkodzeniami astrocytów. Ultrastrukturalne zmiany w aksonach polegały z jednej strony na rozrzedzeniu i przejaśnieniu aksoplazmy z namnożeniem poszerzonych zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej i neurofilamentów oraz nagromadzeniem nieobłonionych struktur o znacznej gęstości elektronowej, z drugiej zaś na jej wyraźnej kondensacji (ryc. 9, 10, 11). Przeważająca większość aksonalnych mitochondriów wykazywała różnego stopnia obrzmienie. Ich macierz była przejaśniona, grzebienie skrócone i przemieszczone na obwód. Dochodziło nierzadko do fragmentacji grzebieni mitochondrialnych i do pojawiania się w nich struktur tubularnych oraz pęcherzykowych (ryc. 12). Nierzadko stwierdzano skondensowaną konfigurację mitochondriów. Stopień obrzmienia mitochondriów był zróżnicowany, w skrajnych sytuacjach balonowate struktury otoczone podwójną błoną wypełniały całkowicie przekrój poszerzonego aksonu (ryc. 13). Osłonki mielinowe utrzymywały w większości swoją prawidłową strukturę. Dochodziło jednak do odcinkowego rozwarstwienia blaszek mielin i do wyraźnego poszerzenia przestrzeni okołoaksonalnych zawartych między aksolemmą i okołoaksonalną blaszką mielinową (ryc. 9). Opisane powyżej nieprawidłowości aksonalne występowały również w ich zakończeniach. Obserwowano tu ponadto obrzmienie synatoplazmy oraz nieprawidłowości w układzie pęcherzyków synaptycznych przemieszczonych w stosunku do zagęszczeń presynaptycznych, bądź też zbitych w nieregularne agregaty (ryc. 14). Większość astrocytów wykazywała znacznego stopnia przejaśnienie cytoplazmy perykariowej i wypustkowej oraz zmniejszenie ilości cytoplazmatycznych struktur subkomórkowych (ryc. 15, 16). Obecne były natomiast liczne poszerzone zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej. Mitochondria astrocytów wykazywały nieprawidłowości ultrastrukturalne identyczne jak opisane w wypustkach osiowych. Mikroskopowo-elektronowy obraz oligodendrocytów był stosunkowo mało zmieniony. Występowały tu jedynie obrzmiałe mitochondria. Zwracał jednak uwagę fakt, że w tej samej komórce obok mitochondriów w różnym stopniu obrzmiałych obecne były mitochondria o prawidłowej struk-



Ryc. 9. I Grupa doświadczalna. Fragment utkania prążkowiego. Widoczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowej (ics). Poszerzone są również przestrzenie okołoaaksonalne (strzałka). We fragmencie włókien nerwowych widoczne są aksony z jasną aksoplazmą (ax_1) oraz zawierające znaczną ilość struktur filamentarnych (ax_2); we wszystkich obecne są poszerzone zbiorniki gładkiej siateczki śródplazmatycznej



Ryc. 11. I Grupa doświadczalna. Fragment istoty białej mózdzku. Liczne aksony z zagęszczoną aksooplazmą, zawierającą znaczną ilość filamentów oraz obrzmiałe mitochondria. Odcinkowe rozwarstwienie osłonki mielinowej — my. Pow. 13.350 X
Fig. 11. Experimental group I. Tissue fragment from cerebellar white matter. Numerous axons with condensed axoplasm, with rich filamentous structures and swollen mitochondria. Local splitting of myelin lamellae — my. X 13 350

turze. Podobne nieprawidłowości stwierdzono w nielicznych uchwytynych w badanym materiale komórkach nerwowych. Ściany naczyń włosowatych otoczone przez obrzmiałe, przejaśnione wypustki astrocytów były na ogół niezmienione. W niektórych z nich można było dopatrywać się zwiększonej ilości pęcherzyków mikropinocytarnych w komórkach śródbłonka.

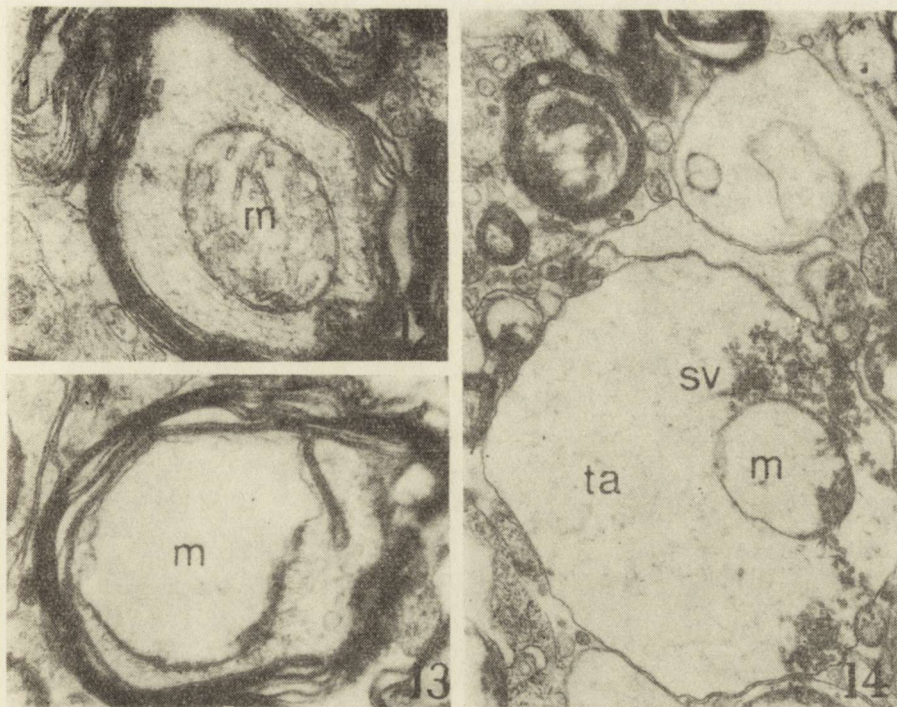
Obraz mikroskopowo-elektronowy mózgow zwierząt grupy II nie od-

(ser). W prawym górnym aksonie występują ponadto skupienia nieobłonionych elektronowo-gęstych ziarnistości. Odcinkowe rozwarstwienie blaszek osłonki mielinowej — my. Pow. 26.700 X

Fig. 9. Experimental group I. Tissue fragment from the putamen. Enlarged intracellular spaces (ics). Among visible nerve fibers there are axons with electron lucent axoplasm (ax₁) and containing great amount of filaments (ax₂). Numerous distended cisterns of smooth endoplasmic reticulum (ser) are present in most of axonal profiles. In the right upper corner an axon containing unbound groups of electron-dense, granular material. Splitting of myelin lamellae — my. X 26 700

Ryc. 10. I Grupa doświadczalna. We fragmencie aksonu pochodzącego ze wzgórza widoczne nieobłonione ugrupowanie elektronowo-gęstego materiału ziarnistego. Pow. 27.900 X

Fig. 10. Experimental group I. In the fragment of axon from the thalamus, a small group of an unbound electron-dense granular material is visible. X 27 900



Ryc. 12. I Grupa doświadczalna. Zmielinizowane włókno nerwowe z opuszki, zawierające mitochondrium o jasnej macierzy i pofragmentowanych grzebieniach. Pow. 13650 \times

Fig. 12. Experimental group I. Myelinated nerve fiber from the medulla containing mitochondrium with a light matrix and fragmented cristae. \times 13650

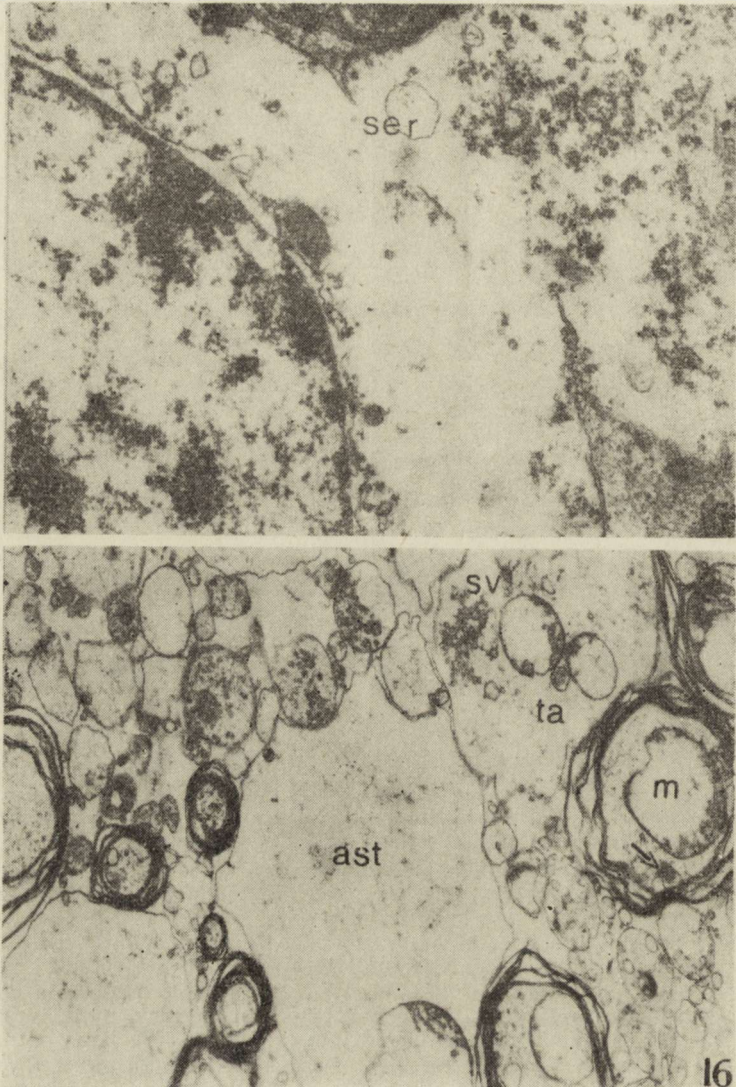
Ryc. 13. I Grupa doświadczalna. Zmielinizowane włókno nerwowe z opuszki, zawierające spęczniałe mitochondrium, wypełniające niemal cały przekrój aksonu. Pow. 13650 \times

Fig. 13. Experimental group I. Myelinated nerve fiber containing, greatly swollen mitochondrium, which occupies almost totally the axon's section. \times 13650

Ryc. 14. I Grupa doświadczalna. Fragment istoty czarnej. Obrzmiałe zakończenie aksonalne z jasną cytoplazmą (ta), agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv) i obrzmiałym mitochondriem (m). Pow. 8900 \times

Fig. 14. Experimental group I. Tissue fragment from substantia nigra. Swollen axon terminal (ta) with light cytoplasm, aggregation of synaptic vesicles (sv) and swollen mitochondrium (m). 8900 \times

biegał istotnie od opisanego w grupie I (ryc. 17, 18). W szczególności odnosiło się to do nieprawidłowości aksonalnych i mielinowych. Wydaje się jedynie, że zmiany mitochondriów były bardziej nasilone. Obficie występowały aksony wypełnione balonowatymi strukturami skrajnie obrzmiałych mitochondriów. Wyraźnie mniejsze było poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych. W astrocytach, obok przejaśnienia i zubożenia ich cytoplazmy oraz opisanych uprzednio nieprawidłowości w strukturze mitochondriów, występowało obfite nagromadzenie gliofilamentów, obecnych zarówno w cytoplazmie perykarialnej jak i wypustkowej (ryc. 19).

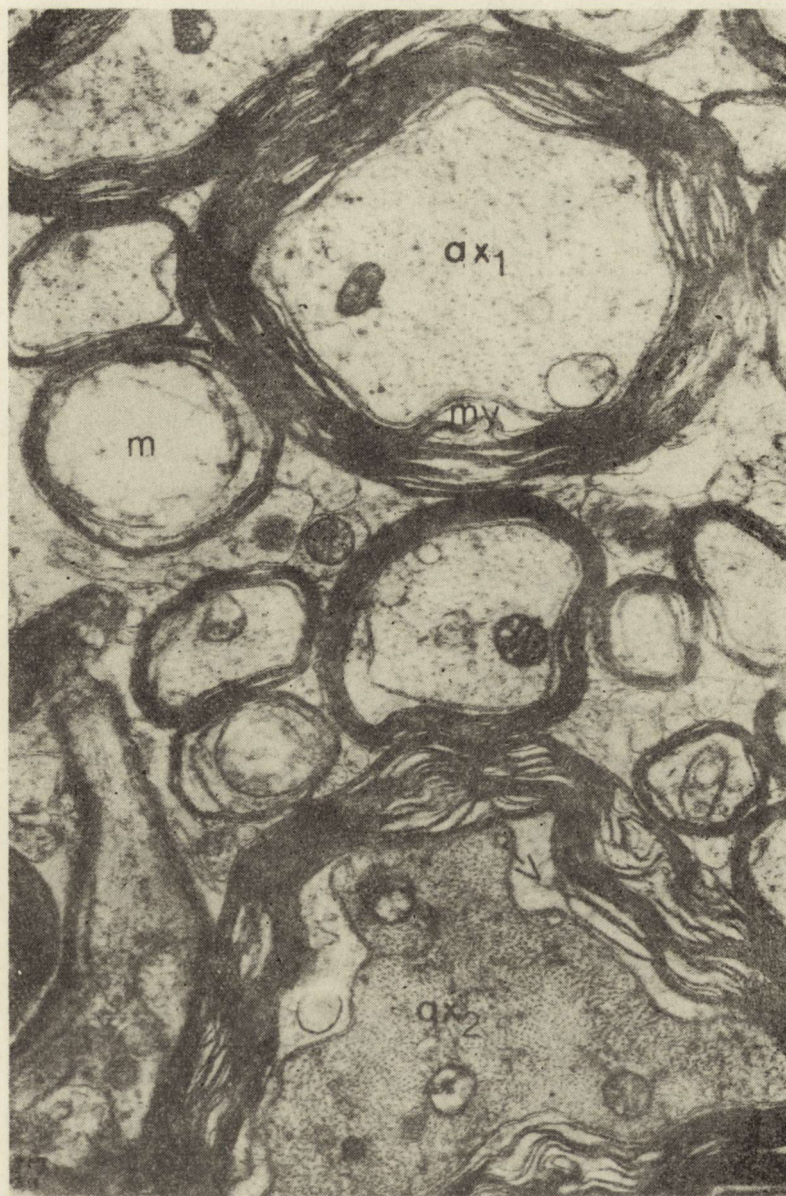


Ryc. 15. I Grupa doświadczalna. Fragment astrocytu z istoty białej mózdzku o obrzmiałej cytoplazmie z licznymi poszerzonymi zbiornikami gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser). Pow. 13350 ×

Fig. 15. Experimental group I. Fragment of astrocyte from the cerebellar white matter, with swollen cytoplasm, containing distended cisterns of smooth endoplasmic reticulum (sr). Pow. 13350 ×

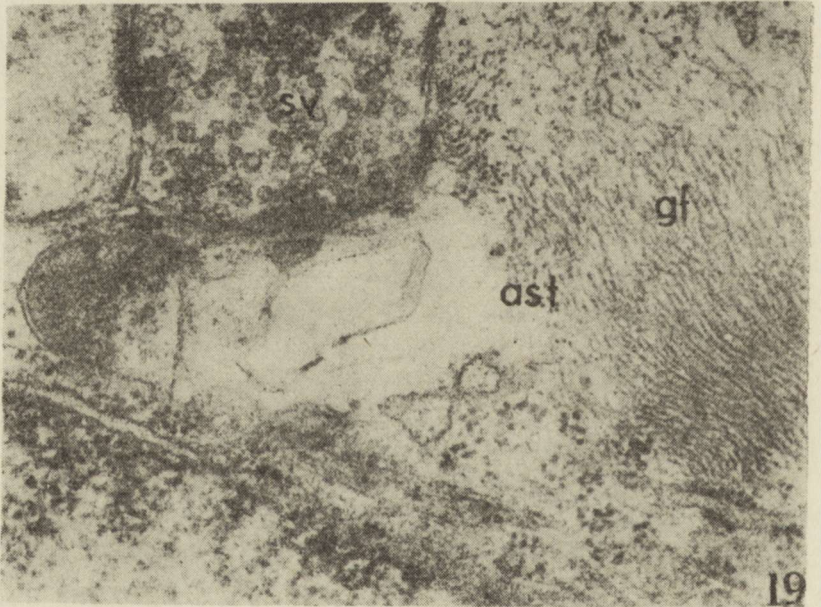
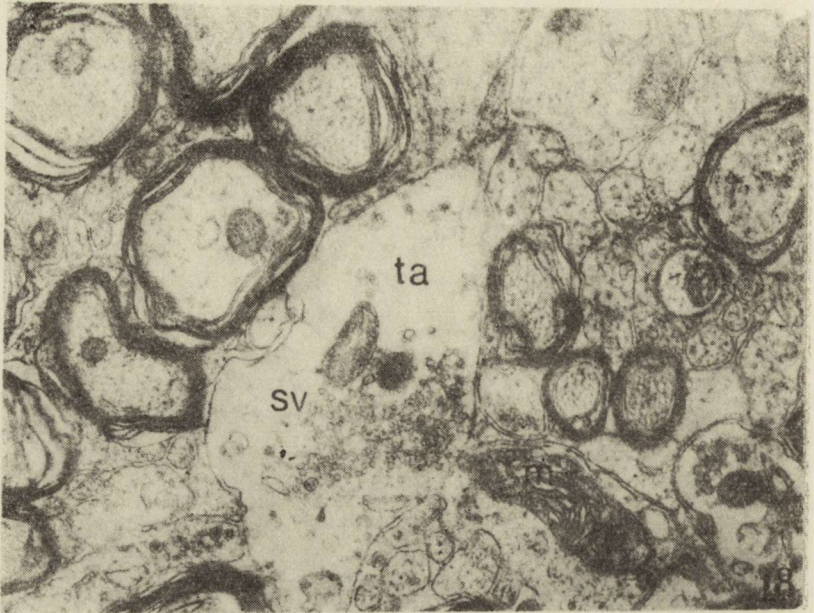
Ryc. 16. I Grupa doświadczalna. Fragment z prążkowie. Wypustka astrocytu (ast) o bardzo obrzmiałej cytoplazmie. Akson końcowy (ta) z małą gęstością elektronową cytoplazmy i agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv). Obrzmiałe mitochondrium (m) wypełnia znaczną część przekroju aksonu. Strzałka wskazuje na elektronowo-gęste skupienie ziarnistej substancji w aksoplazmie. Pow. 13350 ×

Fig. 16. Experimental group I. Tissue fragment from putamen. Astrocytic process (ast) with greatly swollen cytoplasm. Axon terminal (ta) with light cytoplasm and synaptic vesicles aggregation (sv). Swollen mitochondrion (m) occupying great portion of axonal section. Arrow pointing at small aggregation of electron dense granular material. 13350 ×



Ryc. 17. II Grupa doświadczalna. Fragment podkorowej istoty białej. Większość widocznych włókien nerwowych wykazuje nieprawidłowości strukturalne. Akson o niskiej gęstości elektronowej aksoplazmy — ax_1 , obok akson o bardzo znacznym zagęszczeniu aksoplazmy z bardzo licznymi neurofilamentami — ax_2 ; odcinkowe rozwarstwienie osłonki mielinowej — my . Strzałka wskazuje poszerzenie przestrzeni okołoaksonalnej. Balonowate rozdęte mitochondrium (m) wypełnia całkowicie aksonalną sekcję. Pow. 13650 \times

Fig. 17. Experimental group II. Tissue fragment of the subcortical white matter. Most of visible nerve fibres reveal ultrastructural abnormalities; ax_1 — an axon with electron light cytoplasm; my — local splitting of myelin lamellae; ax_2 — an axon with condense axoplasm filled with rich neurofilaments. Arrow points at widened periaxonal space; m — balloon-like distended mitochondrion filling totally axonal section. 13650 \times



Ryc. 18. II Grupa doświadczalna. Fragment istoty czarnej. Zakończenie aksonalne (ta) z obrzniętą cytoplazmą i agregacją pęcherzyków synaptycznych (sv); m — mitochondrium z macierzą o znacznej gęstości elektronowej. Pow. 13350 X

Fig. 18. Experimental group II. Tissue fragment from substantia nigra. Axonal terminal (ta) with moderate swelling of cytoplasm and aggregation of synaptic vesicles (sv); m — mitochondrium with electron-dense matrix. 13350 X

Ryc. 19. II Grupa doświadczalna. Fragment prążkownia. Wypustka astrocytu (ast) wypełniona licznymi gliofilamentami (gf); sv — niezmiernie zakończenie aksonu wypełnione pęcherzykami synaptycznymi. Pow. 13350 X

Fig. 19. Experimental group II. Tissue fragment from putamen. Astrocytic process (ast) filled with rich gliofilaments (gf); sv — unchanged axonal terminal with synaptic vesicles. 13350 X

OMÓWIENIE

Zasadniczy wzorec mikroskopowych i mikroskopowo-elektronowych nieprawidłowości tkankowych był wspólny dla obu wczesnych grup doświadczalnych i grupy zwierząt badanych po upływie 4 tygodni od zatrucia (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski i wsp. 1982). Dominowało zajęcie istoty białej z charakterystycznym obrazem zmian mikroskopowych i mikroskopowo-elektronowych oraz stosunkowo nieznaczne zajęcie formacji szarych. W obu strukturach występowały jednak pewne odrębności morfologiczne, pozwalające na próbę określenia dynamiki procesu i jego sekwencji czasowych.

W najwcześniejszej grupie doświadczalnej, w obrazie mikroskopowym istoty białej dominowało uogólnione rozluźnienie jej utkania, stanowiące niewątpliwy wykładnik obrzęku. Znajdowało to potwierdzenie w obrazie mikroskopowo-elektronowym w postaci poszerzenia przestrzeni międzykomórkowych i znacznego obrzmienia astrocytów. W grupie z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu rozluźnienie istoty białej, aczkolwiek utrzymujące się nadal, było wyraźnie mniejsze, czemu w badaniu mikroskopowo-elektronowym odpowiadał brak lub tylko nieznaczne poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych przy utrzymującym się obrzmieniu perykarioidalnej i wypustkowej cytoplazmy astrocytów. W obu wczesnych grupach nie spostrzegano mikroskopowych wykładników włóknistej reakcji glejowej, jakkolwiek u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu występowały już zmiany świadczące o śródplazmatycznej proliferacji gliofilamentów w astrocytach. W grupie z najdłuższym przeżyciem po zatruciu, w której nie spostrzegano w ogóle cech rozluźnienia utkania istoty białej, wyraźna była fibroglejoza, a w badaniu mikroskopowo-elektronowym poszerzenie przestrzeni międzykomórkowych należało do rzadkości, obrzmienie astrocytów było mniejsze w porównaniu do grup wcześniejszych, a w znacznej części komórek gleju gwiaździstego cytoplazma perykarioidalna i wypustkowa zawierała obfite nagromadzenie gliofilamentów (Mossakowski i wsp. 1982). Analogiczny przebieg czasowy wykazywały, nieznaczne zresztą, zmiany w ścianach naczyń włosowatych istoty białej. Niewielkiego stopnia nagromadzenie pęcherzyków mikropinocytarnych w komórkach śródbłonna stwierdzano jedynie u zwierząt z najkrótszym przeżyciem po zatruciu.

Diametralnie różną dynamikę wykazywały główne nieprawidłowości tkankowe istoty białej, występujące w postaci jej zgąbczenia, stanowiącego następstwo nagromadzenia się w niej drobnych, o różnym stopniu zagęszczenia, jamek. Wykazywały one wyraźną progresję czasową, będąc najmniej nasilone w najwcześniejszej grupie doświadczalnej, wyraźniejsze u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem po zatruciu, a najbardziej zaawansowane w „późnej” grupie doświadczalnej.

Zakładając, że uszkodzenia istoty białej obserwowane u zwierząt z 4-tygodniowym przeżyciem po zakończeniu zatrucia, mają mikro-

skopowo-elektronowe cechy obrzęku cytotoksycznego z nieznacznym tylko komponentem naczyniopochodnym, należy przyjąć, że we wczesnych grupach doświadczalnych dominują morfologiczne wykładniki obrzęku naczyniopochodnego, z narastającymi w czasie elementami obrzęku cytotoksycznego. Zatrucie chlorkiem manganowym prowadziłoby więc we wstępnej fazie do naczyniopochodnego obrzęku tkanki, przekształcającego się następnie w obrzęk cytotoksyczny, zbliżony w swoim obrazie morfologicznym do zmian stanowiących następstwo zatrucia cyjankami (Hirano i wsp. 1967) i fosforoorganicznymi pestycydami (Zelman 1977; Zelman, Majdecki 1979). Za taką sekwencją zmian obok struktury uszkodzeń tkankowych przemawiać może dodatkowo występowanie niewielkich wprawdzie, ale wyraźnych nieprawidłowości w obrazie naczyń włosowatych, ograniczonych do najwcześniejszej grupy doświadczalnej. O słuszności tej hipotezy zadecydują badania przepuszczalności naczyń z użyciem znaczników barierowych, przeprowadzone w czasie i w różnych okresach po zatruciu. W tym kontekście włóknisty odczyn glejowy narastający w zatruciu stanowiłby następstwo wcześniejszego obrzęku naczyniopochodnego (Rubinstein i wsp. 1962; Klatzo 1968). W świetle porównawczej analizy obrazów występujących w różnym czasie po zatruciu chlorkiem manganowym należy przyjąć, że reakcja obrzękowa tkanki ma charakter mieszany, o różnej w akcentacji jej dwóch komponentów. Ich wzajemne zależności przyczynowe, o ile istnieją w ogóle, są trudne do określenia. Wydaje się mało prawdopodobne, aby nieprawidłowości aksonalne, stanowiące zasadniczy element cytotoksycznego obrzęku w naszym materiale były następstwem obrzęku naczyniopochodnego, jakkolwiek atrakcyjne wydaje się wiązanie preferencji uszkodzeń aksonalnych w istocie białej z rozwojem dominującego w niej wcześniej obrzęku naczyniopochodnego. Uszkodzeń tego typu nie obserwowano w obrzęku naczyniopochodnym wywołanym przez inne czynniki patogenetyczne. Narastają one w czasie cofania się obrzęku naczyniopochodnego, który prowadzi zresztą w pierwszej kolejności do uszkodzenia osłonek mielinowych (Klatzo 1968), niezmiennych lub wykazujących nieznaczące nieprawidłowości w przedstawionym materiale. Wydaje się przeto, że u podłoża uszkodzeń aksonalnych, stanowiących mikroskopowo-elektronowy odpowiednik zgąbczenia istoty białej leży pierwotne uszkodzenie mitochondriów związane z bezpośrednim działaniem manganu. Liczne badania biochemiczne i histochemiczne nad doświadczalnym zatruciem manganem wskazują na znaczne obniżenie aktywności enzymów mitochondrialnych (Chandra 1972; Seth, Husain 1974; Sigh i wsp. 1974; Situramayya i wsp. 1974; Hietanen i wsp. 1981), a wybiórcze powinowactwo manganu do mitochondriów może być związane z obfitym jego gromadzeniem się w tych właśnie strukturach subkomórkowych w mózgu w warunkach prawidłowych (Cotzias 1958). Sprawą otwartą pozostaje natomiast wybiórcza wrażliwość mitochondriów aksonalnych i astrocy-

tarnych istoty białej, przy znacznie mniejszej, jak można sądzić z obrazów mikroskopowo-elektronowych, wrażliwości perykaryalnych mitochondriów komórek nerwowych i oligodendrocytów. Nie wyjaśnioną kwestią pozostaje również narastanie uszkodzeń aksonalnych po przebytym zatruciu, w okresie gdy — wnosząc z badań Hietanena i wsp. (1981) — dochodzi do stopniowego zmniejszania się zawartości metalu w mózgu. To samo dotyczy zresztą uszkodzeń istoty czarnej, nieobecnych w grupie najwcześniejszej, nieznacznych u zwierząt z 7-dniowym przeżyciem, a wyraźnych u zwierząt zabijanych po upływie 4 tygodni od zatrucia (Śmiałek, Mossakowski 1981). Być może taka właśnie dynamika zmian stanowi wykładnik tzw. zjawiska dojrzewania procesu patologicznego, opisanego przez Klatzo (1975) w warunkach niedokrwienia mózgu, a stanowiącego — jak się wydaje — ogólną prawidłowość reakcji tkanki nerwowej na działanie różnorodnych czynników uszkodzających.

Opisane przez nas zmiany, zarówno w grupach wczesnych, jak i później, różnią się zasadniczo od znanych z piśmiennictwa (Pentschew i wsp. 1963; Neff i wsp. 1969; Chandra, Srivastava 1970; Chandra 1972) dotyczącego uszkodzeń tkankowych mózgu w zatruciu związkami manganu, swoją wybiórczością, a co najmniej przewagą zajęcia istoty białej oraz czasem występowania. Jak wspomniano poprzednio, niezależnie od drogi podania, ogólnej i jednostkowej dawki oraz rodzaju związku chemicznego manganu, mózgowe uszkodzenia tkankowe dotyczyły przede wszystkim struktur szarych i rozwijały się po wielomiesięcznym zatruciu. Sigh i wsp. (1974) po zatruciu szczurów siarczanem manganu przez okres 25 dni nie stwierdzali w ogóle zmian patologicznych w mózgu uchwytanych w badaniach mikroskopowych. Nie istnieje przy tym możliwość porównania nieprawidłowości ultrastrukturalnych, gdyż w dostępnym piśmiennictwie nie spotkaliśmy mikroskopowo-elektronowych opracowań encefalopatii manganowej.

*

Podziękowanie

Autorzy dziękują Paniom Teresie Bok, Renacie Wojdzie i Wandzie Ciesielskiej za bardzo staranną pomoc techniczną.

РАННЕЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ СОЕДИНЕНИЯМИ МАРГАНЦА

Резюме

Охарактеризовано ранние патоморфологические изменения в центральной нервной системе у крыс, развивающиеся вследствие отравления хлористым марганцем, вводимым внутривенно в периоде 4 недель, в общей дозе 240 г $Mn^{++}/кг$ веса тела. Предметом исследований были головной и спинной мозги животных убиваемых непосредственно или по истечении 1 недели от введения полной дозы токсичного вещества. Констатированные изменения были сопоставлены с повреждениями выступающими после месячного переживания с момента отравления (Моссаковски и сотр., 1982).

Ранние морфологические изменения выражались умеренной неспецифической дегенерацией нервных клеток, без уловимого локализационного предпочтения, и обобщенным отеком белого вещества, подтвержденным в оптическом и электронном микроскопах. Отечным изменениям белого вещества в раннем периоде не сопутствовала фибринозная глиозная реакция. Но ее незначительные показатели уловимы исключительно в электронном микроскопе появлялись у животных убитых по истечении недели от отравления. Характерный для поздней группы пороз белого вещества животных, убитых непосредственно после отравления, был незначителен и ограничивался в основном к структурам ромбовидного моста и спинного мозга. Этот пороз, усиливаясь и обобщаясь у животных убиваемых спустя 7 дней от отравления, не достигал однако протяженности и интенсивности констатированной в поздней группе. В электронно-микроскопной картине преобладало усиливающееся с течением времени повреждение аксонов, выражающееся изменениями электронной плотности аксоплазмы, ростом содержания нейрофиламентов и тяжелой дегенерацией митохондрий который ведет к их шаровидному вздутию. Такой же тип митохондриальных повреждений выступал в аксональных окончаниях и в опухших астроцитах при относительно неизменных митохондриях перикарионов нервных клеток и олигодендроглии.

На основании анализа невропатологической картины авторы выдвинули гипотезу о двухфазном характере повреждений нервной системы. Первую фазу составляет обобщенный вазогенный отек, а вторую фазу — цитотоксический отек, связанный с селективными повреждениями митохондрий.

EARLY LESIONS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN EXPERIMENTAL MANGANESE INTOXICATION

Summary

Early morphological alterations of the central nervous system in rats due to manganese chloride intoxication were characterized. The animals were intoxicated in the course of 4 weeks by intravenous administration of manganese chloride in a total dosis of 240 g Mn⁺⁺/kg of body weight. The animals were killed either immediately or 7 days after the last injection of the toxic substance. The morphological abnormalities of the central nervous system were compared with those found in animals surviving 1 month after intoxication (Mossakowski et al. 1982).

Contrary to the late group, the early alterations consisted of a mild non-specific degeneration of neurons, spread over the gray structures with no topographic predilection and of generalized, decreasing in time, brain edema of the white structures, confirmed in both light and electron microscopy. In the earliest group of animals the white matter edema was not accompanied by fibrous glial reaction, the slight traces of which appeared in animals killed 7 days following intoxication. Spongy degeneration of the white matter, typical for the late group, in animals killed immediately after intoxication, was mild and practically limited to hindbrain structures and spinal cord. Becoming more spread and intensive in animals sacrificed 7 days later it never reached the severity observed in animals killed after one month survival. The most striking feature of the electron microscopic picture consisted in severe axonal abnormalities, taking the form of increased electron density of axoplasm, enhanced content of neurofilaments and severe mitochondrial degeneration. Mitochondrial swelling led to the formation of giant balloon-like structures. The same mitochondrial abnormality was present in axonal endings and in swollen astrocytes. Neuronal perikarya and oligodendrocytes were relatively normal.

Basing on the above observations it was postulated that manganese intoxication has been resulting in the biphasic central nervous system alteration. The first

phase consisted in generalized vasogenic brain edema, while the second one was expressed by cytotoxic edema of the white matter due to massive mitochondrial abnormalities.

PISMIENNICTWO

1. Chandra S. V.: Histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 29—38.
2. Chandra S. V., Shukla S. G.: Effect of manganese on synthesis of brain catecholamines in growing rat. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1981, 48, 449—454.
3. Chandra S. V., Srivastava S. P.: Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese chloride. *Acta Pharmac.*, (Kbh.) 1970, 28, 177—183.
4. Cotzias G. C.: Manganese in health and disease. *Physiol. Rev.*, 1958, 38, 503—506.
5. Hietanen E., Kilpio J., Savolainen H.: Neurochemical and biotransformational enzyme responses to manganese exposure in rats. *Acta Environm. Contam. Toxicol.*, 1981, 10, 339—345.
6. Hirano A., Levine S., Zimmerman H. M.: Experimental cyanide encephalopathy: electron microscopic observations of early lesions in white matter. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 28, 200—213.
7. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. Śląska Akademia Medyczna. Katowice 1970.
8. Klatzo I.: Brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—13.
9. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. [W:] „The Nervous system — The Basic Neurosciences”. Red. D. B. Tower, Raven Press. New York 1975, 313—322.
10. Makarczenko A. F.: Izmenienija nierwnoj sistiemy pri intoksikacyi margancem. AN USRR, Kijów 1956, 211—272.
11. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. IX. Inter. Congr. of Neuropathology, Vienna, September 5—10, 1982. Abstracts 78.
12. Mustafa S. J., Chandra S. V.: Levels of 5-hydroxytryptamine, dopamine and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.*, 1971, 18, 931—933.
13. Neff N. H., Barrett R. E., Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese administration in squirrel monkeys. *Experientia*, 1969, 25, 1140—1141.
14. Pentschew A., Ebner F. F., Kovatch R. M.: Experimental manganese encephalopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1963, 22, 488—496.
15. Rubinstein L. J., Klatzo I., Miquel J.: Histochemical observations on oxidative enzyme activity in glial cells in a local brain injury. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1962, 21, 116—128.
16. Seth P. K., Husain R.: *In vitro* inhibition of succinate dehydrogenase by manganese and its reversal by chelating agents. *Environ. Physiol. Biochem.*, 1974, 4, 176—180.
17. Singh J., Husain R., Tandon S. K., Seth P. K., Chandra S. V.: Biochemical and histopathological alteration in early manganese toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, 1974, 4, 16—23.
18. Sitaramaya A., Nagar N., Chandra S. V.: Effect of manganese on enzymes in rat brain. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1974, 35, 185—190.

19. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Obraz neuropatologiczny mózgu szczura w zatruciu solami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.
20. Zelman I. B.: Patomorfologia mózgu szczura w doświadczalnym zatruciu fosforoorganicznym pestycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1977, 15, 516—522.
21. Zelman I. B., Majdecki T.: Zmiany ultrastrukturalne w mózgu szczurów po zatruciu fosforoorganicznym insektycydem dichlorfosem (DDVP). *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 443—453.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii CMDiK PAN, ul. Dworkowa 3, 00—784 Warszawa

BARBARA KOSICKA, TERESA E. BUGERA, ANDRZEJ CZŁONKOWSKI,
MIECZYŚLAW ŚMIAŁEK

WPŁYW DOŚWIADCZALNEGO ZATRUCIA CHLORKIEM
MANGANAWYM
NA POZIOM KWASU GAMMA-AMINOMASŁOWEGO (GABA)
I RECEPTOR DOPAMINERGICZNY D-2 W MÓZGU SZCZURA

DONIESIENIE WSTĘPNE

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa
Zakład Farmakologii Doświadczalnej Instytutu Nauk Fizjologicznych AM,
Warszawa

Toksyczne działanie związków manganu na ośrodkowy układ nerwowy znane jest od dawna. Doświadczenia kliniczne w tym zakresie związane są przede wszystkim z zatruciami przemysłowymi (Rodier 1955; Mena i wsp. 1967; Sarić i wsp. 1977). Większość autorów zwraca przy tym uwagę na dominujący w obrazie klinicznym zespół pozapiramidowy, przypominający objawy choroby Parkinsona (Banta, Markesbery 1977; Krigman 1978), jakkolwiek obraz neuropatologiczny, znany z nielicznych opisanych przypadków, zbliżony jest bardziej do zmian charakterystycznych dla zwyrodnienia wątrobowo-soczewkowego (Mena i wsp. 1967). Hornykiewicz (1972) wiązał występowanie parkinsonizmu manganowego z obniżeniem poziomu dopaminy. Koncepcję tę potwierdzają pomyslnie wyniki terapeutycznego stosowania lewo-dopy (Cook i wsp. 1974).

W doświadczalnym zatruciu związkami manganu u zwierząt nie obserwowano zespołu pozapiramidowego, a obraz neuropatologiczny w większości przypadków nie wykazywał wybiórczego uszkodzenia tych struktur mózgowia, z którymi wiąże się jego wystąpienie (Chandra, Srivastava 1970; Mustafa, Chandra 1971; Chandra 1972). W licznych badaniach stwierdzono jednak obniżenie poziomu dopaminy bądź w całym mózgowiu (Mustafa, Chandra 1971), bądź też w jego niektórych obszarach, przede wszystkim w prążkowie (Neff i wsp. 1969). W badaniach nad podoстрыm zatruciem chlorkiem manganawym u szczura, przeprowadzonych przez Śmiałka i Mossakowskiego (1981), nie stwierdzono

również neurologicznych objawów klinicznych, a zmiany neuropatologiczne różniły się w sposób istotny od opisywanych w większości prac doświadczalnych. Polegały one na uogólnionym zwyrodnieniu gąbczastym istoty białej, z towarzyszącym włóknistym odczynem glejowym, przy nie zmienionych na ogół strukturach szarych mózgu. Jedynie istota czarna wykazywała znaczny ubytek komórek nerwowych, natomiast prążkowie było nieuszkodzone.

W patogenezie zespołu pozapiramidowego, poza uszkodzeniem układu dopaminergicznego, bierze się również pod uwagę zmienioną funkcję innych układów neurotransmiterowych. Ważną rolę przypisuje się między innymi układowi GABA-ergicznemu, bogato reprezentowanemu zarówno w istocie czarnej, jak i w zwojach podstawy (Kim i wsp. 1971; Pycock 1978).

Wydawało się przeto celowe określenie zależności układu GABA-ergicznego i dopaminergicznego w tym właśnie modelu doświadczalnym, w którym wprawdzie nie występował zespół pozapiramidowy, lecz który charakteryzował się wybiórczym uszkodzeniem istoty czarnej. Badania obejmowały oznaczenie poziomu kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) w istocie czarnej, prążkowie (skorupa z jądrem ogoniastym), gałce bladej i w korze centralnej oraz reakcję wiązania receptora dopaminergicznego D-2 w prążkowie.

MATERIAŁ I METODY

Do badań użyto 41 samic szczurów szczepu Wistar, o ciężarze ciała około 120 g, którym podawano do żyły ogonowej chlorek manganowy ($MnCl_2$) w fizjologicznym roztworze soli, według następującego schematu: pierwszego dnia — 20 mg Mn^{++}/kg ciężaru ciała, przez następne 5 dni po 40 mg Mn^{++}/kg , a po miesiącu od podania pierwszej dawki — 40 mg Mn^{++}/kg ciężaru ciała. Zwierzęta dekapitowano po upływie miesiąca od ostatniej iniekcji.

Oznaczenie poziomu GABA. Mózg po pobraniu oziębiano w lodzie i izolowano istotę czarną, gałkę bladą, skorupę z jądrem ogoniastym i korę centralną. Próbkę natychmiast zamrażano w mieszaninie suchego lodu z metanolem i ważono. Pobrane struktury mózgowia homogenizowano w 5 objętościach 0,01 N HCl. Pobierano 200 μl homogenatu i dodawano 20 μl 10% kwasu trójchlorooctowego (TCA). Wytracone białko usuwano przez wirowanie w temperaturze $+4^\circ C$ przy obrotach 300/min przez 20 min. Otrzymany nadsącz inkubowano przez 30 min w temperaturze $60^\circ C$ po dodaniu 20 μl 50 mM kwasu glutaminowego i 200 μl 14 mM ninhydryny. Następnie dodawano 5 ml odczynnika miedziowego (winian miedziowy + węglan sodu). Fluorescencję odczytywano w spektrofluorymetrycznej Aminco-Bowman przy długościach fal 380–450 nm według metody Love i wsp. (1958), w modyfikacji Suttona i Simmondsa (1974).

Oznaczenie powinowactwa i gęstości receptora dopaminergicznego D-2.

Pobrane prążkowie zamrażano natychmiast w mieszaninie suchego lodu z metanolem. Próbki homogenizowano w homogenizatorze teflonowo-szklanym w 20 objętościach buforu fosforanowego (0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4) w temperaturze 0°C. Homogenat inkubowano przez 60 min w temperaturze 37°C, a następnie wirowano przy $44\,000 \times g$ przez 15 min. Osad homogenizowano powtórnie w temperaturze 0°C w 60 objętościach tego samego buforu. Reakcję wiązania przeprowadzano w naczynkach reakcyjnych Eppendorfa. Każda próbka zawierała 800 μl homogenatu (13,3 mg tkanki), 100 μl ^3H -spiperonu oraz 100 μl d-butaklamolu. Po wymieszaniu przez 15–20 s na mieszadle rotacyjnym próbki inkubowano w temperaturze 5°C przez 2 godz. Po zakończeniu inkubacji próbki sączone przez filtry z włóknem szklanym (Whatman GF/B), przyspieszając sączenie przy pomocy pompy próżniowej i dwukrotnie przemywano 5 ml buforu chłodzonego płaszczem lodowym. Filtry suszono w naczynkach scyntylicyjnych i następnie zalewano 10 ml mieszaniny scyntylicyjnej (POPOP — 50 mg, POO — 4 g, metanol — 20 ml, toluen — 1000 ml). Radioaktywność próbek mierzono w liczniku scyntylicyjnym Nuclear Chicago 300. Szczegóły metody opisano uprzednio (Członkowski i wsp. 1978).

Do badań wykorzystano następujące preparaty: d-butaklamol (Ayerst, Montreal, Canada), PPO (2,5-diphenyloxazolone — P.O. Ch., Polska), POPOP (1,4-bis(phenyl)-2-oxazolyl/benzene — Fluka, Szwajcaria), ^3H -spiperon (spiroperidol) w stężeniu końcowym 1,0 mM o aktywności właściwej 15,5 Ci/mmol = 573 GBg/mmol (Amersham Buchler, Braunschweig, RFN).

Obliczenia statystyczne wykonano według testu „t” Studenta.

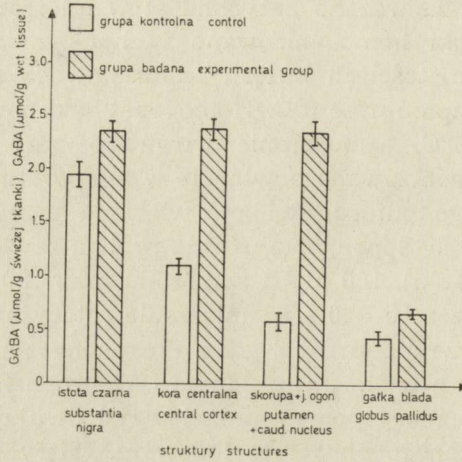
WYNIKI

Uzyskane wyniki poziomu GABA w badanych strukturach mózgowia przedstawiono na rycinie 1.

U zwierząt kontrolnych poziom GABA w istocie czarnej wynosił $1,92 \pm 0,24 \mu\text{mola/g}$ tkanki, w korze centralnej $1,10 \pm 0,13 \mu\text{mola/g}$ tkanki, w prążkowie $0,57 \pm 0,14 \mu\text{mola/g}$ tkanki oraz w gałce bladej $0,43 \pm 0,12 \mu\text{mola/g}$ tkanki.

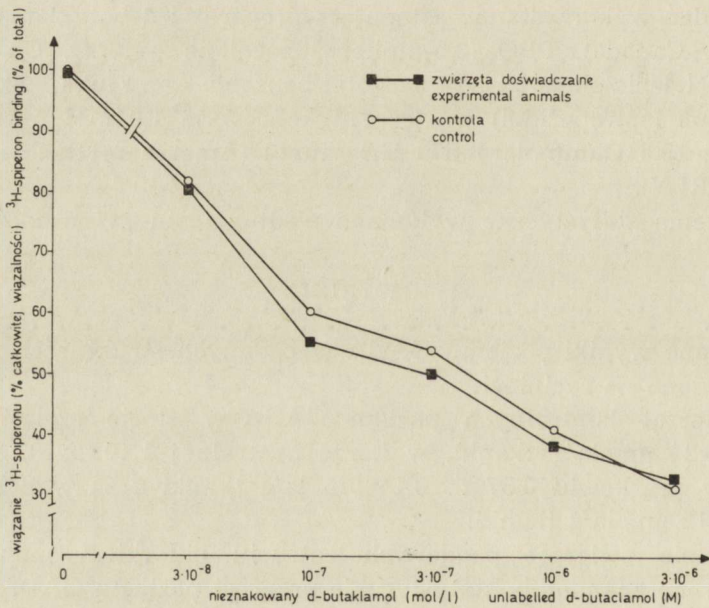
W grupie zwierząt poddanych zatruciu chlorkiem manganowym obserwowano znamienne statystycznie przyrost poziomu GABA: w korze centralnej o 317,2% ($2,36 \pm 0,21 \mu\text{mola/g}$ tkanki, $p < 0,001$), w prążkowie o 117,2% ($2,38 \pm 0,19 \mu\text{mola/g}$ tkanki, $p < 0,01$) oraz w gałce bladej o 55,3% ($0,67 \pm 0,04 \mu\text{mola/g}$ tkanki, $p < 0,01$). W istocie czarnej przyrost zawartości GABA był nieznaczny, wynosił on 22,4% ($2,35$ – $0,23 \mu\text{mola/g}$ tkanki). Różnica ta w stosunku do grupy kontrolnej nie była statystycznie znamienne ($p > 0,05$).

W doświadczeniach radioreceptorowych z zastosowaniem antagonistów receptora dopaminergicznego, w grupie szczurów poddawanych za-



Ryc. 1. Poziom GABA w mózgowiu szczura w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganowym

Fig. 1. GABA content in experimental intoxication with manganous chloride in rat brain



Ryc. 2. Wpływ wzrastających stężeń d-butaklamolu na wiązanie *in vitro* ³H-spiperonu do receptora dopaminergicznego D-2 w prądkowiu szczurów w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganowym. Każdy punkt na krzywych reprezentuje wartość średnią z co najmniej dwóch niezależnych doświadczeń wykonanych trzykrotnie

Fig. 2. Effect of increased concentration of d-butaciamol on ³H-spiperon *in vitro* binding to dopaminergic receptor D-2 in putamen in experimental intoxication with manganous chloride in rats. Curves are formed with means of three repeated estimations from minimum two separate experiments

truciu chlorkiem manganawym uzyskano podobne wyniki, jak u zwierząt kontrolnych (ryc. 2).

OMÓWIENIE

W opracowywanym modelu zatrucia szczurów chlorkiem manganawym nie obserwowano obecności zespołu pozapiramidowego.

Uzyskane wyniki badań neuroprzebieżników są skorelowane z obrazem klinicznym. Zbliżona ilość rozpadów na minutę w próbkach pochodzących zarówno od zwierząt z grupy kontrolnej, jak i zatrutowanych $MnCl_2$, świadczy o braku wpływu toksycznego na powinowactwo i gęstość receptora dopaminergicznego D-2 w prążkowie. Dla wykluczenia uszkodzenia innych elementów układu dopaminergicznego konieczne byłoby wykonanie badań poziomu dopaminy z uwzględnieniem struktur szlaku dopaminergicznego lub dokładniejsze przeanalizowanie procesów syntezy, wiązania, uwalniania i rozpadu tego neuroprzebieżnika w ośrodkowym układzie nerwowym.

Znaczny przyrost zawartości GABA w prążkowie, gałce bladej i korze centralnej może być spowodowany wzmożoną syntezą oraz wiązaniem lub obniżonym uwalnianiem i rozpadem tego neuroprzebieżnika w następstwie zatrucia chlorkiem manganawym. Podobnie wysoki wzrost poziomu GABA w skorupie u szczurów zatrutowanych manganem stwierdził uprzednio Bonilla (1978).

Synteza GABA, zależna od aktywności dekarboksylazy glutaminianowej, zachodzi głównie w neuronach (Fonnum i wsp. 1970). Z obserwacji Śmiałka i Mossakowskiego (1981) wynika, że w zastosowanym modelu doświadczalnym neurony tych struktur nie ulegają istotnym zmianom patologicznym. Można więc przypuszczać, że w tych częściach mózgowia utrzymanie prawidłowego poziomu GABA, syntetyzowanego przy udziale neuronalnej dekarboksylazy glutaminianowej (GAD I) pozostaje niezmiennione. Przyrost GABA w jądrze ogoniastym i skorupie oraz w gałce bladej i korze centralnej może natomiast zależeć od zwiększonej puli glejowej GABA. W wyniku zatrucia chlorkiem manganawym, w stosowanym modelu dochodzi do znacznego rozplemu gleju. Wzrost puli dekarboksylazy glutaminianowej z przedziału glejowego (GAD II) oraz GABA-transferazy, enzymu syntetyzującego kwas gamma-aminomasłowy i występującego w bardzo dużej ilości w komórkach glejowych (van Gelder 1965; Kuriyama i wsp. 1966; Hyde, Robinson 1974) może prowadzić do zwiększonego poziomu GABA w tych strukturach. Kontrola poziomu GABA związana jest ściśle z zawartością glutaminianu oraz pośrednio z pulą alfa-ketoglutaranu. W związku z powyższym przypisuje się ważną rolę ilościowym powiązaniom przemian GABA z mitochondrialnym metabolizmem kwasów trójkarboksylowych na etapie alfa-ketoglutaran — jabłczan. Uważa się, że zmienione procesy redukcji i utleniania na po-

ziomie mitochondrialnym powodują naruszenie równowagi układu NADH/NAD i tą drogą mogą modyfikować przemiany szlaku GABA, obocznej drogi utleniania glukozy w cyklu Krebsa, szczególnie na etapie działania dehydrogenazy aldehydu semibursztynowego (Walsh, Clarck 1976).

Nieznaczne różnice w zawartości GABA w istocie czarnej mózgowia w porównaniu z pozostałymi strukturami mogą stanowić wypadkową wartość obniżenia jego syntezy w neuronach ulegających zwyrodnieniu i rozpadowi, przy równoczesnym przyroście w puli glejowej. Jak wynika z obserwacji morfologicznych, w istocie czarnej dochodzi do znacznego zmniejszenia populacji neuronów przy równoczesnej glejozie.

Uzyskane przez nas wyniki dotyczące działania chlorku manganowego na ośrodkowy układ nerwowy i jego wpływ na stan układu GABA-ergicznego wymagają dalszych badań. Niezbędne jest przede wszystkim określenie zawartości GABA w poszczególnych przedziałach komórkowych i ocena aktywności enzymów uczestniczących w jego metabolizmie.

WNIOSKI

1. Zatrucie szczurów chlorkiem manganowym prowadzi do podwyższenia zawartości kwasu gamma-aminomasłowego w prążkowie, gałce bladej i korze centralnej, przy nieznamienym statystycznie wzroście jego poziomu w istocie czarnej, która jest jedyną strukturą OUN z wybiórczym ciężkim uszkodzeniem neuronów.

2. Zatrucie chlorkiem manganowym nie wywiera wpływu na powinowactwo i gęstość receptora dopaminergicznego D-2 w prążkowie.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОТРАВЛЕНИЯ ХЛОРИСТЫМ МАРГАНЦОМ НА УРОВЕНЬ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ И ДОПАМИНЭРГИЧЕСКИЙ РЕЦЕПТОР D-2 В МОЗГЕ КРЫСЫ

Резюме

Эксперименты проведено на 41 крысе женского пола в возрасте 6 недель. Животные подверглись отравлению хлористым марганцем вводимым во внутривенных инъекциях — в первой дозе 20 мг/кг веса животного и затем в течение 5 дней 40 мг/кг. Месяц спустя от последней инъекции — 40 мг/кг. По истечении 2 месяцев от начала опыта животных убивали.

У животных отсутствовал экстрапирамидный синдром. В результате отравления марганцем был обнаружен статистически существенный повышенный уровень гамма-аминомасляной кислоты с 55,3% в бледном шаре, 117,3% в скорлупе по 317,2% в мозговой коре. В черном веществе уровень этого нейромедиатора повысился незначительно — на 22,4%.

В эффекте радиорецептивных исследований получено одинаковые результаты в экспериментальной и в контрольной группах.

EFFECT OF EXPERIMENTAL MANGANESE CHLORIDE INTOXICATION
ON GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID CONTENT AND DOPAMINERGIC D-2
RECEPTOR IN RAT BRAIN

Summary

The experiments were performed on 41 female Wistar rats 6-week-old subjected to manganese intoxication. Manganese chloride was injected intravenously: first dose 20 mg Mn⁺⁺/kg and after a month from the last administration 40 mg Mn⁺⁺/kg. The animals were decapitated 2 months after the beginning of the experiment.

The animals did not show any clinical symptoms of intoxication. Significant rise in GABA content from 55.3% in globus pallidus, and 117.2% in putamen with caudate nucleus, to 317.2% in central cortex was noted. Substantia nigra showed only insignificant (22.4%) increase of GABA.

In experiments in which radioreceptor antagonist of dopaminergic D-2 receptor was used, the results concerning putamen did not differ from those in the control animals.

PISMIENNIC TWO

1. Banta R. G., Markesbery W. R.: Elevated manganese levels associated with dementia and extrapyramidal signs. *Neurology*, 1977, 27, 213—218.
2. Bonilla E.: Increased GABA content in caudate nucleus of rats after chronic manganese chloride administration. *J. Neurochem.*, 1978, 31, 551—552.
3. Chandra S. V.: Histological and histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Tokiol.*, 1972 29, 29—38.
4. Chandra S. V., Srivastava S. P.: Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese. *Acta pharmacol. (Kbh)* 1970, 28, 177—183.
5. Cook D. G., Fahn S., Brait S. A.: Chronic manganese intoxication. *Arch. Neurol.*, 1974, 30, 59—64.
6. Członkowski A., Höllt V., Herz A.: Binding of opiates and endogenous opioid peptides to neuroleptic receptor sites in the corpus striatum. *Life Sci.*, 1978, 22, 953—962.
7. Fonnum F., Storm-Mathisen J., Walberg F.: Glutamate decarboxylase in inhibitory neurons. A study of the enzyme in Purkinje cell axons and boutons in the cat. *Brain Res.*, 1970, 20, 259—275.
8. Gelder van N. M.: The histochemical demonstration of gamma-aminobutyric acid metabolism by reduction of tetrazolium salt. *J. Neurochem.*, 1965, 12, 231—237.
9. Hornykiewicz O.: Dopamine and extrapyramidal motor function and dysfunction. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.*, 1972, 50, 390—412.
10. Hyde J. C., Robinson N.: Gamma-aminobutyrate transaminase activity in rat cerebellar cortex. A histochemical study. *Brain Res.*, 1974, 82, 109—116.
11. Kim J. S., Bak I. J., Hassler R., Okada Y.: Role of gamma-aminobutyric acid in extrapyramidal motor system. II. Some evidence for existence of a type of GABA-rich strionigral neurons. *Exp. Brain. Res.*, 1971, 14, 95—104.
12. Krigman M. R.: Neuropathology of heavy metal intoxication. *Environ. Health Persp.*, 1978, 26, 117—120.
13. Kuriyama K., Haber B., Siskin B., Roberts E.: The gamma-aminobutyric acid system in rabbit cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 1966, 55, 846—852.

14. Love I. P., Robins E., Eyerman G. S.: The fluorimetric measurement of GAD and its distribution in brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 8—13.
15. Mena I., Marin O., Fuenzalida A., Cortiaz G. C.: Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover. *Neurology*, 1967, 17, 128—136.
16. Mustafa S. J., Chandra S. V.: Levels of 5-hydroxytryptamines and norepinephrine in whole brain of rabbits in chronic manganese toxicity. *J. Neurochem.* 1971, 18, 931—933.
17. Neff N. H., Barrett R. E., Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese dioxide administration in squirrel monkeys. *Experientia*, 1969, 25, 1140—1141.
18. Pycock Ch.: Other neurotransmitters in Parkinson's disease. W: *Neurotransmitter systems and their clinical disorders*. Red. N. J. Legg Acad. Press, London, New York, San Francisco 1978, 99—114.
19. Rodier J.: Manganese poisoning in Moroccan mines. *Br. J. Ind. Med.*, 1955, 12, 21—35.
20. Sarić M., Markićević A., Hrustić O.: Occupational exposure to manganese. *Br. J. Ind. Med.*, 1977, 34, 114—118.
21. Sutton J., Simmonds M. A.: Effect of acute and chronic pentobarbitone on the GABA system in rat brain. *Biochem. Pharmacol.*, 1974, 23, 1801—1805.
22. Smialek M., Mossakowski M. J.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego szczurów w zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.
23. Walsh J. M., Clarck J. B.: Studies on the control of γ -aminobutyrate metabolism in synaptosomal and free rat brain mitochondria. *Biochem. J.*, 1976, 160, 147—157.

Adres autorów: Zespół Neuropatologii CMDiK PAN, ul. Dworkowa 3, 00—784 Warszawa

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

OCENA WPŁYWU OKLUZJI TĘTNIC SZYJNYCH WSPÓLNYCH I ZMIAN CIŚNIENIA TĘTNICZEGO NA CZYNNOŚĆ BIOELEKTRYCZNĄ MÓZGU U SZCZURA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Jednostronna lub obustronna niedrożność tętnicy szyjnej wspólnej u szczura nie prowadzi do istotnego niedokrwienia półkul mózgowych (Levine 1960). Potwierdzono to między innymi statycznymi metodami izotopowymi wykazując, że stężenie związków znakowanych przechodzących do mózgu drogą czynnego lub biernego transportu, jak również związków barierowych po dożylnym wstrzyknięciu u szczurów z jednostronną lub obustronną okluzją tętnic szyjnych wspólnych, nie różni się w sposób znamieny od stężenia tych związków w półkulach mózgu u zwierząt kontrolnych (Kapuściński i wsp. 1972; Kapuściński 1974). Ponieważ model obustronnej niedrożności tętnic szyjnych wspólnych u szczura stosowany jest w pracach badawczych jako model łagodnego niedokrwienia mózgu (Mossakowski i wsp. 1973; Sikorska 1978), dlatego celowa wydawała się ocena wpływu okluzji tętnic szyjnych wspólnych na czynność bioelektryczną mózgu, która stanowi bardzo czuły wykładnik jego niedokrwienia (Hossmann, Zimmermann 1974).

Celem pracy była ocena czynności bioelektrycznej kory mózgowej u szczura po jednostronnej i obustronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej oraz ocena poziomów układowego ciśnienia tętniczego krwi, przy których występuje osłabienie, a następnie zanik czynności kory u zwierząt z obustronną niedrożnością tych tętnic.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 6 dorosłych szczurach obu płci, w uśpieniu Nembutalem wstrzykiwanym dootrzewnowo w dawce 70 mg/kg masy ciała. Po odsłonięciu kości czaszki wiercono otwory o średnicy 1 mm umieszczone symetrycznie w okolicy skroniowej. W otwory te wprowadzano srebrne elektrody igłowe do zapisu elektro-

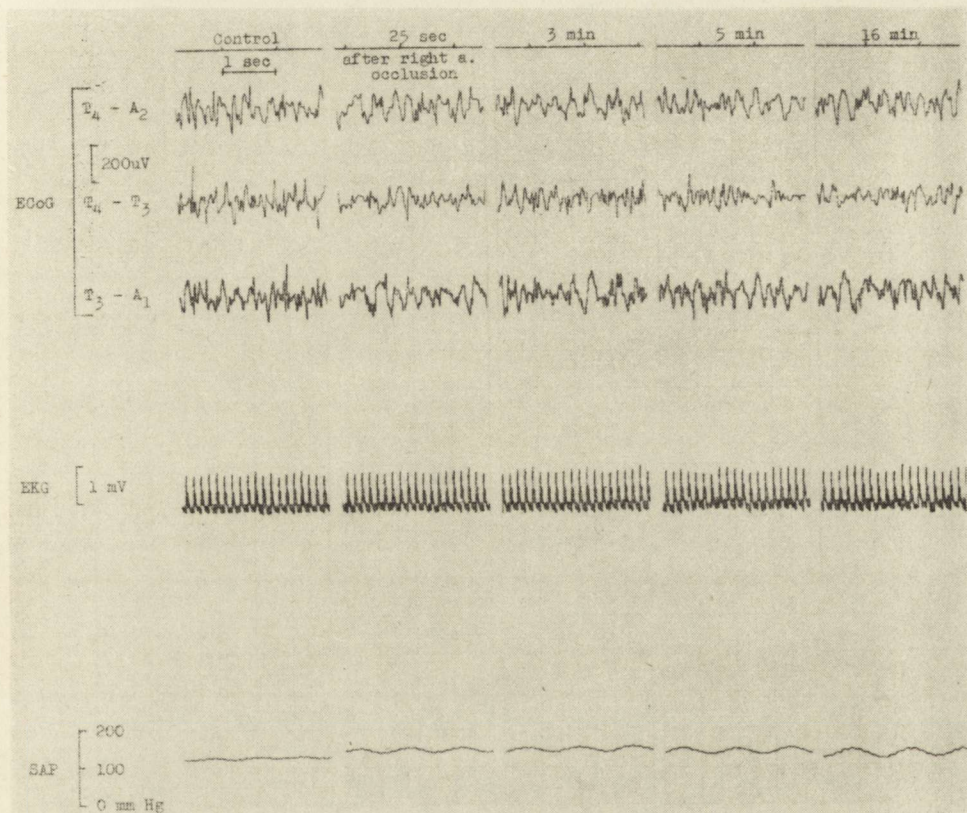
kortykogramu (ECoG), które umieszczano w kontakcie z oponą twardą, przytwierdzając je przy pomocy kolodium do kości czaszki. Igłowe elektrody odniesienia wkłuwano do obu uszu lub w podbródek zwierząt. Zapis ECoG prowadzono w układzie jednobiegunowym — z elektrodą odniesienia oraz w układzie dwubiegunowym: T_4-A_2 — prawa półkula; T_4-T_3 — odprowadzenie międzypółkulowe; T_3-A_1 — lewa półkula, przy stałej czasie 0,03 s i prędkości przesuwu papieru 15 mm/s. W ocenie zapisu ECoG brano pod uwagę amplitudę i częstotliwość czynności bioelektrycznej mózgu. Elektrokardiogram (EKG) zapisywano wkłuwając elektrody igłowe do prawej przedniej i lewej tylnej łapy (drugie odprowadzenie kończynowe). Układowe ciśnienie tętnicze krwi (SAP) rejestrowano przez cewnik umieszczony w lewej tętnicy udowej przy użyciu przetwornika ciśnienia (Statham P 23) i elektromanometru (EK 4, Farum). Powyższe zmienne fizjologiczne zapisywano w sposób ciągły przy użyciu 8 kanałowego elektroencefalografu (Acutrace 8, Beckman). W prawej tętnicy udowej umieszczano cewnik celem upustu i reinfuzji krwi. Z cięcia środkowego na szyi preparowano tętnice szyjne wspólne, uwalniając je od otaczających struktur anatomicznych. Prawą tętnicę szyjną wspólną zamykano przy użyciu klipsa Heifetza na okres 17 minut, a następnie wykonywano obustronne zamknięcie tętnic również na okres 17 minut. W dalszym etapie doświadczenia wykonywano upust krwi trwający od 5 do 8 minut, kontrolując zmniejszanie się ciśnienia tętniczego aż do osiągnięcia ciszy bioelektrycznej mózgu, a następnie po 2 minutach izoelektrycznego zapisu ECoG przeprowadzano reinfuzję własnej krwi zwierzęcia.

WYNIKI

Niedrożność jednej tętnicy szyjnej wspólnej nie powodowała żadnych uchwytnych zmian w czynności bioelektrycznej półkuli mózgu po stronie okluzji u wszystkich zwierząt. Zapis ECoG przez okres 16 minut po zamknięciu prawej tętnicy szyjnej wspólnej przedstawiony jest na rysunku 1. Układowe ciśnienie krwi wzrastało u wszystkich zwierząt pomiędzy 15 a 30 sekundą po zamknięciu tętnicy, osiągając poziom 140—150 mm Hg, i utrzymywało się na poziomie wyższym od kontrolnego do 16 minuty obserwacji. Wartości kontrolne ciśnienia krwi wahały się pomiędzy 115 i 125 mm Hg.

Zamknięcie drugiej tętnicy szyjnej wspólnej powodowało u wszystkich zwierząt w pierwszej minucie obserwacji krótkotrwałe obniżenie układowego ciśnienia tętniczego do poziomu 90—110 mm Hg, osiągając w drugiej minucie po zamknięciu obu tętnic szyjnych wartości 160—170 mm Hg. Podwyższone układowe ciśnienie tętnicze utrzymywało się na tym poziomie do 12 minuty obserwacji po zamknięciu obu tętnic szyjnych. Zaburzenia w czynności bioelektrycznej mózgu występowały

u wszystkich zwierząt jedynie w pierwszej minucie po zamknięciu obu tętnic szyjnych, podczas obniżenia ciśnienia tętniczego. Charakteryzowały się one zmniejszeniem częstotliwości i występowaniem serii iglic o zwiększonej amplitudzie (ryc. 2). Zaburzenia te szybko ustępowały wraz ze wzrostem układowego ciśnienia tętniczego i w późniejszym okresie obserwacji zapisy czynności mózgu nie wykazywały u żadnego zwierzęcia istotnych różnic w porównaniu z czynnością w okresie kontrolnym.

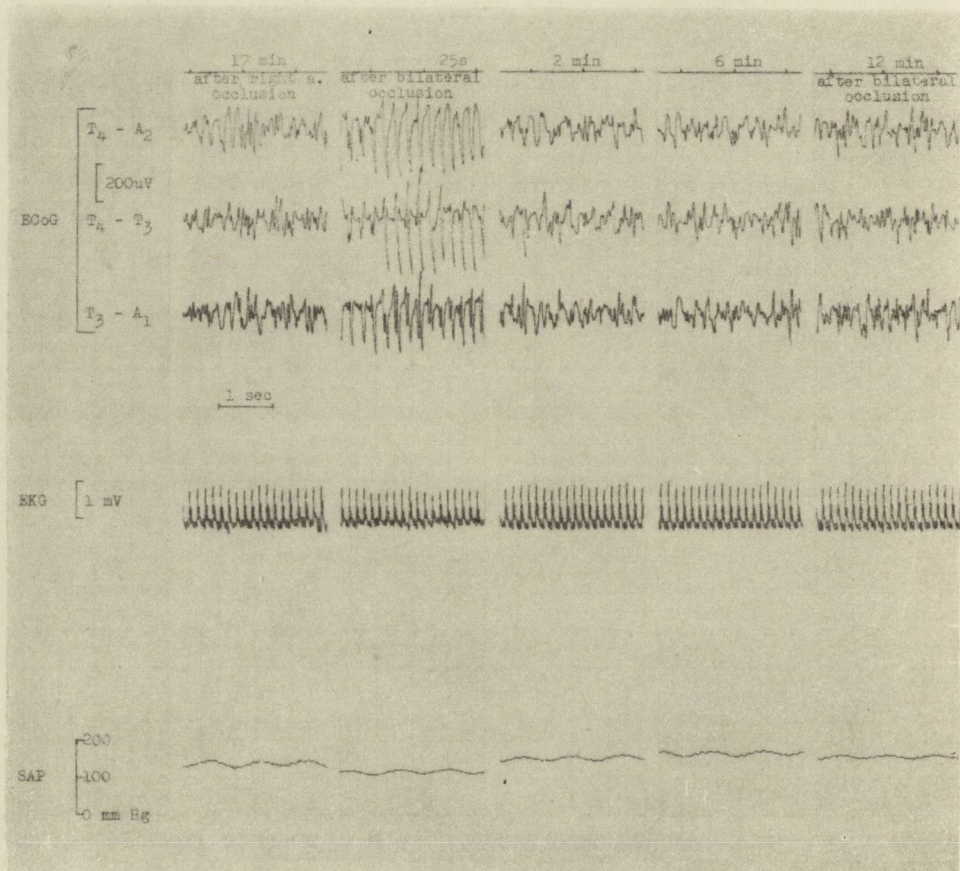


Ryc. 1. Wpływ jednostronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej na czynność bioelektryczną mózgu szczura. Na wszystkich rycinach: ECoG — elektrokortylogram; EKG — elektrokardiogram; SAP — układowe ciśnienie tętnicze

Fig. 1. Effect of unilateral common carotid artery occlusion on bioelectric function of the rat's brain. In all figures: ECoG — electrocorticogram; EKG — electrocardiogram; SAP — systemic arterial pressure

Czynność serca w zapisie EKG nie zmieniała się po jednostronnym zamknięciu tętnicy szyjnej wspólnej. Obustronne zamknięcie tętnic szyjnych również nie wpływało w istotny sposób na czynność serca, z wyjątkiem niewielkiego wzrostu amplitudy EKG towarzyszącego wyższemu poziomowi ciśnienia krwi (ryc. 2).

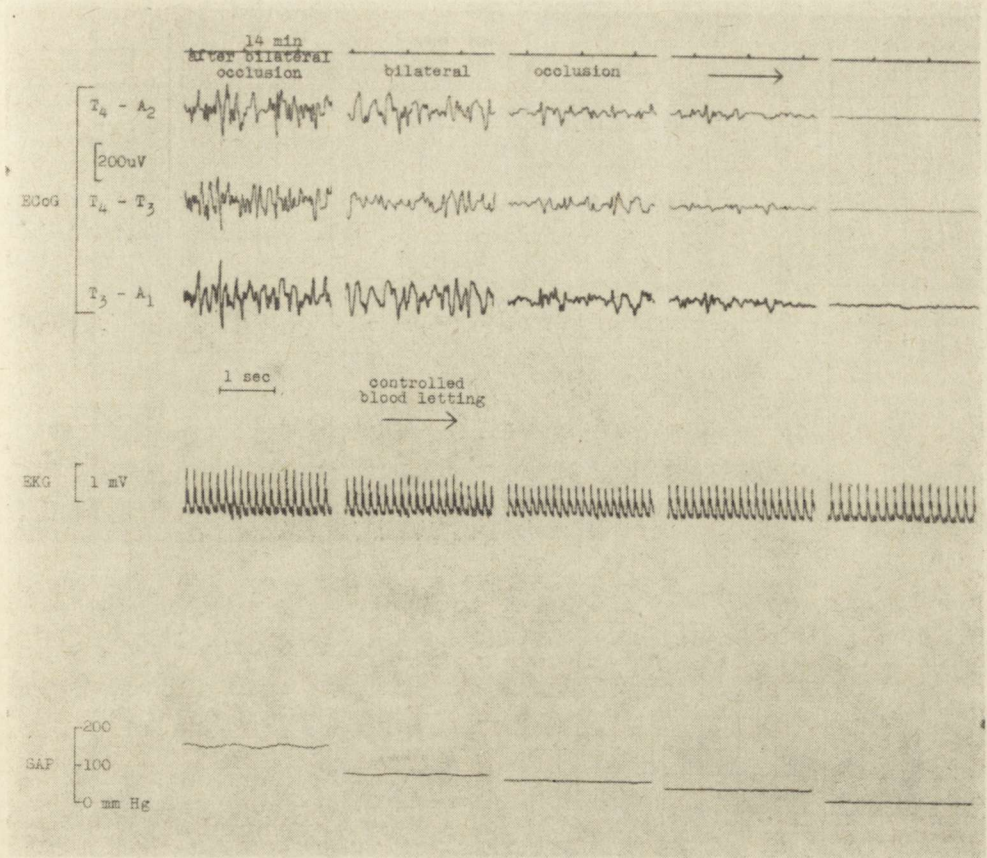
Wpływ upustu krwi na układowe ciśnienie tętnicze i czynność bioelektryczną mózgu u szczura z obustronną okluzją tętnicy szyjnej wspólnej przedstawiono na rycinie 3. Pierwsze zauważalne zmiany w czynności bioelektrycznej mózgu obserwowano przy poziomie układowego ciśnienia tętniczego pomiędzy 85 i 75 mm Hg. Charakteryzowały się one zmniejszeniem częstotliwości i amplitudy zapisu ECoG. Znaczne zubożenie zapisu ECoG występowało przy poziomie ciśnienia pomiędzy 60 i 50 mm Hg, natomiast cisza bioelektryczna mózgu pojawiała się



Ryc. 2. Wpływ obustronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej na czynność bioelektryczną mózgu szczura

Fig. 2. Effect of bilateral occlusion of the common carotid artery on bioelectric function of the rat's brain

u wszystkich zwierząt dopiero przy poziomie ciśnienia pomiędzy 35 i 30 mm Hg. Obniżanie ciśnienia tętniczego przez upust krwi u szczurów z obustronną okluzją tętnicy szyjnej wspólnej powodowało zmniejszenie

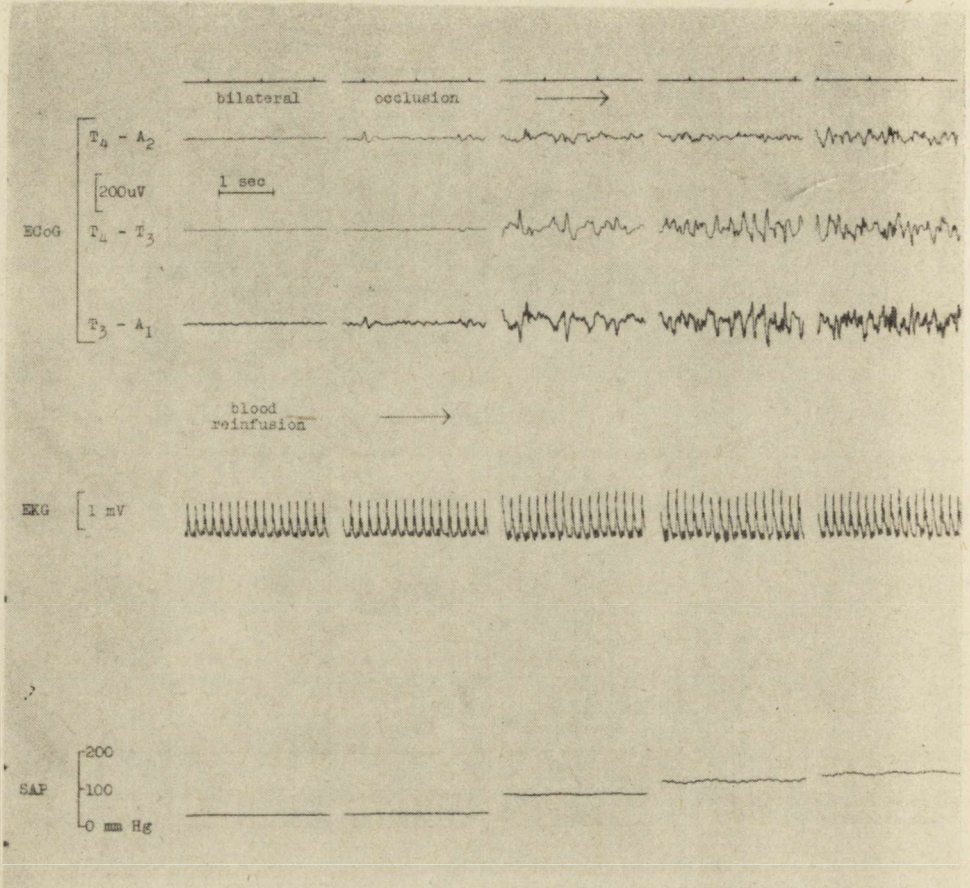


Ryc. 3. Wpływ obniżonego ciśnienia tętniczego na czynność bioelektryczną mózgu szczura z obustronną okluzją tętnicy szyjnej wspólnej

Fig. 3. Effect of the decreased arterial pressure on bioelectric function of the brain of rat with bilateral occlusion of the common carotid artery

amplitudy w zapisie EKG oraz nieznaczne zwolnienie czynności serca (ryc. 3).

Powrót czynności bioelektrycznej mózgu po krótkotrwałym, dwuminutowym niedokrwieniu podczas wzrostu układowego ciśnienia tętniczego na skutek reinfuzji własnej krwi u szczura z obustronną okluzją tętnicy szyjnej wspólnej przedstawiono na rycinie 4. Na początku reinfuzji krwi powodującej wzrost ciśnienia tętniczego u zwierząt do poziomu 40—45 mm Hg, obserwowano pojawianie się pierwszych objawów powrotu czynności bioelektrycznej mózgu. Charakteryzowały się one bardzo niską amplitudą i małą częstotliwością zapisu ECoG. Przy dalszej reinfuzji krwi i wzroście układowego ciśnienia tętniczego występował szybki wzrost amplitudy i częstotliwości zapisu ECoG osiągając u wszystkich zwierząt wartości zbliżone do zapisu kontrolnego przy poziomie ciśnienia pomiędzy 120 i 130 mm Hg.



Ryc. 4. Powrót czynności bioelektrycznej mózgu podczas wzrostu ciśnienia tętniczego na skutek reinfuzji krwi u szczura z obustronną okluzją tętnicy szyjnej wspólnej

Fig. 4. Recovery of cerebral bioelectric function during an increase of arterial pressure due to blood reinfusion in rat with bilateral occlusion of the common carotid artery

OMÓWIENIE

Zastosowanie elektrofizjologicznej metody ciągłego zapisu bioelektrycznej czynności mózgu oraz odprowadzeń jednobiegunowych umożliwiło ocenę wpływu okluzji tętnic szyjnych wspólnych na czynność bioelektryczną półkul mózgowych u dorosłych szczurów. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że jednostronna okluzja tętnicy szyjnej wspólnej nie powoduje żadnych uchwytnych zmian niedokrwiennych półkuli po stronie okluzji. Wzrost ciśnienia tętniczego towarzyszący jednostronnej okluzji z anatomicznie prawidłowym kołem Willisa w pełni kompensują dopływ krwi do półkuli po stronie niedrożności. Obustronna okluzja tętnic szyjnych wspólnych u tych zwierząt prowadziła do zaburzeń czynności bioelektrycznej półkul mózgowych jedynie w pierwszej minucie po zamknięciu tętnic. Zaburzenia te pojawiały się w okresie

krótkotrwałego obniżenia ciśnienia tętniczego przed jego znacznym wzrostem i miały raczej charakter pobudzenia a nie cechy niedokrwienne. Można je tłumaczyć odruchem z zatok szyjnych, gwałtowną zmianą kierunku napływu krwi z układu tętnic kręgowych oraz krótkotrwałym niedokrwieniem. Prawidłowe zapisy czynności bioelektrycznej półkul mózgowych przy obustronnej okluzji tętnicy szyjnej wspólnej u szczurów, obserwowane już w 2 minucie po zamknięciu tętnic, są przekonującym dowodem, że zabieg ten również nie prowadzi do niedokrwienia półkul mózgowych. Niedrożności obu tętnic towarzyszył znaczny wzrost układowego ciśnienia tętniczego utrzymujący się podczas całego okresu obserwacji. Ten znaczny wzrost ciśnienia tętniczego w połączeniu z anatomicznie prawidłowym kołem Willisa w pełni wyrównują krążenie mózgowe u tych zwierząt. Dodatkowymi dowodami dokumentującymi mechanizm braku zaburzeń ukrwienia mózgu, pomimo obustronnej niedrożności tętnic szyjnych wspólnych u szczura, są zapisy czynności bioelektrycznej mózgu podczas upustu i reinfuzji krwi. Pierwsze objawy niedokrwienia mózgu w postaci zmniejszenia częstotliwości i amplitudy zapisu ECoG obserwowano przy poziomie ciśnienia tętniczego poniżej 85 mm Hg, a wyraźne cechy niedokrwienia pojawiały się dopiero przy poziomie ciśnienia poniżej 60 mm Hg. Natomiast podczas reinfuzji krwi pierwsze objawy powrotu czynności bioelektrycznej mózgu obserwowano już przy poziomie ciśnienia 40—45 mm Hg. Wyniki przeprowadzonych badań wyraźnie wskazują, że obustronne zamknięcie tętnic szyjnych wspólnych u dorosłych szczurów nie jest wystarczającym zabiegiem dla uzyskania niedokrwienia mózgu. Niedokrwienie mózgu u takich zwierząt można uzyskać obniżając układowe ciśnienie krwi do poziomu poniżej 85 mm Hg, a cisza bioelektryczna mózgu występuje przy poziomie ciśnienia pomiędzy 35 i 30 mm Hg.

WNIOSKI

1 Jednostronna i obustronna okluzja tętnicy szyjnej wspólnej u dorosłych szczurów nie powoduje zmian czynności bioelektrycznej kory mózgowej, co przemawia za brakiem niedokrwienia półkul mózgowych.

2 Niedokrwienie mózgu u dorosłych szczurów z obustronną okluzją tętnicy szyjnej wspólnej występuje przy poziomie układowego ciśnienia tętniczego poniżej 85 mm Hg, a cisza bioelektryczna mózgu występuje przy poziomie ciśnienia poniżej 35 mm Hg.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ И ИЗМЕНЕНИЙ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ НА БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ ФУНКЦИЮ ГОЛОВНОГО МОЗГА У КРЫСЫ

Резюме

У 6 взрослых крыс проведено оценку биоэлектрической функции мозговой коры после односторонней и двусторонней окклюзии общих сонных артерий и определено уровни ар-

териального давления, при которых выступает ослабление и атрофия функции коры у животных с двусторонней окклюзией этих артерий. Опыты были проведены под наркозом пентобарбиталом с применением метода постоянной записи электрокортикограммы, системного артериального давления и электрокардиограммы. Доказано, что односторонняя и двусторонняя окклюзия общей сонной артерии у взрослых крыс не вызывает изменений биоэлектрической функции мозговой коры, что говорит в пользу недостатка ишемии мозговых полшарий. Применяя кровопускание и реинфузию крови, определено, что ишемия головного мозга у крыс с двусторонней окклюзией общей сонной артерии выступает при уровне системного артериального давления ниже 85 мм Hg, а биоэлектрическая тишина мозга появляется при уровне давления ниже 35 мм Hg.

EFFECT OF COMMON CAROTID ARTERY OCCLUSION AND CHANGES OF ARTERIAL PRESSURE ON CEREBRAL BIOELECTRIC FUNCTION IN RAT

Summary

In 6 adult rats cerebral bioelectric function was evaluated after unilateral and bilateral occlusion of the common carotid artery and levels of arterial pressure were established by which suppression and electrocerebral silence appeared in animals with bilateral occlusion. Experiments were performed under pentobarbital anesthesia with continuous monitoring of electrocorticogram, systemic arterial pressure and electrocardiogram. Unilateral and bilateral occlusion of the common carotid artery in adult rats did not induce changes in cortical bioelectric activity what means lack of hemispheric ischemia. Producing blood letting and reinfusion it was established that cerebral ischemia in rats with bilateral occlusion of the common carotid artery appeared by systemic arterial pressure under 85 mm Hg, and electrocerebral silence appeared under the level of 35 mm Hg.

PISMIENNICTWO

1. Hossmann K. A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.*, 1974, 81, 59—74.
2. Kapuściński A., Mossakowski M. J., Albrecht J., Januszewski S.: Wpływ niedokrwienia i niedotlenienia na barierę krew-mózg u szczurów. *Neuropatol. Pol.*, 1972, 10, 45—64.
3. Kapuściński A.: Study on the mechanism and kinetics of brain edema induced by ischemia and hypoxia. [W:] *Pathology of cerebral microcirculation*. Red. J. Cervós-Navarro. Walter de Gruyter, Berlin, New York 1974, 367—371.
4. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.*, 1960, 36, 1—17.
5. Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A., Korthals J., Wrutniak A.: Wpływ umiarkowanego niedokrwienia na poziom glikogenu w zależności od stopnia dojrzałości ośrodkowego układu nerwowego. *Neuropatol. Pol.*, 1973, 11, 53—66.
6. Sikorska M.: Metabolizm cyklicznego adenozyno-3',5'-monofosforanu w mózgu szczura w warunkach niedokrwienia. Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa, 1978, praca doktorska.

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

ANDRZEJ KAPUŚCIŃSKI

CAŁKOWITE NIEDOKRWIENIE PÓLKUL MÓZGOWYCH U SZCZURA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Molinari i Laurent (1976) przeprowadzili próbę klasyfikacji szeregu modeli doświadczalnych stosowanych w badaniach nad niedokrwieniem i niedotlenieniem mózgu. Zwracają oni uwagę, że tylko nieliczne modele doświadczalne — szczególnie te, w których podstawowym czynnikiem patogennym jest niedokrwienie — znajdują swoje odpowiedniki w sytuacjach klinicznych. Uważają, że anoksja anemiczna i anoksyjna są rzadkimi zjawiskami w praktyce klinicznej, a modelu Levine'a (Levine 1960) w ogóle nie uwzględniają w klasyfikacji.

Pulsinelli i Brierley (1979) opisali nowy model obustronnego, półkulowego niedokrwienia mózgu u szczura. Model ten ze względu na stosunkową łatwość wywoływania niedokrwienia oraz możliwość użycia dostępnego gatunku zwierzęcia laboratoryjnego daje szereg nowych możliwości badawczych. W związku z tym wydawało się celowe przeprowadzenie serii badań nad tym modelem niedokrwienia mózgu.

Celem pracy była ocena doświadczalnego modelu niedokrwienia mózgu opisanego przez Pulsinelli i Brierleya (1979) w warunkach naszej pracowni, ze zwróceniem szczególnej uwagi na zaburzenia czynności oddechowej i obwodowe zmiany hemodynamiczne.

MATERIAŁ I METODY

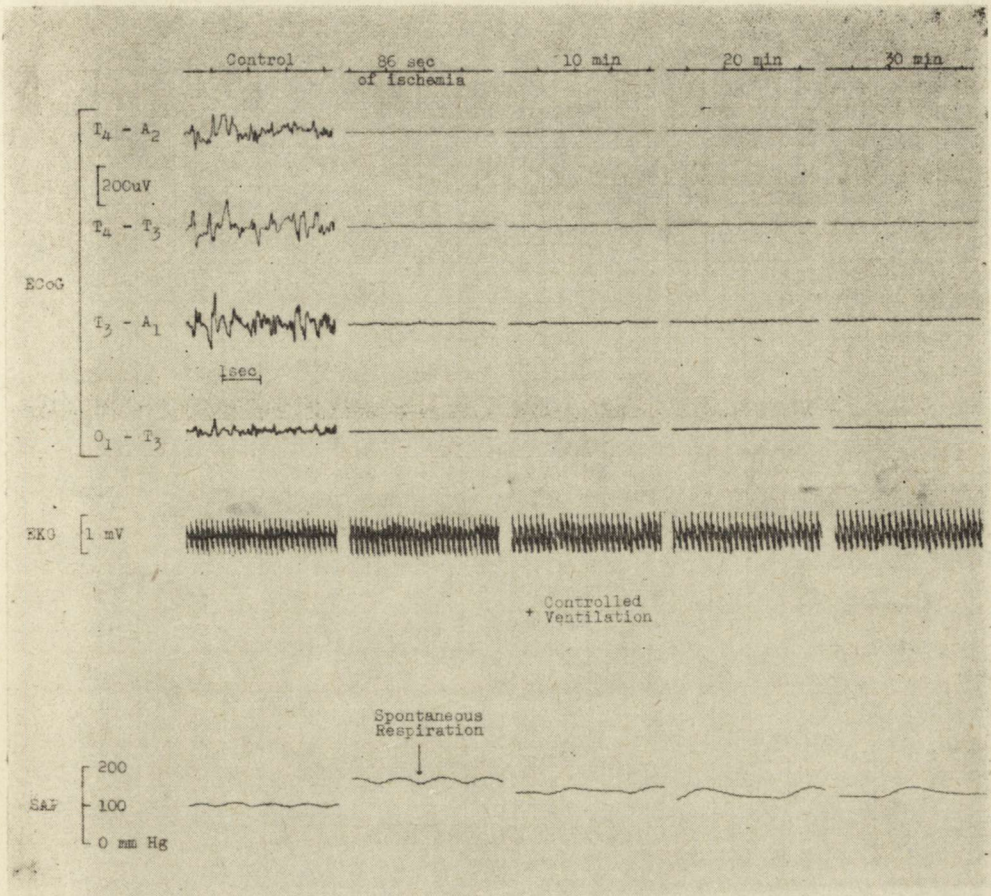
Doświadczenia przeprowadzono na 15 dorosłych szczurach rasy Wistar, w dwóch etapach. W pierwszym etapie zwierzęta usypiano eterem i wykonywano cięcie długości około 1 cm poniżej kości potylicznej, nad dwoma pierwszymi kręgami szyjnymi. Następnie preparowano mięśnie biegnące wzdłuż kręgosłupa i odsłaniano otwory skrzydłowate znajdujące się w wyrostkach poprzecznych pierwszego kręgu szyjnego. Przy użyciu biokoagulatora (BK-15 firmy Z.D.T.M. Łódź) i pensety igłowej koagulowano obie tętnice kręgowie przebiegające w pobliżu otworów skrzydłowatych. Po zamknięciu tętnic kręgowych zwierzęta pozostawiano w klat-

kach na okres 24 godz. przed rozpoczęciem właściwego etapu badań. W drugim etapie zwierzęta usypiano Nembutalem wstrzykiwanym do otrzewnowo w dawce 70 mg/kg masy ciała. Po odsłonięciu kości czaszki wiercono otwory o średnicy 1 mm — dwa symetryczne w okolicy skroniowej i jeden w lewej okolicy potylicznej. W otwory te wprowadzano srebrne elektrody igłowe do zapisu elektrokortykogramu (ECoG), umieszczając je w kontakcie z oponą twardą i przytwierdzając przy pomocy kolodium do kości czaszki. Igłowe elektrody odniesienia wkłuwano w podbródek zwierząt. Zapis ECoG prowadzono w układzie jednobiegunowym: T₄-A₂ — prawa półkula; T₃-A₁ — lewa półkula oraz w układzie dwubiegunowym: T₄-T₃ — odprowadzenie międzypółkulowe; O₁-T₃ — odprowadzenie między lewą okolicą potyliczną i lewą okolicą skroniową, przy stałej czasu 0,03 s i prędkości przesuwu papieru 10 mm/s. W ocenie zapisu ECoG brano pod uwagę amplitudę i częstotliwość czynności bioelektrycznej mózgu. Elektrokardiogram (EKG) zapisywano wkłuwając elektrody igłowe do prawej przedniej i lewej tylnej łapy (drugie odprowadzenie kończynowe). Układowe ciśnienie tętnicze krwi (SAP) rejestrowano przez cewnik umieszczony w lewej tętnicy udowej, przy użyciu przetwornika ciśnienia (Statham P 23) i elektromanometru (EK 4, Farum). Zmienne fizjologiczne zapisywano w sposób ciągły przy użyciu 8 kanałowego elektroencefalografu (Acutrace 8, Beckman). Następnie preparowano tętnice szyjne wspólne, a do tchawicy wprowadzano rurkę tracheotomiczną w celu prowadzenia kontrolowanej wentylacji. Tętnice szyjne wspólne zamykano na okres 30 minut przy użyciu klipsów Heifetza i podczas zaburzeń oddechowych stosowano kontrolowaną wentylację. Po niedokrwieniu półkul mózgowych zwierzęta obserwowano przez okres 3 godzin.

WYNIKI

Okres niedokrwienia mózgu

Zamknięcie obu tętnic szyjnych wspólnych powodowało u 11 zwierząt zanik czynności bioelektrycznej kory mózgowej podczas pierwszej minuty niedokrwienia i wzrost ciśnienia krwi do wartości 160—190 mm Hg (ryc. 1.). Cisza bioelektryczna mózgu utrzymywała się u tych zwierząt do końca okresu niedokrwienego. W pierwszej minucie niedokrwienia mózgu występowały gwałtowne zaburzenia oddychania, charakteryzujące się bezdechem lub znacznym zwolnieniem czynności oddechowej. W czasie pierwszych 10 minut niedokrwienia mózgu ciśnienie krwi bardzo wolno obniżało się, jednakże było ono zawsze wyższe od wartości kontrolnych (100—110 mm Hg), osiągając poziom 110—120 mm Hg w 30 minucie niedokrwienia. Obniżeniu ciśnienia krwi towarzyszyło postępujące zwolnienie samoistnej czynności oddechowej, aż do wystąpienia bezdechu pomiędzy 10 i 12 minutą. Szczegółową dynamikę



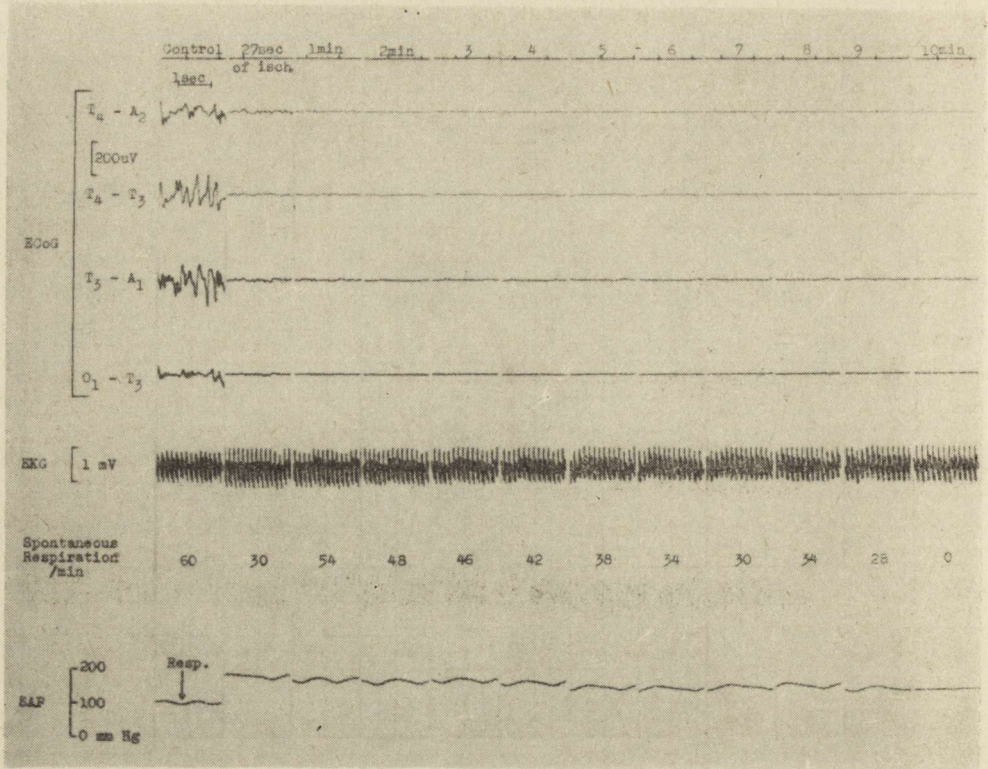
Ryc. 1. Całkowite niedokrwienie półkul mózgowych u szczura. Na wszystkich rycinach: ECoG — elektrokortykogram; EKG — elektrokardiogram; SAP — układowe ciśnienie tętnicze

Fig. 1. Complete ischemia of cerebral hemispheres in rat. In all figures: ECoG — electrocorticogram; EKG — electrocardiogram; SAP — systemic arterial pressure

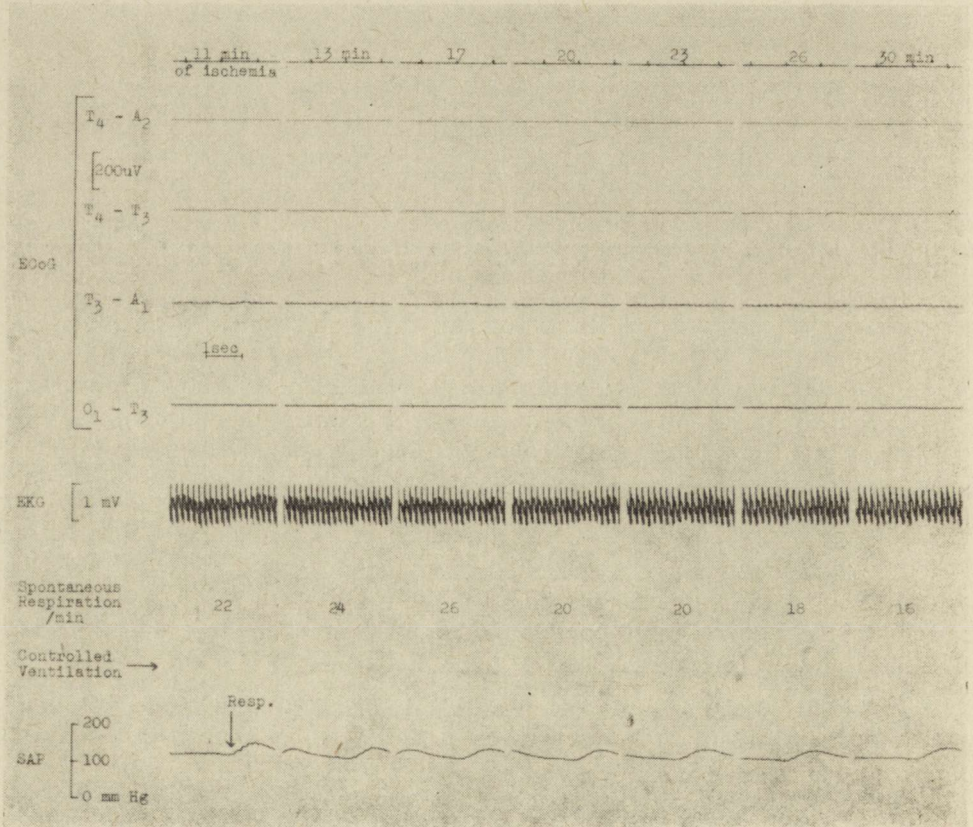
zmian samoistnej czynności oddechowej oraz ciśnienia krwi podczas pierwszych 10 minut niedokrwienia mózgu u szczura ilustruje rycina 2. Pomędzy 10 i 12 minutą niedokrwienia mózgu samoistna czynność oddechowa okresowo zanikała, przy poziomie ciśnienia krwi 120–130 mm HG. Konieczne było stosowanie kontrolowanej wentylacji przez cały okres ośrodkowej niewydolności oddechowej. Pomimo jej stosowania, pomiędzy 11 i 30 minutą niedokrwienia mózgu, zwolnienie samoistnej czynności oddechowej postępowało nadal, osiągając częstość 12–20 oddechów na minutę w 30 minucie niedokrwienia mózgu (ryc. 3).

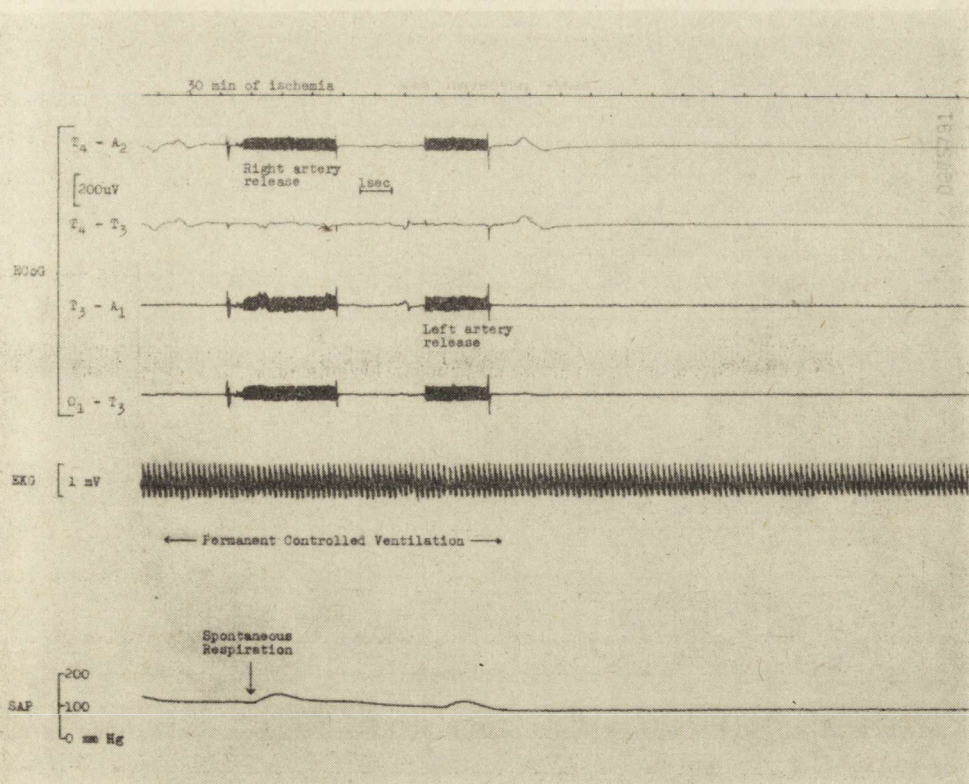
U 4 z 15 zwierząt zamknięcie obu tętnic szyjnych wspólnych nie powodowało zaniku ani czynności bioelektrycznej kory mózgu, ani spontanicznej czynności oddechowej.

2



3





Ryc. 4. Obniżenie ciśnienia krwi i powtórny zanik spontanicznego oddychania po udrożnieniu tętnic szyjnych na zakończenie niedokrwienia półkul mózgowych u szczura

Fig. 4. Decrease of blood pressure and a secondary disappearance of spontaneous respiration after release of carotid arteries at the of cerebral hemispheric ischemia in rat

Okres odnowy krążenia mózgowego

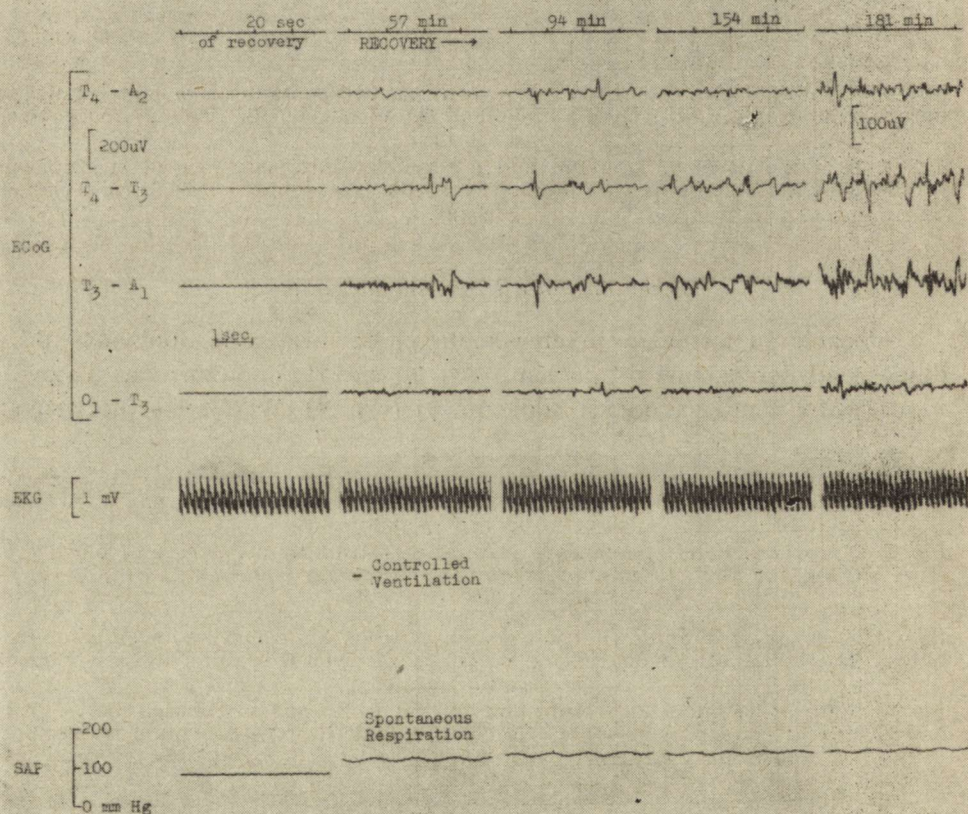
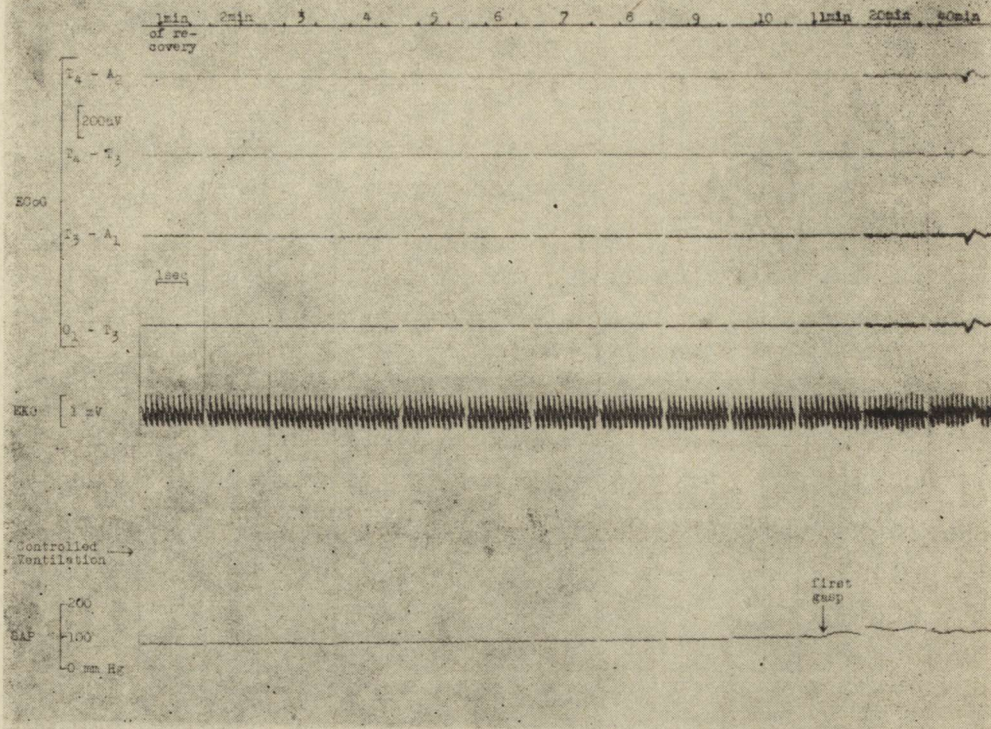
Udrożnieniu tętnic szyjnych wspólnych towarzyszyło obniżenie układowego ciśnienia krwi do poziomu 80—90 mm Hg i powtórny zanik zwolnionej samoistnej czynności oddechowej (ryc. 4). W okresie pierwszych

Ryc. 2. Zanik spontanicznego oddychania spowodowany obniżeniem się ciśnienia krwi podczas pierwszych 10 min niedokrwienia półkul mózgowych u szczura. Resp. — oddech spontaniczny

Fig. 2. Disappearance of spontaneous respiration caused by a decrease of blood pressure during the first 10 min of cerebral hemispheric ischemia in rat. Resp. — spontaneous respiration

Ryc. 3. Częstość spontanicznego oddychania podczas kontrolowanej wentylacji pomiędzy 11 i 30 minutą niedokrwienia półkul mózgowych u szczura. Resp. — oddech spontaniczny

Fig. 3. Rate of spontaneous respiration during controlled ventilation between 11 and 30 min of cerebral hemispheric ischemia in rat. Resp., — spontaneous respiration



10 minut odnowy krążenia mózgowego ciśnienie krwi ulegało powolnemu wzrostowi i pomiędzy 11 i 14 minutą odnowy przy poziomie ciśnienia 100—110 mm Hg pojawiał się pierwszy głęboki oddech samoistny (ryc. 5). W dalszym okresie czynność oddechowa ulegała stopniowej poprawie aż do pełnej normalizacji pomiędzy 40 i 70 minutą, co pozwalało na zaniechanie kontrolowanej wentylacji zwierząt.

Pierwsze objawy powrotu czynności bioelektrycznej kory mózgowej w postaci wolnych fal o niskiej amplitudzie pojawiały się pomiędzy 45 i 60 minutą odnowy krążenia mózgowego, a czynność bioelektryczna mózgu ulegała stopniowej poprawie (ryc. 6). Pomędzy 115 i 140 minutą miała już ona charakter ciągły, natomiast w 180 minucie odnowy u 4 zwierząt zapis był zbliżony do zapisu prawidłowego. U pozostałych 7 zwierząt zarówno częstość, jak i amplituda czynności bioelektrycznej kory mózgowej były niższe w porównaniu z wartościami w kontroli.

OMÓWIENIE

Przedstawione wyniki badań świadczą o dużej przydatności modelu niedokrwienia mózgu opisanego przez Pulsinelli i Brierleya (1977) w badaniach doświadczalnych. Nie bez powodu autorzy nazywają go „nowym modelem obustronnego półkulowego niedokrwienia”, nie stosując terminu „całkowite niedokrwienie”. Wyniki obecnych badań wskazują, że po zamknięciu czterech tętnic doprowadzających krew do mózgu dorosłego szczura, występuje znaczny wzrost obwodowego ciśnienia krwi, który pozwala na szczątkową perfuzję ośrodków oddechowych w opuszce. Czynność tych ośrodków w warunkach opisanego modelu zależy ściśle od poziomu obwodowego ciśnienia krwi: przy poziomie ciśnienia powyżej 120 mm Hg opuszka jest jeszcze perfundowana krwią dopływającą przez tętnice rdzeniowe, natomiast przy poziomie ciśnienia poniżej 100 mm Hg występuje całkowite niedokrwienie mózgowia. Jest to zgodne z obserwacjami Hossmanna i Zimmermanna (1974), którzy po zamknięciu tętnic doprowadzających krew do mózgu małpy obniżali obwodowe ciśnienie krwi do poziomu poniżej 70 mm Hg. Pomimo że autorzy opisanego modelu nie obniżali ciśnienia krwi, wyniki badań przedstawione w tej pracy przemawiają za tym, że jest to model całkowitego niedokrwienia półkul mózgowych przy szczątkowo perfundowanej opuszce. Niedogodnością tego modelu jest jednak dość rozległy zabieg chirurgiczny i wykonywanie koagulacji tętnic kręgowych bez kontroli wzrokowej — tętnice bieg-

Ryc. 5. Wzrost ciśnienia krwi i powrót spontanicznego oddychania podczas pierwszych 11 min odnowy krążenia mózgowego

Fig. 5. An increase of blood pressure and return of spontaneous respiration during the first 11 min recovery of cerebral circulation

Ryc. 6. Powrót czynności bioelektrycznej mózgu po 30 min niedokrwienia u szczura

Fig. 6. Recovery of cerebral bioelectric function after 30 min ischemia in rat

naące w kanale kręgowym w pobliżu otworów skrzydłowatych są niewidoczne. Dlatego też w większej serii doświadczalnej, a zwłaszcza w badaniach bez kontroli fizjologicznej, u części zwierząt koagulacja tętnic kręgowych może być jednostronnie nieskuteczna, czego dowodem są 4 zwierzęta opisane w tej pracy, u których po zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych nie wystąpiła cisza bioelektryczna mózgu ani zanik spontanicznej czynności oddechowej. Przeprowadzone badania wskazują, że najlepszym potwierdzeniem skutecznego skoagulowania tętnic kręgowych są znaczne zaburzenia oddechowe po zamknięciu tętnic szyjnych wspólnych.

ПОЛНАЯ ИШЕМИЯ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА У КРЫСЫ

Резюме

У 15 взрослых крыс проведено оценку биоэлектрической функции мозговой коры, дыхательных расстройств и периферических гемодинамических изменений после закрытия позвоночных артерий и общих сонных артерий на протяжении 30 минут и в течение 3-часового периода рециркуляции. У 11 животных выступили атрофия функции мозговой коры, рост давления крови и расстройства дыхания. У 5 животных эти явления не выступили. Результаты исследований указывают, что закрытие позвоночных артерий и общих сонных артерий вызывало ишемию полушарий мозга при рудиментарной перфузии луковицы. Коагуляция позвоночных артерий без оптического контроля может в некоторых случаях вести к неэффективности этой процедуры.

COMPLETE HEMISPHERIC ISCHEMIA OF THE RAT BRAIN

Summary

In 15 adult rats cerebral bioelectric activity, respiratory disturbances and peripheral hemodynamic alterations have been evaluated after 30 min occlusion of vertebral and common carotid arteries and during 3 hrs of recirculation. In 11 animals occlusion produced electrocerebral silence, an increase of blood pressure and respiratory disturbances. In 4 animals above symptoms did not appear. Occlusion of vertebral and common carotid arteries produced complete hemispheric ischemia with residual perfusion of medulla. Coagulation of vertebral arteries without visual control in some cases can be ineffective.

PIŚMIENICTWO

1. Hossmann K.- A., Zimmermann V.: Resuscitation of the monkey brain after 1 h complete ischemia. I. Physiological and morphological observations. *Brain Res.* 1974, 81, 59—74.
2. Levine S.: Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am. J. Pathol.*, 1960, 36, 1—17.
3. Molinari G. F., Laurent J. P.: A classification of experimental models of brain ischemia. *Stroke* 1976, 7, 14—17.
4. Pulsinelli W. A., Brierley J. B.: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979, 10, 267—272.

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

JOANNA MAJKOWSKA, EWA JOACHIMOWICZ

PRZYPADEK ROZLANEGO PROCESU ZAPALNEGO MÓZGU I OPON ORAZ ROZLEGŁYCH ZMIAN MARTWICZYCH W PRZEBIEGU OSTREGO BAKTERYJNEGO ZAPALENIA WSIERDZIA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Klinika Neurologiczna II Wydz. Lekarskiego AM w Warszawie

Objawy neurologiczne w przebiegu bakteryjnego zapalenia wsierdza występują u około 40—50% chorych (Ziment 1969). W przypadkach tych badanie neurologiczne wykazuje obecność okołonaczyniowych zmian zapalnych (Kernohan, Woltman, Barnes 1939; Harrison, Hampton 1967), rzadziej widoczne są niewielkie zmiany martwicze stanowiące następstwo zatorów i zakrzepów naczyń mózgowych (Harrison, Hampton 1967; Jones i wsp. 1969; Ziment 1969).

Celem pracy jest przedstawienie przypadku ostrego bakteryjnego zapalenia wsierdza z wybitnie nasilonym i rozległym procesem zapalnym oraz martwiczym w mózgu. Przypadek ten zasługuje również na uwagę ze względu na trudności w ustaleniu właściwego rozpoznania za życia chorego.

OPIS PRZYPADKU

Chory Ł.G., lat 50, przyjęty do Kliniki Neurologicznej z powodu porażenia połowiczego lewostronnego. W dniu poprzedzającym hospitalizację wystąpiły bóle i zawroty głowy, narastające trudności w chodzeniu oraz połowicze drgawki lewostronne. Przed 6 tygodniami przeżył infekcję górnych dróg oddechowych z towarzyszącymi stanami podgorączkowymi utrzymującymi się około 2 tygodni. Następnie wystąpiły bóle i obrzęki podudzi oraz liczne punktikowate wybroczyny na skórze kończyn dolnych. Do wyżej wymienionych objawów dołączyły się biegunkowate stolce z domieszką świeżej krwi. Zagorączkował do 38°C. Wzrost temperatury utrzymywał się 4 dni i ustąpił po stosowaniu antybiotyków. Wywiad w kierunku przebytych chorób bez znaczenia. Nadużywał alkoholu.

Przy przyjęciu do Kliniki chory był w ciężkim stanie ogólnym, wy-

niszczony i odwodniony. Skóra blada z pojedynczymi, punkcikowatymi wybroczynami, liczniejszymi na podudziach. Niewielkiego stopnia obrzęk podudzi, stóp i okolicy krzyżowej. Spojówki blade z pojedynczymi, punkcikowatymi wybroczynkami. Granice serca poszerzone w całości. Czynność serca przyspieszona do 140/min. Osłuchowo, bardzo cichy, nie stały szmer skurczowy na koniuszku. RR 100/66 mm Hg. Nad polami płucnymi pojedyncze furczenia, u podstawy płuc osłuchowo cechy zastoiny w krążeniu małym. Wątroba powiększona, macalna — 5 cm poniżej łuku żebrowego, twarda, bolesna przy badaniu. Śledziona wyczuwalna, niebolesna. W badaniu neurologicznym z odchyleniem od stanu prawidłowego stwierdzono tendencję do zwrotu gałek ocznych w prawo, spływanie fałdu nosowo-wargowego po stronie lewej, porażenie połowiczne lewostronne z obniżonym napięciem mięśniowym i osłabionymi odruchami okostnowymi oraz ścięgnistymi i obecnym objawem Babińskiego i Rossolimo. Badanie dna oczu wykazało wyraźne tarcze nerwów wzrokowych, lekkie poszerzenie żył przy niezmiennych tętnicach. Przy żyłach występowały drobne, świeże wybroczyny oraz starzejące się ogniska po wynaczynionej krwi.

Badania laboratoryjne wykazały cechy niedokrwistości (Hb — 4,8 g⁰/o, erythrocyty — 1 500 000/mm³, leukocytoza — 4 200/mm³), małopłytkowość (trombocyty — 50 000/mm³), nieznaczny wzrost mocznika i obniżenie poziomu białka w surowicy krwi, białkomocz, obecność leukocytów i świeżych krwinek czerwonych w moczu. Płyn mózgowo-rdzeniowy: cytoza 3/mm³, białko — 28 mg⁰/o, odczyny białkowe ujemne. Badanie Rtg klatki piersiowej ujawniło powiększenie sylwetki serca i cechy zastoiny w krążeniu małym. W zapisie Ekg stwierdzono przyspieszenie rytmu zatokowego oraz cechy rozlanego niedokrwienia mięśnia sercowego. Zapis Eeg wykazał znaczne, rozlane zmiany patologiczne, z przewagą po stronie prawej. We wszystkich odprowadzeniach widoczna była niskonapięciowa czynność theta, na którą nakładały się serie fal delta 2,5—3 Hz i amplitudzie do 30 mV, występujące obficie po stronie prawej.

Przez cały okres pobytu w Klinice chory był w stanie bardzo ciężkim. Kilkakrotnie oddał smoliste stolce. Wybroczyny, zwłaszcza na podudziach i spojówkach, utrzymywały się przez cały okres obserwacji. Mimo podawania krwi do względnego wyrównania wartości morfologii (Hb 10,8 g⁰/o), utrzymywała się przyspieszona czynność serca. Okresowo obecny był szmer skurczowy na koniuszku serca.

Pomimo stosowania leków krążeniowych i odwadniających narastały objawy niewydolności krążenia. Utrzymywał się krwiomocz, narastały objawy niewydolności nerek. Stan neurologiczny nie uległ poprawie. W szóstej dobie pobytu w Oddziale chory zagorączkował do 39°C, narosły zaburzenia świadomości. Zgon nastąpił w siódmej dobie hospitalizacji wśród objawów ostrej niewydolności krążenia.

Rozpoznanie kliniczne: *Focus encephalomalaciae in regione vascularisationis arteriae cerebri mediae dextrae subsequente hemiplegia si-*

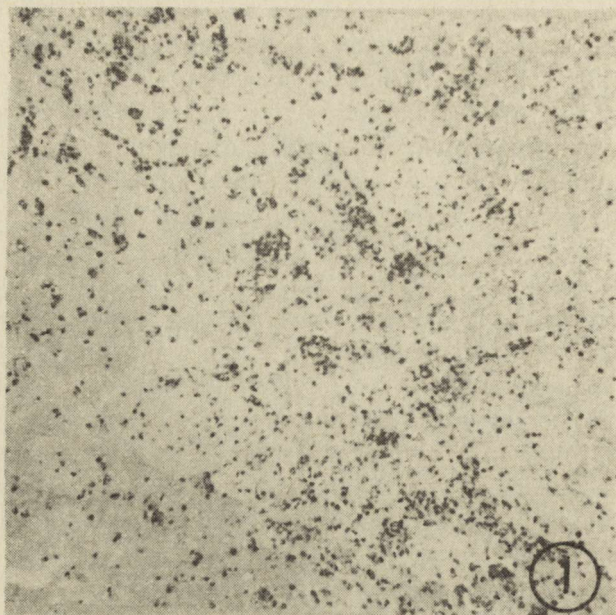
nistra. Anaemia gradu maioris, diathesis haemorrhagica et hepatosplenomegalia e causa ignota, probabiliter in decursu cirrhosis hepatis. Insufficiencia circulatoria chronica. Oedema pulmonum sub finem vitae.

Na sekcji ogólnej wykazano polipowate, wrzodziejące zapalenie wsierdzia zastawek półksiężycowatych aorty i dwudzielnej, przerost mięśnia serca, obrzęk płuc, drobnoguzkową marskość wątroby, powiększenie śledziony i mnogie blade ogniska zawałowe w śledzionie oraz punkcikowate wybroczyny skóry.

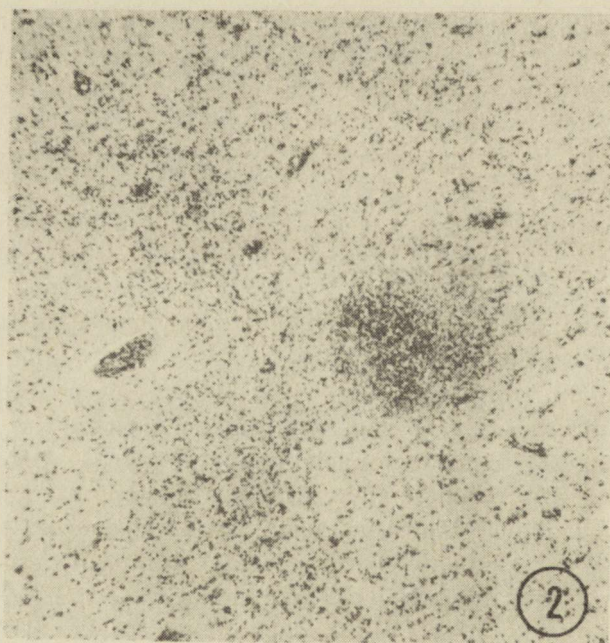
Mózgowie o ciężarze 1380 g wykazywało zmleczenie opon i cechy obrzęku. Na przekrojach stwierdzono obecność bardzo licznych punkcikowatych wybroczyn w istocie białej i szarej mózgu. W prawej półkuli występowało rozległe ognisko rozmiękania, ciągnące się od wysokości rogu przedniego komory bocznej do bieguna potylicznego. Obejmowało ono korę, istotę białą oraz zwoje podstawy. W kilku miejscach w ognisku rozmiękania obecne były rozległe wybroczyny, oraz drobne skupienia szarawozielonkawej masy. Naczynia podstawy mózgu zawierały liczne blaszki miażdżycowe.

Badania mikroskopowe wykonano na reprezentatywnych przekrojach mózgu, pnia mózgowego i mózdzku. Materiał zatopiony w parafinie barwiono hematoksyliną i eozyną oraz według metody van Giesona i PTAH.

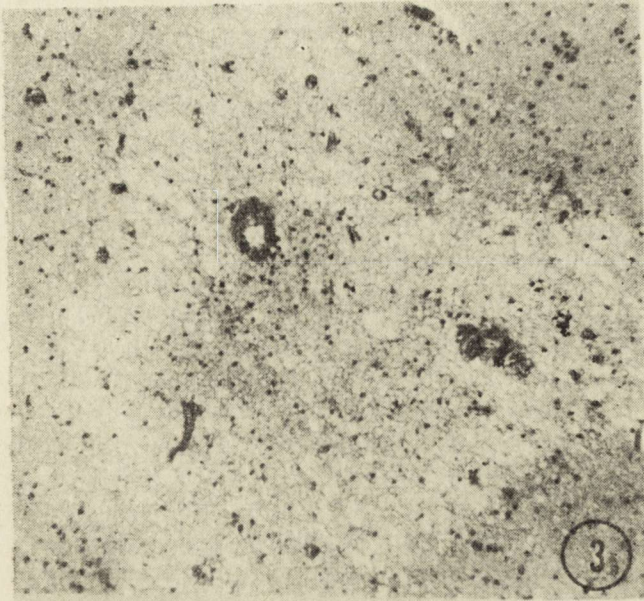
W obrazie mikroskopowym w korze mózgu i w istocie białej oraz w zwojach podstawy i strukturach pnia występowały liczne drobne ogniska martwicy, współistniejące ze zmianami zapalnymi. Miały one cechy świeżej martwicy rozplywnej znajdującej się w stadium mniej lub bardziej zaawansowanej rozbiórki makrofagowej. Były najobfitsze w zwojach podstawy, głównie w gałce bladej i w części nakrywkowej mostu. Otaczająca je tkanka była znacznie rozrzedzona i zawierała skupienia odczynowych komórek glejowych. W części drobnych ognisk występowały centralnie położone naczynia. Cechą znamioną ognisk rozmiękania było ich nacieczenie przez komórki zapalne, głównie limfocyty i obojętnochłonne leukocyty. Naciec ten obejmował zarówno masy rozpadłej lub rozpadającej się tkanki, jak i ściany występujących wśród niej naczyń. Widoczne były również większe skupienia limfocytów. W pobliżu ognisk rozmiękania, jak i w tkance nieuszkodzonej widać było rozlane, nierównomierne zagęszczenia komórek glejowych, na których tle występowały ogniskowe nacieki zapalne (ryc. 1). Spotykano również uformowane mikroropnie (ryc. 2). Poza opisanymi powyżej ogniskami martwicy w istocie białej, a rzadziej w korze mózgu występowały ogniska martwicy niepełnej, o wyglądzie stanu gąbczastego. W ich obrębie obecne były również nacieki okołonaczyniowe, często przechodzące pasmowato w głąb mniej uszkodzonej tkanki (ryc. 3). Ogniska niepełnej martwicy łącząc się ze sobą tworzyły girlandowate układy (ryc. 4). W korze mózgu, zwłaszcza w płacie czołowym i skroniowym, występowały rozsiane opustoszenia komórkowe, a część z zachowanych neuronów wykazywała cechy schorzenia ischemicznego, ciężkiego



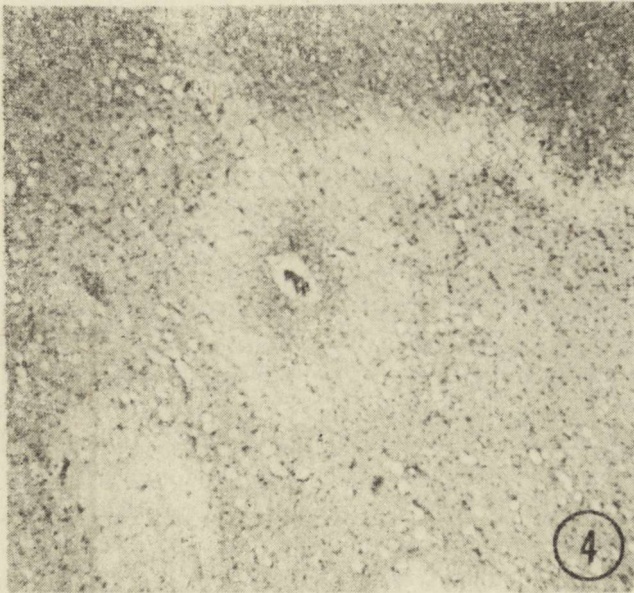
Ryc. 1. Rozlane nacieki zapalne. H—E. Pow. 100 ×
Fig. 1. Diffuse inflammatory infiltrations. H—E. 100 ×



Ryc. 2. Mikroropień w istocie białej. H—E. Pow. 60 ×
Fig. 2. Microabscess in the white matter. H—E. 60 ×



Ryc. 3. Zgąbczenie istoty białej. H—E. Pow. 100 ×
Fig. 3. Spongiosis of the white matter. H—E. 100 ×



Ryc. 4. Girlandowaty układ stanu spongiotycznego. H—E. Pow. 60 ×
Fig. 4. Girland-like formation of spongy degeneration. H—E. 60 ×

i ostrego. W korze mózgu i w miejscu opustoszeń neuronalnych zwiększona była ilość astrocytów. Rozlana glejoza komórkowa widoczna była również w istocie białej. W istocie czarnej obecne było rozrzedzenie utkania, związane z nagromadzeniem drobnych jamek, pomiędzy którymi leżały niezmienione komórki nerwowe. Naczynia półkul, zwojów podstawy, opon i splotu naczyniówkowego komory bocznej mózgu miały pogrubiałe i zwłókniałe ściany. W części tętnic struktura ścian uległa zatarciu. W małych naczyniach widoczna była przebudowa ścian związana z rozplemem włókien kolagenowych. W drobnych tętniczkach, zwłaszcza w zwojach podstawy, błona środkowa miała wygląd jednorodnie szklisty. Związane to było ze znacznym zwężeniem, a niekiedy zamknięciem światła. Błona sprężysta wewnętrzna, szczególnie dużych tętnic, była częściowo rozwarstwiona. Włókna mięśniowe błony środkowej poprzerastane były włóknami łącznotkankowymi. W zwojach podstawy widoczne było duże, pojedyncze naczynie o świetle zamkniętym zakrzepem. W świetle kilku naczyń obecne były skupienia jasnoróżowej, homogennej substancji. W jądrach podstawy obserwowano liczne śródkankowo położone skupiska krwinek czerwonych. Widoczne było również naciekanie ścian naczyń, oraz masywne nacieki okołonaczyniowe z komórek wielo- i jednojądrzastych. Tkanka otaczająca naczynia była znacznie rozrzedzona. W oponach miękkich na podstawie i wypukłości mózgu występowały okołonaczyniowe nacieki złożone głównie z limfocytów, a w mniejszym stopniu z makrofagów.

OMÓWIENIE

Na podstawie obrazu klinicznego i neuropatologicznego należy uznać, iż w przedstawionym przypadku mamy do czynienia z rozlanym procesem zapalnym mózgu i opon z bardzo znacznym komponentem naczyniopochodnych uszkodzeń tkankowych w przebiegu ostrego, bakteryjnego zapalenia wsierdza. W ośrodkowym układzie nerwowym współistnieją ze sobą wieloogniskowe zmiany martwicze i zapalne występujące oddzielnie bądź nakładające się na siebie. W świetle stwierdzenia czynnego polipowato-wrzodziejącego procesu zapalnego na zastawkach serca najbardziej atrakcyjną koncepcją patogenetyczną zmian neuropatologicznych wydawać się może przyjęcie ich zatorowego pochodzenia (Harriman 1976). Nie potwierdza tego jednak obraz patomorfologiczny uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego. Uogólnione, rozsiane zmiany zapalne, w przeciwieństwie do typowego przerzutowego zapalenia mózgu, nie dotyczą wybiórczo podkorowych okolic mózgu, ani też nie występują w obszarach pogranicza unaczynienia przez duże pnie tętnicze. Nie obserwuje się również materiału zatorowego w świetle naczyń. Pojedyncze uformowane mikroropnie wydają się raczej być następstwem pierwotnego procesu zapalnego w świetle naczyń. Za takim charakterem

procesu przemawia struktura zmian zapalnych zarówno w ścianach naczyń, nacieków okołonaczyniowych i nie związanych z naczyniami skupisk komórek jedno- i wielojądrowych. W roku 1949 Opalski opisał serię przypadków bakteriemii, w których nie dochodziło do tworzenia się mikroropni, a w ich obrazie neuropatologicznym dominował rozlany proces zapalny naczyń, obejmujący samą ścianę naczyniową oraz przestrzenie okołonaczyniowe. W jego przeświadczeniu stanowił on reakcję na działanie toksyn bakteryjnych. W świetle obecnego stanu wiedzy mechanizm patogenetyczny zmian należałoby uznać za podobny do immunologicznej odpowiedzi leżącej u podłoża kłębkowego zapalenia nerek rozwijającego się w przebiegu bakteryjnego zapalenia wsierdzia (Ziment 1969).

Elementem dominującym i nadającym przypadkowi cechy odrębności jest obecność obok zmian zapalnych uszkodzeń naczyniopochodnych tkanki. Mają one zróżnicowany charakter i prawdopodobnie złożony mechanizm patogenetyczny. Pierwotne zmiany zapalne naczyń wydają się odgrywać tu jednak rolę zasadniczą. W znacznej liczbie przypadków część centralną ogniska martwicy zajmowało nacieczone naczynie, którego ściana ulegała różnego stopnia zniszczeniu, a proces zapalny, intensywny w jego otoczeniu, ulegał rozproszeniu w miarę oddalania się od niego. Proces zapalny naczyń sprzyjał rozwojowi zmian zakrzepowych. W licznych zmienionych i nie zmienionych naczyniach obserwowano ich obecność. W świetle tych spostrzeżeń wydaje się, że zespół neurologiczny oraz stwierdzone w badaniu makroskopowym i mikroskopowym ogniska rozmiękania, dominujące w półkuli prawej mózgu, związane są z zakrzepem odgałęzienia tętnicy środkowej mózgu. Uszkodzenie ścian naczyń leżało zapewne u podłoża, występujących obok ognisk rozmiękania, okołonaczyniowych wylewów krwawych. Ich rozwojowi sprzyjać mogła ponadto małopłytkowość, utrzymująca się w okresie hospitalizacji pacjenta. Nie można wykluczyć roli dodatkowego czynnika patogenetycznego w rozwoju rozsianych ognisk martwiczych, jakim był uogólniony obrzęk mózgu. Ucisk obrzmiałych wypustek okołonaczyniowych gleju na naczynia włosowate jest znanym czynnikiem upośledzającym przepływ mózgowy krwi, prowadzącym do niedokrwienia tkanki (Woolf, Hault 1961; Ames i wsp. 1968).

Obraz patomorfologiczny części ognisk martwicy sugeruje ich naczyniopochodny charakter. Chodzi tu o te ogniska, w których stopień uszkodzenia tkanki był mniejszy, a dominował proces zapalny o charakterze nacieku okołonaczyniowego przechodzącego na otoczenie naczynia i rozpraszającego się w miarę oddalania się od niego. Ogniskom tym towarzyszył odczyn rozplemowy gleju. Wydaje się, że miały one charakter martwicy zapalnej.

Opisane powyżej zmiany ogniskowe nakładały się na uogólniony obraz encefalopatii anoksyjnej, na który składały się ubytki komórek

nerwowych dominujące w korze mózgu z towarzyszącym odczynem glemjowym oraz nieswoistym zwyrodnieniem zachowanych neuronów (Brierley 1976). W patogenezie tych zmian, obok opisanych powyżej nieprawidłowości sieci naczyniowej mózgu, uwzględnić należy rolę czynników układowych, takich jak utrzymująca się przez cały okres obserwacji klinicznej chorego niewydolność krążenia i znaczna niedokrwistość (Cohen 1960). Nie bez znaczenia dla całości zespołu uszkodzeń tkankowych w mózgu był również stan naczyń mózgu, charakteryzujący się uogólnionym stwardnieniem tętniczek zarówno w korze mózgu, jak i w istocie białej, a najbardziej nasilonym w zwojach podstawy. Naczynia o niepełnowartościowych, zmienionych patologicznie i przebudowanych strukturalnie ścianach stanowią czynnik sprzyjający rozwojowi obrzęku mózgu, pogłębiający niedotlenienie tkanki i ułatwiający rozprzestrzenianie się procesu zapalnego (Abramson, Truman 1961).

Jak wspomniano na wstępie, opisany przypadek nastroczał trudności diagnostyczne. Nagłe wystąpienie jednoogniskowego zespołu neurologicznego pod postacią porażenia lewostronnego sugerowało udar mózgu. Brak krwi w płynie mózgowo-rdzeniowym przemawiał za ogniskiem rozmiękania. Przyżyciowe rozpoznanie zapalenia wsierdza było trudne. Prawie bezgorączkowy, szybki przebieg choroby, z niestałymi zmianami osłuchowymi serca oraz niską leukocytozą nie nasuwał podejrzania procesu zapalnego we wsierdzu. Jednakże, jak powszechnie wiadomo, rozpoznanie bakteryjnego zapalenia wsierdza u starszych pacjentów nie jest łatwe, bowiem objawy towarzyszące takie jak niedokrwistość, krwawienie z przewodu pokarmowego, wyniszczenie, objawy niewydolności nerek maskują objawy podstawowego zespołu chorobowego (Hayward 1960). Miało to miejsce w opisywanym przypadku.

W zestawieniu obrazu klinicznego ze zmianami stwierdzonymi sekcyjnie w mózgu na uwagę zasługuje brak zmian zapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz wykładników klinicznych wielogniskowych zmian w mózgu. Rozległe uszkodzenie mózgu sugerowały bowiem jedynie zmiany w zapisie elektroencefalograficznym.

СЛУЧАЙ РАЗЛИТОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА МЕНИНГОЭНЦЕФАЛИТА И ПРОТЯЖЕННЫХ НЕКРОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ В ТЕЧЕНИЕ ОСТРОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОКАРДИТА

Описан случай острого бактериального эндокардита с кратковременным и нетипичным клиническим течением затрудняющим прижизненное определение соответствующего диагноза основного болезненного процесса. Во время невропатологического исследования наблюдались протяженные воспалительные и некротические изменения не являющиеся непосредственным результатом эмболий. Кажется, что изменения в головном мозгу являются эффектом повреждения самых сосудистых стенок воспалительным процессом. Как в белом веществе, так и в сером веществе наблюдались периваскулярные и внутритканевые воспалительные очаги, протяженные и малые некрозы, а также ишемические очаги.

A CASE OF THE DIFFUSE INFLAMMATORY AND NECROTIC PROCESS
OF THE BRAIN AND MENINGES IN THE COURSE OF ACUTE BACTERIAL
ENDOCARDITIS

Summary

A case of acute bacterial endocarditis with an atypical clinical course is described. The case was not diagnosed clinically. Neuropathological examination revealed extensive inflammatory changes and necrotic foci. Embolic material was not found in the lumina of the blood vessels in the brain. It seems that neuropathological changes resulting of the inflammatory changes of the blood vessels wall.

It can be assumed that in the case infectious agent revealed a specific affinity to the vascular system.

PISMIENICTWO

1. Ames A. III, Wright R. L., Kowada M., Thurston J. M., Majno G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am. J. Path.*, 1968, 52, 437—454.
2. Abramson D. I., Truman G. A.: Ageing changes in blood vessels. [W:] Structural aspects of ageing. Red. G. H. Bourne. Hafner, New York 1961, 201—215.
3. Brierley J. B.: [W:] Greenfield's Neuropathology. Red. W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. Arnold, London 1967, 43—79.
4. Cohen M.: The central nervous system in congenital heart disease. *Neurology*, 1960, 10, 452—456.
5. Harriman D. G. F.: [W:] Greenfield's Neuropathology. Red. W. Blackwood, J. A. N. Corsellis. Arnold, London 1967, 238—269.
6. Harrison M. J. G., Hampton J. R.: Neurological presentation of bacterial endocarditis. *Brit. med. J.*, 1967, 2 148—151.
7. Hayward G.: Bacterial endocarditis. *Proc. Roy. Med.*, 1960, 53, 551—562.
8. Jones H. R. Jr., Siekert R. G., Geraci J. E.: Neurologic manifestations of bacterial endocarditis. *Ann. Int. Med.*, 1969, 71, 21—27.
9. Kernohan J. W., Woltman H. W., Barnes A. R.: Involvement of the nervous system associated with endocarditis. *Arch. Neurol. Psych.* 1935, 42, 789—792.
10. Opalski A.: [W:] Histopatologia układu nerwowego. Lekarski Instytut Naukowo-Wydawniczy. Warszawa 1949, 86—69.
11. Renkawek K.: Przypadek mikroropni mózgu rozsianych na pograniczu dwóch zakresów unaczynienia. *Przegl. Lek.*, 1965, 21, 402—407.
12. Ziment I.: Nervous system complication in bacterial endocarditis. *Am. J. Med.*, 1969, 47, 513—605.
13. Woolf A. L., Hoult J. G.: Atypical encephalitides. W: Encephalitides. Elsevier. Amsterdam 1961, 315—324.

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

KOMUNIKATY

The 11th International Symposium of the „FULTON SOCIETY” on „BRAIN METABOLISM”, will be held on October 2, in New Orleans, along with the 108th Annual Meeting of the „AMERICAN NEUROLOGICAL ASSOCIATION”.

In this Symposium outstanding personalities from Europe and America will participate. All the papers will be printed in an extraordinary Volume of the „International Journal of Neurology” Official Journal of the „FULTON SOCIETY”.

For further information please address to:

Prof. Dr. Victor Soriano — Calle Buenos Aires 363, Montevideo — Uruguay.

HALINA KROH

CEREBRAL SHOCK-BODIES MICROTHROMBI IN THE CASE OF GERMINOMA IN THE PINEAL REGION

Department of Neuropathology, Medical Research Centre Polish Academy
of Sciences

Microthrombi in the capillaries and cerebral venules are a common finding, particularly in the foci of ischemic necrosis. They are composed of fibrin and thrombocytes, sometimes with an admixture of leukocytes (Cervós-Navarro, Schneider 1980). A special variety of microthrombi is caused by shock-bodies. The shock-bodies are formed *in vivo* as a result of fibrinolytic activity due to the postulated spontaneous aggregation of fibrinogen-split products (Skjörten et al. 1970). Morphological elements are not involved in the development of shock-bodies. An example of this rare form of microthrombi is presented in the discussed case.

CASE REPORT

Man aged 25. Admitted to the Neurosurgical Ward of the Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences in general severe condition, confused, blood pressure 70/0 mm Hg, pulse 100/min, tachypnoe 36/min. In anamnesis diabetes insipidus 2 years earlier. For 1 year mental disturbances (depression, persecution mania, delusions). Diagnosis: Brain tumor. Neurological findings: Patient without contact, optic discs congested. During 1 week hospitalization the following data were obtained: EEG: Diffuse theta waves 4—7 Hz, amplitude up to 70 nV. In frontal and temporal areas groups and series of slow waves 1. 5—3 Hz, amplitude up to 100 nV. Cranial x-ray: central calcification in pineal region. Carotid angiography normal. CSF investigated 3 times: pink, pressure 20 and 6 mm H₂O, cytosis 1, 10,3 cells/mm³, proteins 273, 243, 289 mg⁰/_o, Nonne Appelt ++, Pandey +++. Blood count: erythrocytes 5.145.000, 3.6000.000/mm³, leukocytes 3.500, 10.200, 3.700/mm³, platelets 160.000, 119.000, 135.000/mm³. Clotting time 72 sec, prothrombin index 61% of the norm. Serum: proteins 6.54, 6.33 g⁰/_o, urea 64, 182 mg⁰/_o, Na — 173.0, 164.0, 173.0 mEq/l, P — 2.3, 4.05 mEq/l, Cl — 133.0 mEq/l. Urine: protein 59, 105 mg⁰/_o, leukocytes 3—5, 8—10, hyaline casts 1—2, 6—8.

Clinical course: Next day after admission — fever. On 4th day tracheostomy, antibiotics. On 6th day of hospitalization *diathesis haemorrhagica* in the form of pinpoint and spot exsanguinations on the forearms, neck and frontal part of the chest. Bronchopneumonia diagnosed. Died on 7th day after admission.

General *post mortem* examination (No 99/1979 Dept. Path. Anat., Bielański Hospital, Warsaw). *Tumor regionis hypophysis. Oedema cerebri. Status post tracheostomiam. Haemorrhagiae confluentes musculi sternocleidomastoidei utriusque.* Microscopic evaluation: Lungs — *pneumonia confluens partim abscedens bilaterals cum pleuritide fibrinoso-purulenta bilateralis.* Liver — *hyperaemia, steatosis.* Thyroid gland — *fibrosis focalis.* Kidneys — *hyperaemia.* Suprarenal glands — *hyperaemia gradu magno, necrosis haemorrhagica focalis corticis praecipue dextrae et hyperplasia pseudoadenomatosa corticis focalis.* Colon — *colitis partim haemorrhagica.* Pancreas — *necrosis haemorrhagica.* Heart — *hyperaemia.*

Brain gross pathology (No 17/1979 Department of Neuropathology, Med. Res. Centre, Pol. Acad. Sci). Weight 1350 g. Artifactual lack of cerebral tissue in the area of optic chiasm and hypophyseal gland. Meningeal vessels congested, walls of basal cerebral vessels unchanged. The ependymal lining of cerebral lateral ventricles 1—2 mm deep — yellow. The surroundings of the III ventricle, *septum pellucidum* and *columnae fornicis* replaced by yellow disintegrating mass. The IV ventricle also covered with yellow, granular tissue. Diagnosis: *Ventriculitis?*

Microscopic evaluation: Periventricular neoplastic infiltration occupying the above described areas is composed of large moderately stained lobulate cells with large nuclei and distinct nucleoli. Moderate number of mitotic figures. Neoplastic infiltration of medium density without structural arrangement, its periphery well limited. Other minor components of the tumor are groups of small hyperchromatic cells, also perivascular. General view of the tumor is alike in both cerebral and cerebellar infiltration. Some capillaries and venules in both areas contain mainly perimurally globular bodies of various size, mostly homogeneous, some with translucent small areas (Fig. 1). The bodies are surrounded by thin radial fibrils, so their shape is rather star-like (Fig. 2). In H-E staining they are eosinophilic, in PAS and PTAH staining strongly positive. A few vessels in neoplastic area contain also some globular bodies with smooth surface, exhibiting identical staining properties. Between the bodies occasionally thick threads of fibrin, or dense, interlacing mesh appear. The red blood cells are grouped in such circumstances in the central part of the lumen. Outside the tumor infiltration, some venules and capillaries of white and gray matter (Fig. 3) as well of the meninges (Fig. 4) show smooth globular bodies of various size, single or in groups obliterating vascular lumen.

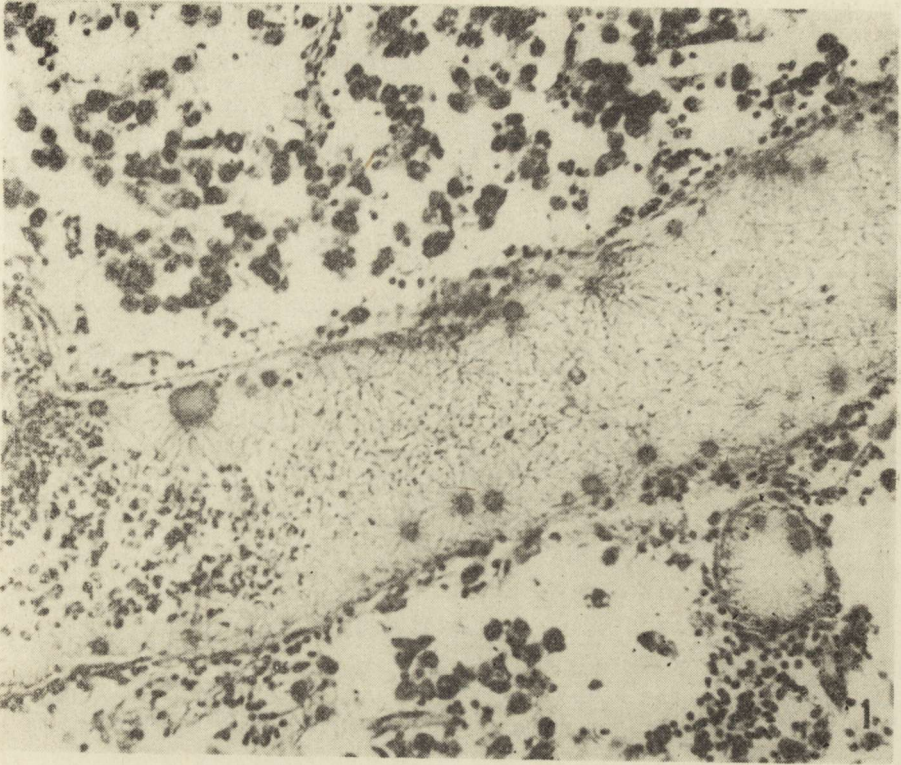


Fig. 1. Cerebellar tumor venule filled with fibrin and star-like shock-bodies adhering to the vessel wall. H—E. $\times 100$

Ryc. 1. Żyłka w mózdkowej części nowotworu wypełniona włóknikiem i gwiazdkowatymi ciałkami wstrząsowymi przylegającymi do ściany naczynia. H—E. Pow. $100 \times$

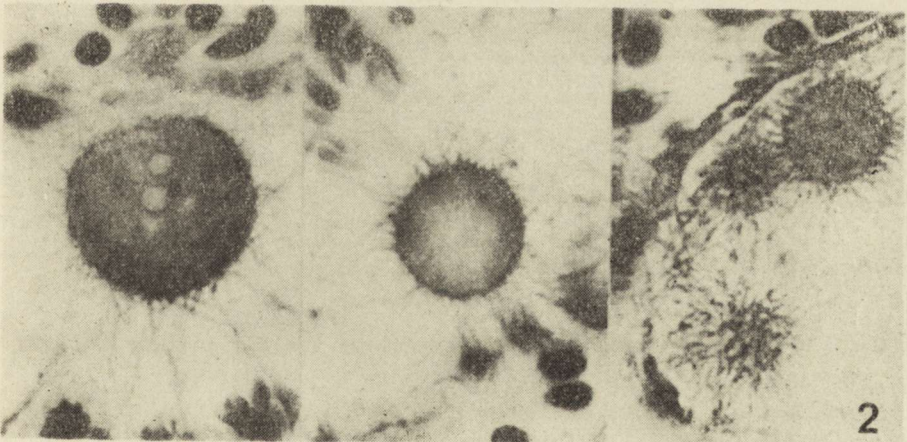


Fig. 2. Star-like shock-bodies. Nomarski microscope. H—E. $\times 1000$

Ryc. 2. Gwiazdkowate ciała wstrząsowe. Mikroskop Nomarskiego. H—E. Pow. $1000 \times$

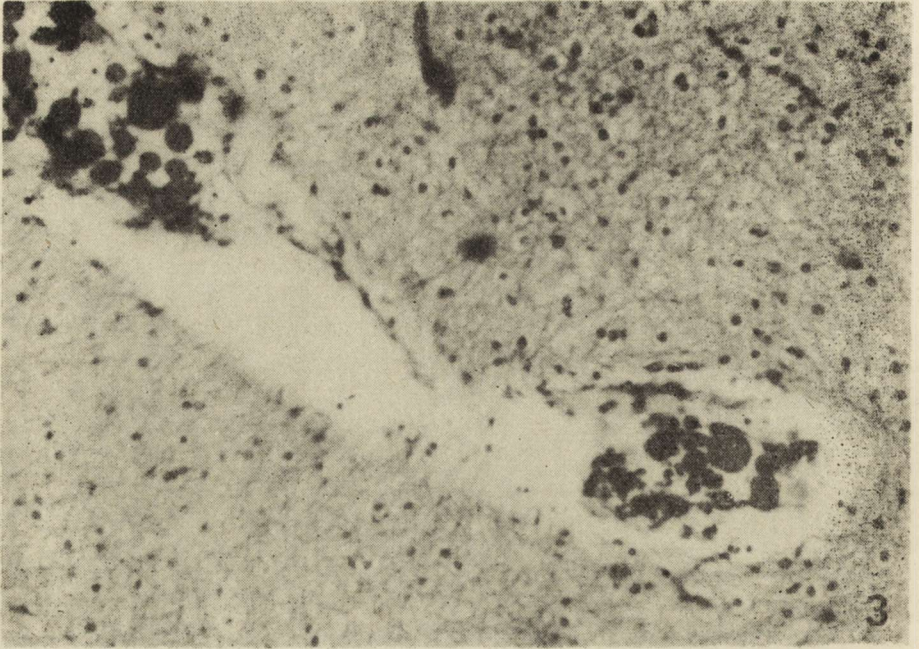


Fig. 3. Cerebellar venule thrombosed with shock-bodies. H—E. $\times 100$
Ryc. 3. Mózdzek; żyłka wypełniona ciałkami wstrząsowymi. H—E. Pow. 100 \times

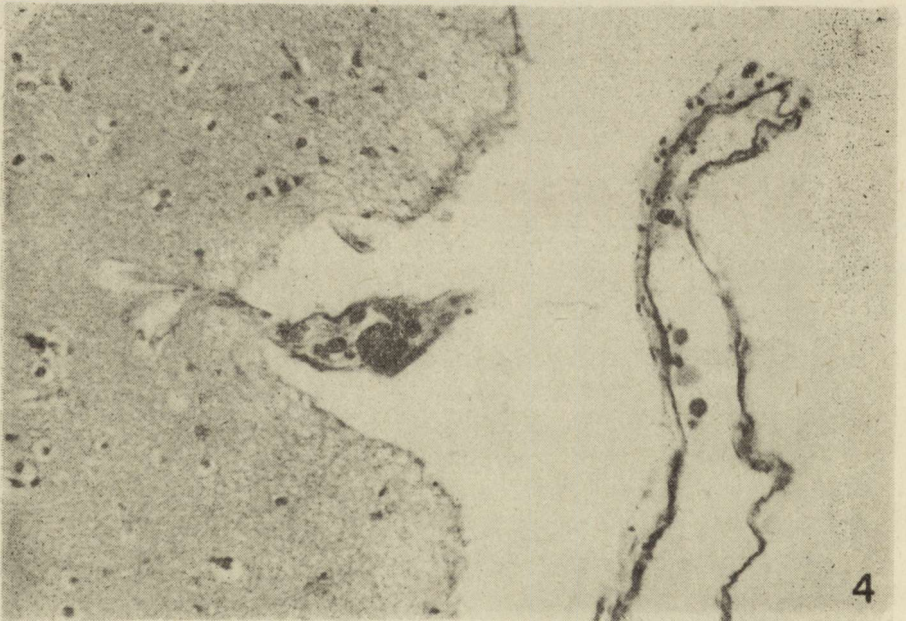


Fig. 4. Shock-bodies microthrombus in meningeal cerebral vessel. PAS. $\times 400$
Ryc. 4. Mikrozakrzep z ciałek wstrząsowych w naczyniu opony mózgu. PAS. Pow. 400 \times

Diagnosis: *Germinoma regions pinealis ad ventriculum III et IV penetrans*. Shock-bodies microthromboses.

DISCUSSION

Microthrombi in the terminal segments of the vascular tree are considered to be a shortlasting and reversible process developing as a result of disturbed balance between fibrin aggregation and fibrinolysis. During permanent disorder of fibrinolysis caused by septic condition or vast burns it can develop irreversible formation of fibrin globules (former hyaline bodies), presently called shock-bodies, "Schock Kügelchen". Their name originates from clinical shock, during which they can be found. Microthrombi formed by the shock bodies were mostly found but only in single sections in one or two organs. To the privileged ones belong lung, liver, kidney, spleen, pancreas, stomach and suprarenal glands (Rotter 1971). The first description of cerebral microthrombosis with hyaline globules in septic diseases is given by Manasse in 1892 (cit. after Cervós-Navarro 1980), other authors confirmed this observation (Sturm et al. 1974; Jellinger 1977). Skjörten (1969) found a number of autopsied cases presenting these changes. The microthrombosis in organs is usually associated with hemorrhagic diathesis expressing general consumption coagulopathy. Another sign of the process is the prolonged clotting time. Both phenomena were observed in the terminal period of life of the investigated patient. Another finding were shock-bodies among fibrin mesh occluding vascular lumina and star-like shock-bodies lying free or adhering to the vessel wall. Thrombotic globules in cerebral vessels with radially attached fibrils have already been described in human cases with extensive mortal burns (Dominiczak 1957). Also in the case of encephalitis (Kulczycki, personal communication) the cerebral microthrombi were found containing two types of shock-bodies: smooth and star-like globules. Personal observations and other published data seem to indicate that both types of shock-bodies express different phases of the coagulation process. Dominiczak (1957) suggested that the fibrin fibrils acquire a globular shape when passing through the capillaries. The perimural location of star-like shock-bodies might indicate additional coagulation on the smooth surface of shock-bodies with following immobilisation. On the contrary hyaline microthrombi are usually not attached to the vessel wall (Skjörten 1969). A marked difference in size, especially of the star-like bodies in comparison with the relatively comparable size of the smooth ones speaks of gain in their mass. The presence of star-like shock-bodies almost exclusively in the neoplastic infiltration might indicate special conditions in this area favoring formation of star-like shock globules.

MIKROZAKRZEPY MÓZGOWE Z CIAŁEK WSTRZĄSOWYCH
W PRZYPADKU GERMINOMA OKOLICY SZYSZYŃKI

Streszczenie

W pracy opisano przypadek *germinoma* naciekającego ściany komór bocznych i komory IV, stwierdzony sekcyjnie w mózgu 25-letniego mężczyzny. W naczyniach włosowatych i żyłkach obecne były mikrozakrzepy rzadkiego typu, utworzone przez ciała wstrząsowe dwóch rodzajów: gładkie kule, znane dawniej jako ciała hialinowe, i kule o powierzchni pokrytej promieniste niemi włókniaka, przypominające gwiazdki. Ciała wstrząsowe gładkie występowały głównie poza guzem, natomiast ciała gwiazdkowate prawie wyłącznie w obrębie nowotworu. Ciała wstrząsowe gwiazdkowate są niezwykle rzadkim składnikiem mikrozakrzepów.

W pracy dyskutuje się tworzenie się mikrozakrzepów z ciałek wstrząsowych, na tle danych klinicznych.

ГОЛОВНОМОЗГОВЫЕ МИКРОТРОМБЫ ИЗ ШОКОВЫХ ТЕЛЕЦ В СЛУЧАЕ
ГЕРМИНОМЫ ОБЛАСТИ ШИШКОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

В статье описан случай герминомы инфильтрирующей стенки боковых желудочков и IV желудочка, констатированный при вскрытии в головном мозгу 25-летнего мужчины. В капиллярах и веночках находились микротромбы редкого типа, образованные шокowymi тельцами двух родов: гладкие шарики, известные прежде как гиалиновые тельца, и шарики, поверхность которых была лучисто покрыта нитьми фибрина, напоминающими звездочки. Шоковые гладкие тельца выступали главным образом вне опухоли, зато звездообразные тельца почти исключительно в пределах опухоли. Звездообразные шокковые тельца являются очень редкой составной частью микротромбов.

В статье обсуждается образование микротромбов из шокowych телец на фоне клинических данных.

REFERENCES

1. Cervós-Navarro J., Schneider H.: Pathologie des Nervensystems. I. Durchblutungsstörungen und Gefässerkrankungen des Zentralnervensystems. Ed. G. Ule., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1981, 13/1, 140—144.
2. Dominiczak K.: Przyczynę do zmian morfologicznych ośrodkowego układu nerwowego w oparzeniach. Rocznik Pom. Akad. Med., 1957, III, 195—227.
3. Jellinger K.: Nichtthrombotische zentralnervöse Gefäßembolien. Zbl. allg. Pathol. pathol. Anat., 1977, 121, 554—555.
4. Manasse P. 1892 — cit after Cervós-Navarro J., Schneider H.
5. Rotter W.: Das morphologische Substrat des Schoks. Med. Welt 1971, 22, 1175—1180.
6. Skjörten F.: Hyaline microthrombi in an autopsy material. A quantitative study with discussion of the relationship to small vessel thrombosis. Acta path. microbiol. Scand., 1969, 76, 361—375.
7. Skjörten F., Kierulf P., Degre M.: Formation of hyaline microthrombi in the mouse. Acta path. microbiol. Scand. Sect. A., 1970, 78, 351—361.
8. Sturm K. W., Wenzel E., Tamaska L., Holzhüter H.: Comparative study of neuropathological findings and coagulation parameters in disseminated intravascular coagulation. Pathology of the cerebral microcirculation. Ed. Cervós-Navarro J., De Gruyter, Berlin, New York 1974, 419—424.

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

OCENA KSIĄŻEK

"CRANIOCEREBRAU COMPUTER TOMOGRAPHY — CORELATION WITH NEUROPATHOLOGY" pod redakcją A. Wackenheim, L. Jeanmarta i A. L. Baerta. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. Stron 130, rycin 498, zademonstrowanych przypadków 112.

Jest to pierwsza, wydana w formie atlasu, wyczerpująca monografia przedstawiająca komputerowo-tomograficzny i patomorfologiczny obraz najważniejszych patologii wewnątrzczaszkowych.

Główną zaletą tej nowoczesnej i instruktażowej pracy jest zademonstrowanie obrazów skanerowych w korelacji z preparatami anatomopatologicznymi. Preparaty anatomopatologiczne przedstawione zostały w postaci przekrojów przez obie półkule (w analogicznych co skanerowe warstwach i pod identycznym kątem. W rozdziałach poświęconych guzom mózgu autorzy przedstawili także preparaty histopatologiczne. Praca została podzielona na 12 rozdziałów.

Rozdział pierwszy dotyczy malformacji układu komorowego i układu naczyniowego. Szczególnie interesujące jest w nim przedstawienie tomograficzno-komputerowej symptomatologii anomalii naczyniowych i ich powikłań. Ryciny demonstrują różne typy naczyńniaków widocznych w obrazie skanerowym, szczególnie wyraźnie po wzmocnieniu kontrastowym.

W następnym rozdziale poświęconym chorobom zapalnym, autorzy przedstawiają kilkanaście przypadków ropni i ropniaków mózgu o różnej lokalizacji i obrazie skanerowym. Szczególnie interesujące są przypadki zmian zapalnych podwyściółkowych, nacieków w strukturach głębokich i zapaleń swoistych. Szeroko opracowany został rozdział poświęcony samoistnym krwiałom śródmózgowym i krwawieniom do przestrzeni płynowych. W omówieniu autorzy poświęcają wiele miejsca ocenie ewolucji krwiaka, różnicowaniu stref obrzęku od brzeżnej hemolizy krwiaka itp. Przedstawiono także szereg ciekawych przypadków odmiennej ewolucji krwiaka śródmózgowego.

Dział poświęcony guzom mózgu jest obszerny i obejmuje 40 przypadków najczęściej spotykanych guzów mózgowia i mózdzku. Oprócz przekrojów poprzecznych spotykamy tu preparaty histopatologiczne.

Atlas pod redakcją Wackenheim i wsp. jest pracą pionierską. Przedstawione ilustracje, doskonale reprodukcje zarówno obrazów skanerowych, jak i preparatów anatomicznych, a także zwięzłe teksty czynią tę pracę niezwykle przydatną dla neuroradiologów i neuropatologów.

Jerzy Walecki

*

"COMPUTED TOMOGRAPHY of the BRAIN" pod redakcją G. Salamona i Y. P. Huang. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1980. Stron 154, ilustracji 359, indeks rzeczowy.

Atlas ten przedstawia anatomię mózgowia i mózdzku w obrazie tomograficzno-komputerowym w korelacji z odpowiednimi przekrojami preparatów anatomicznych. Autorzy demonstrują poszczególne przekroje w płaszczyznach stosowanych w badaniach skanerowych — poprzecznej, czołowej i strzałkowej. Obrazy CT w płaszczyźnie strzałkowej uzyskiwano wykorzystując program rekonstrukcji wtórnej używanej powszechnie w aparatach nowszej generacji. Jakość obrazów skanerowych, a także preparatów anatomicznych jest doskonała, przewyższa znacznie dotychczasowe, klasyczne pozycje Gambarellego (1977) i Matsui (1978).

Atlas ten powinien zainteresować neuropatologów i neuroradiologów, jest bowiem pozycją nowatorską, przedstawiającą anatomię mózgu z uwzględnieniem przekrojów, co było rzadko stosowane przed erą tomografii komputerowej.

Jerzy Walecki

KOMUNIKATY

VIIth INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY

Helsinki, Finland 5 — 11th August 1984

The following topics will be included in the programme:

- Immunocytochemistry
- Quantitation in histochemistry
- Automatic cell analysis
- Flow cytometry
- Analytical electron microscopy
- Neurohistochemistry
- Histochemistry of the cytoskeleton
- Histochemistry of collagen
- Surface enzymes and cell uptake
- Proteases
- Cell differentiation
- Cell cultures
- Nuclear histochemistry
- Histochemistry in botany
- Histochemical pharmacology and toxicology
- Histochemistry in pathology

To receive the Second Circular please contact: Congress Secretariat, Department of Anatomy, University of Helsinki — Siltavuorenpenger 20 A, 00170 HELSINKI 17, Finland

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 31 maja na II półrocze roku bieżącego.

Cena prenumeraty:

| | |
|------------|----------|
| półrocznie | — 200 zł |
| rocznie | — 400 zł |

Jednostki gospodarki społecznej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach, 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 zlecających instytucji i zakładów pracy.

| | |
|---|----------|
| Mirosław J. Mossakowski, Lubomira Dydyk, Mieczysław Śmiałek: Early lesions of the central nervous system in experimental manganese intoxication | 393 |
| Barbara Kosicka, Teresa Bugera, Andrzej Członkowski, Mieczysław Śmiałek: Effect of experimental manganese chloride intoxication on gamma-aminobutyric acid content and dopaminergic D-2 receptor in rat brain | 411 |
| Andrzej Kapuściński: Effect of common carotid artery occlusion and changes of arterial pressure on cerebral bioelectric function in rat | 419 |
| Andrzej Kapuściński: Complete hemispheric inschemia of the rat brain | 427 |
| Joanna Majkowska, Ewa Joachimowicz: A case of the diffuse inflammatory and necrotic process of the brain and meninges in the course of acute bacterial endocarditis | 435 |
| Halina Kroh: Cerebral shock-bodies microthrombi in the case of germinoma in the pineal region | 445 |
| Book reviews | 451 |
| Announcements | 444, 453 |

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----------|
| Анна Тарашевска: Оценка нарушений образования миелиновых оболочек у кролика рт на базе электронно-микроскопного исследования спинного мозга | 327 |
| Анджей Гонджевич: Применение ультраструктурной иммунохимии для исследований локализации высокомолекулярного гликопротеида миелина (MAG) в раннем периоде валлеровской дегенерации в зрительной системе | 343 |
| Мечислав Вендер, Зофия Адамчевска-Гонджевич: Влияние диеты обогащенной жирными кислотами на липиды миелина развивающегося головного мозга крысы | 353 |
| Мечислав Вендер, Зофия Адамчевска-Гонджевич, Анджей Журавски: Состав жирных кислот липидов миелина крыс кормленных во время развития безжировой диетой | 363 |
| Павел П. Либерски, Януш Альвасяк: Невропатология экспериментальной трансмиссионной губчатой энцефалопатии (263 К штамм scarpie пассажированный золотыми сирийскими хомяками). I. Стандартная патология и развитие изменений | 377 |
| Мирослав Я. Моссаковский, Любомира Дыдык, Мечислав Сьмялэк: Раннее повреждение центральной нервной системы в экспериментальном отравлении соединениями марганца | 390 |
| Барбара Косицка, Тереса Э. Бучера, Анджей Члонковский, Мечислав Сьмялэк: Влияние экспериментального отравления хлористым марганцем на уровень гамма-аминомасляной кислоты и допаминэргического рецептора D-2 в мозге крысы | 411 |
| Анджей Капусьцински: Оценка влияния окклюзии общих сонных артерий и изменений артериального давления на биоэлектрическую функцию головного мозга у крысы | 419 |
| Анджей Капусьцински: Полная ишемия полушарий мозга у крысы | 427 |
| Йоанна Майковска, Эва Йоахимович: Случай разлитого воспалительного процесса менингоэнцефалита и протяженных некротических изменений в течение острого бактериального эндокардита | 435 |
| Халина Крох: Головно-мозговые микротромбы из шоковых телес в случае герминомы области шишковидной железы | 445 |
| Рецензии книг | 451 |
| Сообщение | 444, 453 |

SPIS TREŚCI

| | |
|--|----------|
| Anna Taraszewska: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika na podstawie badań rdzenia kręgowego w mikroskopie elektronowym | 327 |
| Andrzej Goncerzewicz: Zastosowanie immunocytochemii ultrastrukturalnej do badań lokalizacji wysokocząsteczkowej glikoproteiny mieliny (MAG) we wczesnym okresie zwyrodnienia Wallera w układzie wzrokowym | 343 |
| Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz: Wpływ diety wzbogaconej w kwasy tłuszczowe na lipidy mieliny rozwijającego się mózgu szczura | 353 |
| Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, Andrzej Żórawski: Skład kwasów tłuszczowych lipidów mieliny szczurów utrzymywanych w czasie rozwoju na diecie beztłuszczowej | 363 |
| Paweł P. Liberski, Janusz Alwasiak: Neuropatologia eksperymentalnej transmisyjnej encefalopatii gąbczastej (263 K szczep scrapie pasażowany przez złote chomiki syryjskie). I. Standardowa patologia i rozwój zmian | 377 |
| Mirosław J. Mossakowski, Lubomira Dydyk, Mieczysław Śmiałek: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu | 393 |
| Barbara Kosicka, Teresa E. Bugera, Andrzej Członkowski, Mirosław Śmiałek: - Wpływ doświadczalnego zatrucia chlorkiem manganowym na poziom kwasu gamma-aminomasłowego (GABA) i receptor dopaminergiczny D-2 w mózgu szczura | 411 |
| Andrzej Kapuściński: Ocena wpływu okluzji tętnic szyjnych wspólnych i zmian ciśnienia tętniczego na czynność bioelektryczną mózgu u szczura | 419 |
| Andrzej Kapuściński: Całkowite nie dokrwienie półkul mózgowych u szczura | 427 |
| Joanna Majkowska, Ewa Joachimowicz: Przypadek rozlanego procesu zapalnego mózgu i opon oraz rozległych zmian martwiczych w przebiegu ostrego bakteryjnego zapalenia wsierdzia | 435 |
| Halina Kroh: Mikrozakrzepy mózgowe z ciałek wstrząsowych w przypadku <i>germinoma</i> okolicy szyszynki | 445 |
| Komunikaty | 444, 453 |
| Ocena książek | 451 |

CONTENS

| | |
|---|-----|
| Anna Taraszewska: Evaluation of disturbances in myelin sheaths formation in pt rabbit. Electron microscopic study of spinal cord | 327 |
| Andrzej Goncerzewicz: Application of electron immunocytochemistry to the study of distribution of myelin-associated glycoprotein in the early period of Wallerian degeneration in the optic system | 343 |
| Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska Goncerzewicz: Effect of a fatty acid enriched diet on myelin lipids of the developing rat brain | 353 |
| Mieczysław Wender, Zofia Adamczewska-Goncerzewicz, A. Żórawski: Fatty acid composition of myelin lipids in developing rats kept on a fat deficient diet | 363 |
| Paweł P. Liberski, Janusz Alwasiak: Neuropathology of experimental transmissible spongiform encephalopathy (263 K strain of scrapie in golden Syrian hamsters) I. Standard pathology and development of lesions | 377 |