

p. 105

II ep. z dan

ep 2

PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

A-23
D-13

TOM 22

1984

ZESZYT 2

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

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 22

1984

ZESZYT 2

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

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

REDAKCJA ŚCISŁA

Janusz Groniowski, Adam Kunicki, Mieczysław Wender, Irmina Zelman

REDAKCJA

Redaktor Naczelny: Mirosław J. Mossakowski
Sekretarz Redakcji: Halina Weinrauder

ADRES REDAKCJI

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

Wydano z pomocą finansową Polskiej Akademii Nauk

Zakład Narodowy im. Ossolińskich — Wydawnictwo. Wrocław 1984.
Nakład: 550 egz. Objętość: ark. wyd. 10,20, ark. druk. 8,50, ark.
A₁-11. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do składania
30 I 1984. Podpisano do druku 13 VI 1984. Druk ukończono w lipcu
1984. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 74/84. Z-7. Cena zł 100.—



MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI, HALINA WEINRAUDER

IMMUNOMORPHOLOGY OF WILSONIAN
AND HEPATIC GLIOPATHY *IN VITRO*

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

Astrocytic abnormalities dominating the neuropathological picture of hepatic encephalopathy, underlie hypothesis of primary glial lesions as the background of the disease syndrome (Mossakowski 1966; Seitelberger 1970). Impairment of astrocytes in encephalopathies resulting from chronic and acute liver damage is similar, if not identical, to that observed in hepato-lenticular degeneration. In both pathological conditions it is characterized by concomitance of progressive and regressive astrocytic changes. The former, expressed as cellular proliferation and hypertrophy are considered to be the exponents of compensatory processes, while the latter, taking the form of non-specific degeneration, involving mostly cellular extensions, and leading to the appearance of cells deprived of processes are resultants of the direct action of the toxic factor or factors. Special types of glial abnormalities, considered as typical of hepato-cerebral pathology appear against the background of the above mentioned non-specific changes. These are Alzheimer cells, type I and II, and Opalski cells. Alzheimer cells, type II, known also under the names of naked nuclei or metabolic glia, are common for both Wilson's disease and hepatic encephalopathy, whereas those of type I are characteristic only of hepato-lenticular degeneration (Mossakowski 1978). Opalski cells, described originally as pathognomonic for Wilson's disease (Opalski 1930) appear in both processes, although they are less common in chronic hepatogenic encephalopathy and do not occur in the acute form (Mossakowski 1966; Mossakowski et al. 1974).

All the above mentioned pathological forms of astrocytes were obtained in tissue cultures, growing in nutrient media supplemented with either sera from patients with Wilson's disease and hepatic coma or exogenous compounds of copper and ammonia (Mossakowski et al. 1970). They were also found in cultures on medium with exogenous sodium

malonate, a chemical inhibitor of the succinic dehydrogenase system (Renkawek et al. 1973) and blood serum of rats, in which acute liver failure had been induced by thioacetamide intoxication (Kraśnicka et al. 1983).

Aiming at a further characteristics of astrocytic abnormalities in hepatogenic encephalopathy, a series of immunomorphological studies was undertaken. This seemed to be even more justified as Opalski cells are considered by some authors (Kryspin-Exner 1931; Greenfield 1963) as cells of mesodermal origin, contrary to the opinion of the author of their original description (Opalski 1930) and numerous further data concerning their morphology and metabolic properties (Mossakowski 1965). Evidence of specific glial markers could, therefore, settle the question of their histogenesis. Glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS) and glial antigen, described by Weinrauder and Lach (1975) were chosen as cellular markers.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on organotypic cultures of newborn rat cerebella carried out either in Carrel flasks or Maximov's double coverslip chambers according to the method described by Kraśnicka and Mossakowski (1965). The nutrient medium, renewed twice weekly, contained 50% of normal human serum, 40% of buffered salt solution (Laboratory of Sera and Vaccines Production, Lublin, Poland) and 10% of chicken embryo extract. The medium was supplemented with glucose to the final concentration of 600 mg⁰/₀, pH was adjusted to 7.0–7.3.

Selected cultures after 6–8, 10–12 and 14–15 days *in vitro* were divided into groups, which were exposed for 1–7 days to sera of untreated patients with Wilson's disease or the hypermmonemic form of hepatic coma and to exogenous copper acetate and ammonia chloride. The scheme of experiments, basically identical with that used in previous studies (Mossakowski et al. 1970) is presented in table 1.

The control cultures were grown for the whole time in routine nutrient media, without any of the above mentioned pathogenic factors. Cultures were controlled every day under a phase-contrast microscope and at chosen time intervals, depending on their general condition, were used for histological and immunomorphological studies.

For histological examination, cultures were fixed in Carnoy's solution and stained with toluidine blue.

Cultures for immunomorphological study were washed three times (15 min each time) in PBS (phosphate buffered physiological solution of sodium chloride), dried and then fixed in cold (–20°C) acetone for 4 min. Fixed cultures were incubated in appropriate immune sera at room temperature for 30 min and washed in PBS (3 × 15 min). The second incubation was carried out in the F(ab)₂ -fragment of anti-rabbit

Table 1. Experimental scheme
Tabela 1. Schemat doświadczenia

Experimental group Grupa doświadczalna	Pathogenic factor Czynnik patogenny	Content in the nutrient medium Zawartość w środowisku odżywczym	Time of exposure Czas ekspozycji
I	serum from patients with hepatolenticular degeneration surowica chorych ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym	50%	3–6 days dni
II	serum of patients with hepatic coma surowica chorych ze śpiączką wątrobową	50%	3–6 days dni
III	ammonia chloride chlorek amonu	100 mg%	1–3 days dni
IV	copper acetate octan miedzi	Cu ⁺⁺ 24.5 γ /ml	1–3 days dni

IgG, conjugated with fluorescein (Boehring A. G., FRG), diluted 1:20. Incubation lasted for 30 min and was carried out with sera from non-immunized rabbits (1:20) or PBS. The following anti-sera were used: 1) Anti-GFAP serum, obtained from Protein Laboratory, Copenhagen University (dr E. Bock). Dilution 1 in 100. 2) Anti-GS serum, obtained by subcutaneous immunization of albinotic rabbits with glutamine synthetase (Sigma) with complete Freund adjuvant and controlled in double immunodiffusion test (Weinrauder — in preparation). Dilution 1 in 20. 3) Anti-glial serum, obtained from a rabbit immunized by repeated intramuscular injections of rat brain extract emulgated with complete Freund adjuvant; to eliminate non-specific tissue antibodies, immune serum was additionally absorbed with serum and homogenates of rat kidney and liver. A single precipitation band was obtained in the immunodiffusion reaction with rat brain extract. Previous studies have documented a selective glial immunofluorescence reaction with this serum (Weinrauder, Kraśnicka 1980). Dilution 1 in 20.

RESULTS

The morphological picture of cultures in all experimental groups was identical with that described previously by Mossakowski et al. (1970). All cellular elements of the nerve tissue were present in the cultures, but pathological changes involved selectively astroglia. They were represented by the appearance of hypertrophied astrocytes, on the one hand,

and their degenerating forms, on the other. Hypertrophied astrocytes revealed a great variability of shape, ranging from large typical stellate cells through cells with abundant cytoplasm and scarce, short, layered extensions to bipolar spongioblastic forms. Fragmentation of cellular processes, involving both normal in size and hypertrophied astrocytes was the most common type of degenerative changes. Alongside with astrocytes with fragmented extensions and/or their reduced number, there appeared numerous cells lacking any processes, their irregular outlines only indicated the places of process origin. The process-deprived cells varied greatly in content of cytoplasm, which ranged from abundant to a very narrow, hardly visible rim surrounding enlarged nuclei. There were also cells represented only by large, pale, usually oval nuclei, with sharply outlined membranes. They resembled very much Alzheimer cells, type II. Against the background of the severely damaged glial population a very distinct feature were large, oval or round, usually mononuclear cells with abundant cytoplasm, lacking processes or showing their rudimentary forms. Their morphology corresponded to that of Opalski cells, typical of hepato-cerebral pathology *in vivo*. Careful examination of cultures made it possible to follow subsequent stages of transformation of some hypertrophied astrocytes to formed Opalski cells. Cellular forms, which could be equivalents of Alzheimer, type I cells were not observed in any of the experimental groups.

Despite the common pathomorphological pattern of all experimental groups, there existed essential differences between them as far as intensity of the pathological process is concerned. In cultures grown with exogenous copper and ammonia the pathological changes of astroglia were most intense; this was decisive for shortening of the exposure time to the action of damaging agents to 3 days. In these groups of cultures, especially in that exposed to copper action hypertrophied astrocytes were less numerous; astrocytes with severely damaged processes prevailed. Opalski cells and typical naked nuclei were not a common feature. On the contrary, these cellular types were very numerous in cultures grown with sera from patients with hepatic coma, so were hypertrophied astrocytes appearing alongside with their degenerating forms. The least intense astrocytic lesions were found in cultures with sera of patients with Wilson's disease. There were numerous hypertrophied astrocytes, Opalski cells and naked nuclei, less common were stellate cells showing features of non-specific degeneration.

The immunofluorescent reaction was similar in all experimental groups, revealing an evident relationship between its intensity and the degree of morphological abnormality. Therefore IF-intensity was generally weaker in cultures exposed to the action of copper and ammonia and higher in those grown with sera of patients with Wilson's disease

and hepatic coma. The time of exposure to the action of the damaging factors influenced the immunomorphology of the culture to the same extent as it did to their histology. Cultures exposed for a longer period of time were more severely damaged and revealed weaker immunofluorescence than those with a shorter exposure period. Less differentiated cultures were more sensitive than older ones showing features of more advanced differentiation. Essential differences depended also on the immune sera used. This inclines to present the immunomorphological observations separately for each antiserum.

Anti-GFAP serum

Hypertrophied astrocytes showed a strong immunofluorescent reaction of variable intensity (Figs 1—4). It was strongest in cells showing typical features of large fibrous astrocytes, contrasting with remarkably weaker fluorescence in cells, the morphology of which was indicative of a protoplasmic type of astroglia (Fig. 1). Bright immunofluorescence sharply outlined profiles of cellular processes. It was also more accentuated around cell nuclei (Fig. 2). Sometimes, mostly in hypertrophied astrocytes with abundant irregular cytoplasm and with short layered processes strong fluorescence was connected with bundles and net of fibrillary cytoplasmic structures (Figs 3, 4).

A great variability of intensity of the immunofluorescent reaction was typical of degenerating astrocytes. It ranged from very strong to hardly visible (Figs. 5—8). As a rule it was more intense in those cells which still preserved their, if even rudimentary, processes (Figs 5, 6), although, even in cells with a relatively high intensity of reaction, its connection with intracytoplasmic fibrillary structures was not a feature. In this group of cells a strong dependence of the reaction intensity on the type of damaging factor was very clearly demonstrated. It was highest in cultures with sera from patients with hepato-lenticular degeneration (Fig. 5) and hepatic coma (Fig. 6) and considerably lower in those with exogenous ammonia (Fig. 7) and copper (Fig. 8). The variability of the reaction intensity in different cells led to a mosaic pattern of cultures.

Cells resembling naked nuclei gave a very poor immunofluorescent reaction. Enlarged, oval negative nuclei were surrounded by slightly brighter rims of the residual cytoplasm (Fig. 9). Intense fluorescence around some of them was observed extremely seldom. Sporadically, large astrocytic nuclei were located on a background revealing fluorescent reaction of fibrillary type with ill-defined outlines of individual cells (Fig. 10).

A distinguishing bright reaction was noticed in the cytoplasm of typical Opalski cells (Figs 11, 12). It was either homogeneous or granular

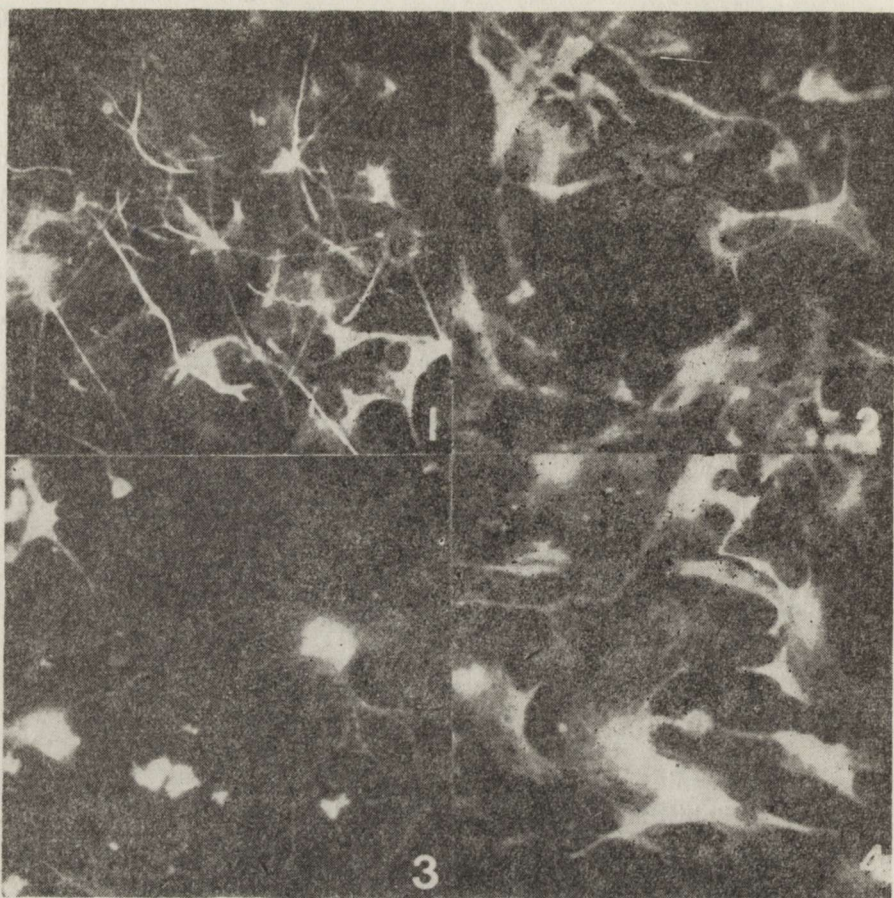


Fig. 1. Anti-GFAP serum, 14-day-old culture in medium containing serum from patient with Wilson's disease (3 days). Strong IF reaction in hypertrophied fibrous astrocytes and weaker in those with features of protoplasmic astroglia. $\times 250$

Ryc. 1. Surowica anty-GFAP. Hodowla 14-dniowa, z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Widoczna żywa reakcja IF w przerosniętych astrocytach włóknistych i znacznie słabsza w komórkach o morfologicznych cechach astrogleju protoplazmatycznego. Pow. $250 \times$

Fig. 2. Anti-GFAP serum, 10-day-old culture with medium containing serum from patient with Wilson's disease (3 days). Hypertrophied astrocytes with an intense IF reaction. Strong fluorescence around cell nuclei and in cellular processes. $\times 250$

Ryc. 2. Surowica anty-GFAP, hodowla 10-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Silny odczyn IF w przerosłych astrocytach. Intensywne świecenie wokół jąder i w wypustkach komórkowych. Pow. $250 \times$

Fig. 3. Anti-GFAP serum, 14-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (3 days). Strong IF reaction in hypertrophied astrocytes. Intense fluorescence of bundles and network of fibrils within short, distended cellular processes. $\times 250$

Ryc. 3. Surowica anty-GFAP, hodowla 14-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Silny odczyn IF w przerosniętych astrocytach. Zwraca uwagę świecenie sieci i pasm włókienek w cytoplazmie nieprawidłowych, płatowatych wypustek. Pow. $250 \times$

Fig. 4. Anti-GFAP serum, 12-day-old culture with exogenous copper salt (24 h). Hypertrophied astrocytes with strong IF reaction. Perikaryal cytoplasm with strongly fluorescent fibrillary network. $\times 300$

Ryc. 4. Surowica anty-GFAP, hodowla 12-dniowa z dodatkiem egzogennej miedzi (24 godz.). Przerosłe, nieprawidłowe astrocyty z silnym odczynem IF. W cytoplazmie perykaryalnej sieć włókienek z żywą fluorescencją. Pow. $300 \times$

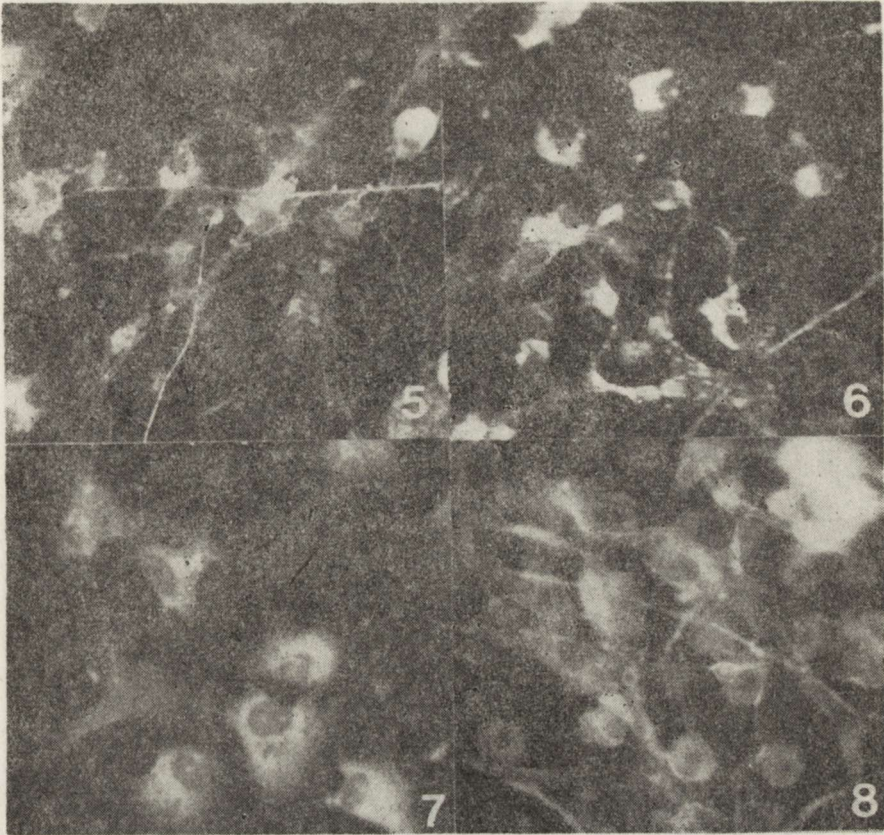


Fig. 5. Anti-GFAP serum, 14-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (3 days). Varying intensity of IF reaction in astrocytes with different degree of structural lesions. Bright fluorescence of preserved cellular processes. $\times 250$

Ryc. 5. Surowica anty-GFAP, hodowla 14-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Zróżnicowana intensywność odczynu IF w astrocytach o różnym stopniu uszkodzenia. Żywa fluorescencja w większości zachowanych wypustek. Pow. $250 \times$

Fig. 6. Anti-GFAP serum, 15-day-old culture with serum from patient with hepatic coma (6 days). Variability of IF reaction in degenerating astrocytes. Traces of fluorescence are seen in the remaining cellular processes. $\times 250$

Ryc. 6. Surowica anty-GFAP, hodowla 15-dniowa z surowicą od chorego ze śpiączką wątrobową (6 dni). Zróżnicowany odczyn IF w wyrodniających astrocytach. Ledwie zaznaczone zarysy nielicznych wypustek komórkowych. Pow. $250 \times$

Fig. 7. Anti-GFAP serum, 10-day-old culture with exogenous ammonia (24 h). Weak IF reaction in hypertrophied astrocytes, most of which are lacking processes. $\times 380$

Ryc. 7. Surowica anty-GFAP, hodowla 10-dniowa z egzogennym amoniakiem (24 godz.). Słaby odczyn IF w przerośniętych, głównie bezwypustkowych astrocytach. Pow. $380 \times$

Fig. 8. Anti-GFAP serum, 6-day-old culture with exogenous copper (48 h). Most astrocytes, lacking cellular processes exhibit weak IF reaction. Stronger fluorescence is seen in some of the remaining processes. $\times 380$

Ryc. 8. Surowica anty-GFAP, hodowla 6-dniowa z egzogenną miedzią (14 godz.). Większość astrocytów pozbawionych wypustek wykazuje słaby odczyn IF. Żywsza fluorescencja w nielicznych zachowanych wypustkach. Pow. $380 \times$

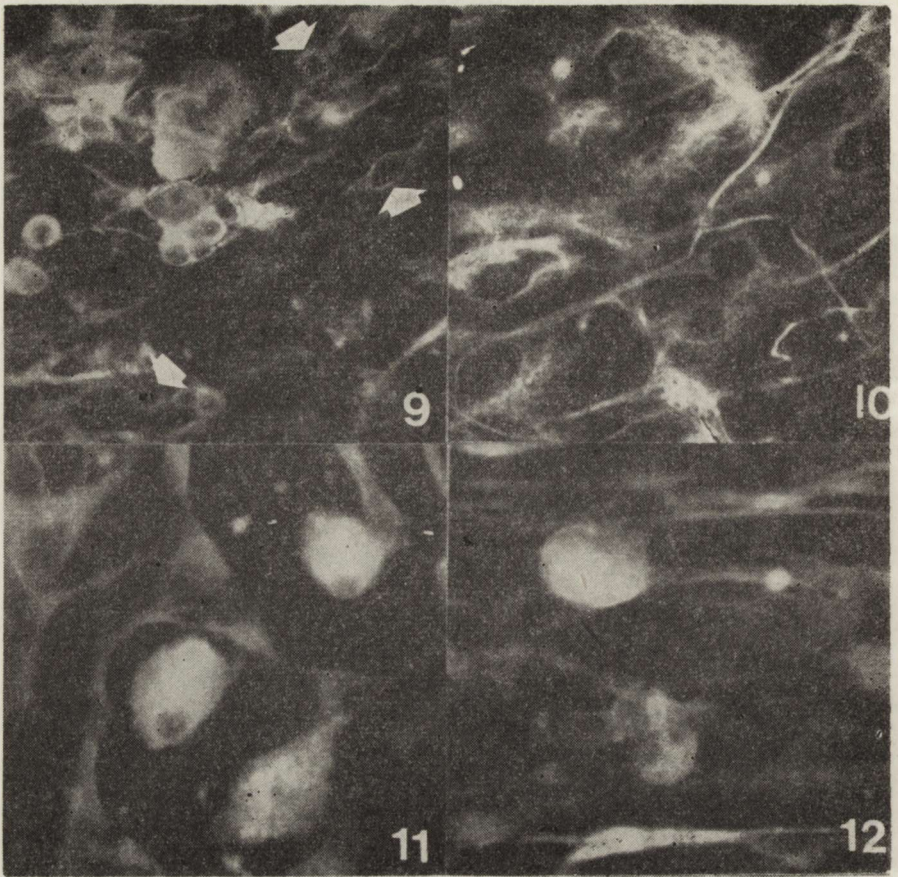


Fig. 9. Anti-GFAP serum, 15-day-old culture with serum from patient with hepatic coma (6 days). Most of the cells represented by enlarged, round or oval naked nuclei surrounded by a narrow rim of weak fluorescence (arrows). Some cells of the same type with a wider cytoplasmic ring with stronger IF reaction. $\times 250$

Ryc. 9. Surowica anty-GFAP, hodowla 15-dniowa z surowicą od chorego ze śpiączką wątrobową (6 dni). Większość komórek reprezentują okrągłe lub owalne nagie jądra otoczone wąskim rąbkim bardzo słabej fluorescencji (strzałki). Nieliczne — otoczone są obfitą cytoplazmą z żywym odczynem IF. Pow. $250 \times$

Fig. 10. Anti-GFAP serum, 15-day-old culture with serum from patient with hepatic coma (6 days). Enlarged astrocytic nuclei against weakly fluorescent background with hardly visible cellular boundaries. Somewhat stronger IF reaction in the remaining cellular processes. $\times 400$

Ryc. 10. Surowica anty-GFAP, hodowla 15-dniowa z surowicą chorego ze śpiączką wątrobową (6 dni). Powiększone jądra astrocytów na słabo świecącym tle ze słabo widocznymi błonami poszczególnych komórek. Nieco silniejszy odczyn IF w nielicznych zachowanych wypustkach. Pow. $400 \times$

Fig. 11. Anti-GFAP serum, 15-day-old culture with serum from patient with hepatic coma (6 days). Typical Opalski cells with strong homogeneous IF reaction against background of degenerating astrocytes with weak fluorescence. $\times 600$

Ryc. 11. Surowica anty-GFAP, 15-dniowa hodowla z surowicą od chorego ze śpiączką wątrobową (6 dni). Typowe komórki Opalskiego z silnym, homogennym odczynem IF, na tle zwyrodniałych astrocytów ze słabą fluorescencją. Pow. $600 \times$

Fig. 12. Anti-GFAP serum, 14-day-old culture with exogenous ammonia (3 days). Opalski cell with strong cytoplasmic fluorescence against background of weak reaction in damaged glial cells. In the lower part spongioblastic-like cell with strong fluorescence. $\times 600$

Ryc. 12. Surowica anty-GFAP, 14-dniowa hodowla z egzogennym amoniakiem (3 dni). Komórka Opalskiego z żywym odczynem IF w cytoplazmie, na tle słabej fluorescencji pozostałych komórek glejowych. W dolnej części ryciny spongioblastyczna komórka z żywym odczynem. Pow. $600 \times$

in nature. No fluorescence connected with fibrillary cytoplasmic structures was seen. The same nature and intensity of the reaction was found in those cells which seemed to represent transitions between hypertrophied astrocytes and typical Opalski cells (Fig. 13).

Anti-GS serum

As in the previous group, the positive immunofluorescent reaction was confined to the astroglial population. Comparing with reaction with anti-GFAP serum, it was different in intracytoplasmic distribution and nature. In no case, even in most hypertrophied astrocytes, was the reaction connected with cytoplasmic fibrillary structures. It was always homogeneous and evenly distributed in the perikaryal cytoplasm, cellular processes and perivascular end feet. The highly positive reaction of hypertrophied astrocytes contrasted with the negative vascular walls (Fig. 14). All cellular equivalents of hepatogenic gliopathy gave positive immunofluorescent reactions. The variability of reaction intensity was lesser than in the previous group. It was the same in large hypertrophied cells (Fig. 15) and in degenerating astrocytes with a varying degree of cellular damage (Fig. 17). A reaction of specially high intensity distinguished Opalski cells from the background of the remaining astrocytic population (Figs 15, 16). So it did in intermediate cells between hypertrophied astrocytes and typical Opalski cells (Fig. 17). The only weak reaction concerned naked nuclei.

Anti-gliai serum

The immunofluorescent reaction with anti-gliai serum was in general strongest, as compared with other ones. The distinguishing feature was also its appearance in both astrocytic and oligodendroglial populations. Contrary to the control cultures not-subjected to any of the used pathogenic factors, the reaction intensity with antigliai serum was stronger in hypertrophied and degenerating astrocytes (Fig. 18) than in oligodendrocytes (Fig. 19). The outlines of cellular processes were less visible than in cultures with other antisera. The variability of the reaction in different cell types was also less noticeable. Opalski cells showed a high intensity of immunofluorescent reaction in both perikarya and rudimentary processes (Fig. 20). The same was true for intermediate cells. On the contrary, the reaction around the naked nuclei was very weak (Fig. 21).

Control reactions

Control reactions performed either with sera of non-immunized rabbits or with PBS were negative (Fig. 22).

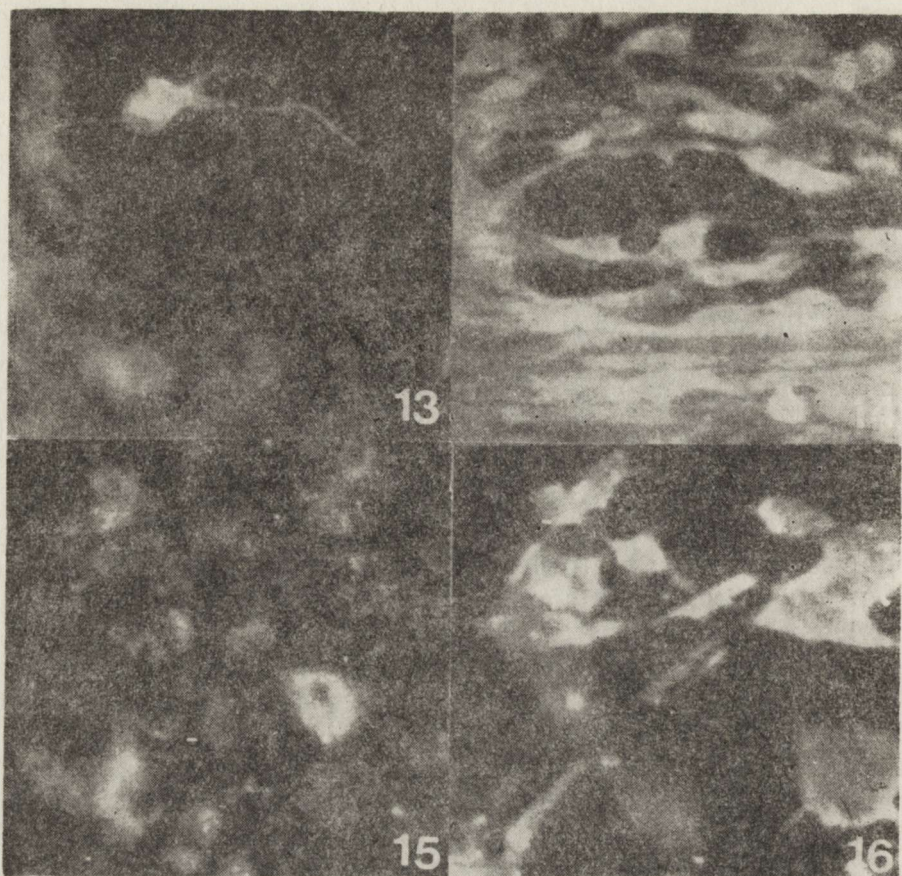


Fig. 13. Anti-GFAP serum, 12-day-old culture with exogenous copper (24 h). Intermediate form between hypertrophied astrocyte and typical Opalski cell with strong IF reaction in perikaryon and residual processes. In the lower portion naked nuclei surrounded by a narrow rim of weak fluorescence and brightly shining Opalski cell. $\times 600$

Ryc. 13. Surowica anty-GFAP, hodowla 12-dniowa z egzogenną miedzią (24 godz.). Postać przejściowa między przerosłym astrocytem a uformowaną komórką Opalskiego z żywym odczynem w cytoplazmie perykaryalnej i nielicznych wypustkach. W dolnej części ryciny nagie jądra z wąską obwódką słabej fluorescencji oraz komórka Opalskiego z silnym świeceniem cytoplazmy. Pow. 600 \times

Fig. 14. Anti-GS serum, 15-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (3 days). Strong IF reaction in hypertrophied astrocytes, some of which are lacking cellular processes, contrasting with weak fluorescence of the capillary wall. $\times 300$

Ryc. 14. Surowica anty-GS, hodowla 15-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Żywy odczyn IF w przerosniętych astrocytach, z których część pozbawiona jest wypustek, kontrastujący z negatywnym odczynem ściany naczyniowej. Pow. 300 \times

Fig. 15. Anti-GS serum, 6-day-old culture with exogenous copper (3 days). Against a dense background of astrocytes mostly deprived of processes with high IF reaction, strong cytoplasmic fluorescence of three Opalski cells is discernible. $\times 400$

Ryc. 15. Surowica anty-GS, hodowla 6-dniowa z egzogenną miedzią (3 dni). Na zbitym tle astrocytów pozbawionych w większości wypustek, wykazujących silny odczyn IF, wyróżnia się intensywniejsza fluorescencja trzech komórek Opalskiego. Pow. 400 \times

Fig. 16. Anti-GS serum, 14-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (3 days). Loosely lying and grouped astrocytes with residual pro-

DISCUSSION

The presented results indicate, that the pathological forms of astrocytes obtained in organotypic cerebellar culture preserve their fundamental immunomorphological properties, typical of astroglia in both *in vivo* and *in vitro* conditions. The applied antisera permitted to disclose the presence of: 1) glial fibrillary acidic protein (GFAP), considered as an immunological marker of astrocytes, mostly fibrillary ones but to a lesser degree of protoplasmic ones (Eng et al. 1971; Bignami et al. 1972; Antanitus et al. 1974; Bock et al. 1975, 1977; Ludwin et al. 1976). 2) glutamine synthetase, typical astrocytic enzyme (Martinez-Hernandez et al. 1977; Riepe, Norenberg 1977; Norenberg; Martinez-Hernandez 1979) and 3) a chemically non-identified specific neuroglial antigen, common for both oligodendrocytes and astrocytes (Weinrauder, Lach 1975, 1977; Weinrauder, Kraśnicka 1980). They were present in all types of astrocytes appearing in the experimental cultures, both in those revealing features of progressive and regressive changes as well as in Opalski cells and naked nuclei. Particular types of cells revealed essential differences in the immunohistochemical reaction, implicating a variable content of antigens. These differences expressed as an increase or reduction of the reaction intensity, seemed to be dependent on the biological state of cells, related with either their activation or damage of varying degree. The most intensive immunofluorescent reaction was observed in hypertrophied astrocytes and in Opalski cells, it was less pronounced, although greatly variable, in degenerating astrocytes with fragmented processes and in the cells deprived of processes, and the weakest in naked nuclei. Scarcity of immunofluorescent reactions in cells resembling Alzheimer cells, type II seems understandable in the light of electron microscope observations on their ultrastructure (Norenberg et al. 1974; Norenberg, Lapham 1974; Ostenda et al. 1976; Norenberg 1977) indicating almost total disintegration of their cytoplasmic structures.

However, evaluation of differences in the intensity of the immunofluorescence reaction, especially in tissue culture conditions, requires great circumspection in view of its tremendous variability and heterogeneity in *in situ* conditions, in the case of all antisera applied (Bignami, Dahl 1974; Weinrauder, Lach 1975; Norenberg, Martinez-Hernandez 1979). On the other hand, it is well known that astrocytes *in vitro*, highly variable in their morphology, differ considerably in their structural and me-

cesses showing strong IF reaction. Very intense homogeneous fluorescence in the cytoplasm of Opalski cell (right lower corner). $\times 400$

Ryc. 16. Surowica anti-GS, hodowla 14-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Luźno leżące i zgrupowane astrocyty pozbawione wypustek wykazują żywy odczyn IF. Znacznie intensywniejsza homogenna fluorescencja w cytoplazmie komórki Opalskiego (prawy dolny róg).

Pow. 400 \times

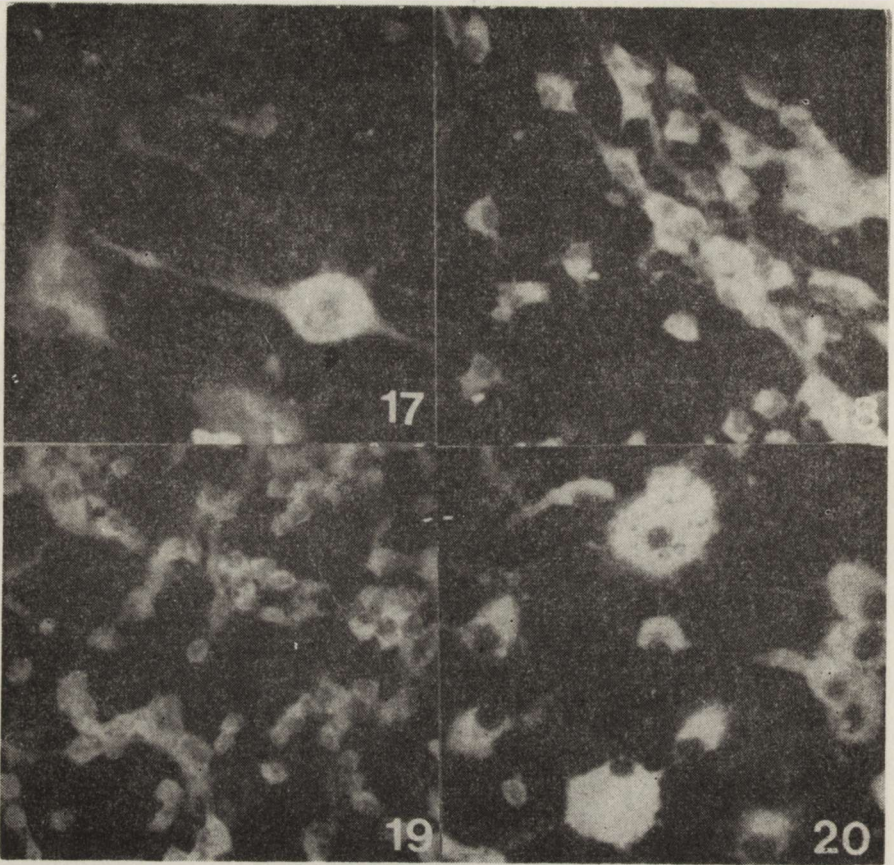


Fig. 17. Anti-GS serum, 6-day-old culture with exogenous copper (48 h). Intermediate forms between hypertrophied astrocytes and formed Opalski cells with strong IF reaction both in perikaryal cytoplasm and in residual processes. $\times 600$

Ryc. 17. Surowica anty-GS, hodowla 6-dniowa z egzogenną miedzią (48 godz.). Przejściowe formy komórkowe między hipertroficznymi astrocytami i uformowanymi komórkami Opalskiego z żywym homogennym odczynem IF w cytoplazmie okołojądrowej i w wypustkach. Pow. $600 \times$

Fig. 18. Anti-gliar serum, 8-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (6 days). Strong fluorescent reaction in most astrocytes, great part of which shows fragmented processes. $\times 250$

Ryc. 18. Surowica antyglejowa, hodowla 8-dniowa z surowicą chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (6 dni). Silny odczyn fluorescencyjny w astrocytach, z których znaczna część wykazuje fragmentację wypustek. Pow. $250 \times$

Fig. 19. Anti-gliar serum, 15-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (3 days). Intense IF reaction in unchanged oligodendroglial population (compare with Fig. 18). $\times 250$

Ryc. 19. Surowica antyglejowa, hodowla 15-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Żywa reakcja IF w populacji niezmiennego gleju skąpowypustkowego (porównaj z ryc. 18). Pow. $250 \times$

Fig. 20. Anti-gliar serum, 14-day-old culture with serum from patient with hepatic coma (3 days). Intense immunofluorescent reaction in the cytoplasm and processes of Opalski cells (upper one with vacuolar degeneration) and in mostly processless astrocytes. $\times 380$

Ryc. 20. Surowica antyglejowa, hodowla 14-dniowa z surowicą od chorego ze śpiączką wątrobową (3 dni). Żywa reakcja IF w cytoplazmie i resztkowych wypustkach komórek Opalskiego (górna ze zwyrodnieniem wodniczkowym) oraz w bezwypustkowych astrocytach. Pow. $380 \times$

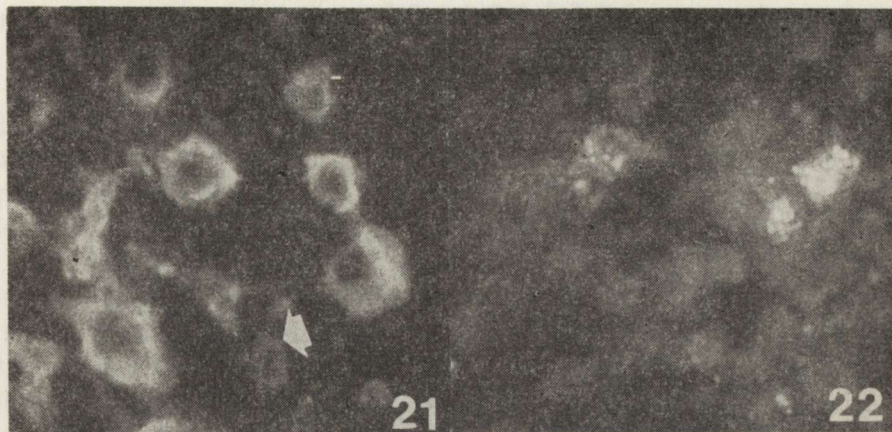


Fig. 21. Anti-gial serum, 12-day-old culture with exogenous copper (24 h). Moderate IF reaction in processless astrocytes and in forming Opalski cell, very weak in the cytoplasmic rim surrounding naked nucleus (arrow). $\times 400$

Ryc. 21. Surowica antyglejowa, hodowla 12-dniowa z egzogenną miedzią (24 godz.). Umiarkowany odczyn IF w astrocytach pozbawionych wypustek i formującej się komórce Opalskiego i bardzo słaby w rąbku cytoplazmatycznym wokół nagiego jądra (strzałka). Pow. $400 \times$

Fig. 22. Control reaction with PBS, 15-day-old culture with serum from patient with Wilson's disease (3 days). IF reaction negative. Unspecific granular fluorescence in the cytoplasm of some degenerating astrocytes due to lipid accumulation. $\times 400$

Ryc. 22. Odczyn kontrolny, z użyciem PBS, hodowla 15-dniowa z surowicą od chorego ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym (3 dni). Brak reakcji immunofluorescencyjnej. Ziarniste świecenie w cytoplazmie pojedynczych komórek ma charakter nieswoisty. Pow. $400 \times$

tabolic properties, as shown in histochemical studies, from their counterparts *in situ* (Kraśnicka, Mossakowski 1965, Mossakowski et al. 1966; Kraśnicka, Borowicz 1971). Cultured astrocytes resemble more reactive astroglia than the resting forms *in situ*. Bock et al. (1975, 1980) documented that the GFAP content in astrocytes in organotypic culture is significantly higher than in normal brain astrocytes. The maturation stage of astrocytes has also to be taken into consideration. In our studies newborn rat cerebellar cultures were used. Rat cerebellum at this stage contains a little differentiated glial population, which differentiates and matures under *in vitro* conditions (Renkawek 1972). This may in an obvious way influence the content of different chemical components of the cell and, therefore, change its immunomorphological picture. Bignami and Dahl (1973) showed that the appearance of GFAP in the ontogeny of astrocytes is connected with an outburst of gliofilaments proliferation in their cytoplasm.

The greatest differences in the intensity of the immunofluorescence reaction were observed in the case of anti-GFAP sera. However, its strong dependence on the degree of structural damage to the cellular population is here a very striking feature. It found also expression in the dependence on the pathogenic factors used. As a rule, the immunochemical

reaction is stronger in cultures grown with sera from patients with Wilson's disease and hepatic coma, in which structural impairment of astrocytes was less advanced, with prevailing features of astrocytic hypertrophy and formation of Alzheimer, type II and Opalski cells. A markedly lower intensity of IF was observed in cultures with exogenous copper and ammonia. These were dominated by non-specific astrocytic degeneration, with much less expressed cellular hypertrophy and appearance of Opalski cells and naked nuclei.

A typical picture of the immunohistochemical reaction with GFAP is characterized by bright fluorescence of fibrillary cytoplasmic structures and astrocytic processes (Bigñami et al. 1972). In our experimental material such a type of reaction was only observed in either normal fibrillary astrocytes or in hypertrophied cells. In most of the injured cells, in naked nuclei and in Opalski cells the reaction was homogeneous or granular. This may implicate either the predominance of protoplasmic astrocytes or a possible change of the physico-chemical nature of the antigen substance under the influence of the applied pathogenic factor. Cerebellar culture *in vitro* contains mixed population of fibrillary and protoplasmic astrocytes (Kraśnicka, Borowicz 1971). This would favour the possibility of different cellular reactions. However, the question may arise as to what factors are responsible for the mostly progressive response of fibrillary astrocytes and the predominantly degenerative one of protoplasmic astroglia. The observations of Norenberg et al. (1972), indicating different reactions of astrocytes in various grey matter structures and less involvement of the white matter astroglia in experimental hepatic encephalopathy, may serve as a background for such an assumption. So is the homogeneous reaction in Opalski cells. Opalski (1930) thought that they represent an abnormality of protoplasmic astrocytes. Although this opinion did not find confirmation in further studies (Mossakowski 1966) nevertheless electron microscope observations concerning their structure revealed a striking paucity of gliofilaments in their cytoplasm (Mossakowski et al. 1971). On the other hand, it has to be kept in mind that the nature of the immunohistochemical reaction can be dependent on numerous additional factors such as intensity of fluorescence, blurring its connection with the cytoplasmic fibrillary structures (see processes of fibrous astrocytes), intracellular arrangement and distribution of gliofilaments, their density, degree of cell maturity and differentiation, and probably many others.

The strong immunohistochemical reaction with anti-GS serum indicates a high content of enzyme both in hypertrophied and degenerating astrocytes as well as in Opalski cells. Its reduced content in Alzheimer cells type II can be explained similarly as in the case of GFAP by severe destruction of their cytoplasmic structures. Glutamine synthetase known as a typical astrocytic enzyme (Norenberg 1979; Norenberg, Martinez-Hernandez 1979) seems to be a fundamental factor in ammonia

detoxication in the central nervous system. Although significant increase of glutamine synthetase is not a common feature in various types of hepatogenic encephalopathy (Hilgier 1983), its slightly enhanced content was found in immunohistochemical studies in a limited group of astrocytes (Norenberg 1981). Ammonia is considered to be one of the most probable candidates as the main pathogenetic factor in hepatogenic encephalopathy, the pathological picture of which is dominated by astroglial pathology (Hinfelt 1975; Mossakowski 1978, Norenberg 1981). High glutamine synthetase content in all abnormal astrocytes found in our present studies indicates that they can take part in ammonia detoxication process. This concerns even so severely changed cells as the naked nuclei and Opalski cells.

The high content of the specific neuroglial antigen, common for both oligodendrocytes and astrocytes indicates also the preservation of biological properties in damaged and changed astrocytes. The immunohistochemical reaction, stronger in astrocytes than in oligodendroglia, in contrast to cerebellar cultures grown in standard conditions (Weinrauder, Kraśnicka 1980) may suggest even an increased intracellular production of antigen under pathological conditions.

Our studies make possible the characterization of the histogenesis of Opalski cells. As mentioned above, Opalski (1930) considered them as a specific abnormality of protoplasmic astrocytes. Their astrocytic origin, although not necessarily from protoplasmic astroglia, is also supported by their impregnation abilities and histochemical properties (Mossakowski 1965). However, Kryspin-Exner (1931) believed them to be of microglial origin and Greenfield (1963) considered them as a special form of phagocytes. For Victor et al. (1965) they are degenerating nerve cells. We strongly believe that the content of typical astroglial antigens in their cytoplasm, settles the question of their astrocytic origin.

Acknowledgment: The authors are deeply indebted to Dr. Elizabeth Bock from the Protein Laboratory, University of Copenhagen for granting anti-GFAP serum and to Dr. Krystyna Renkawek from the Tissue Culture Laboratory of Medical Research Centre, PASci for providing the tissue cultures. Technical assistance of Mrs. Irena Dybkowska-Anc and Mr. Ryszard Szopiński is greatly appreciated.

IMMUNOMORFOLOGIA GLIOPATII WĄTROBOWEJ IN VITRO

Streszczenie

Przeprowadzono badania immunomorfologiczne z użyciem surowic odpornościowych przeciwko GFAP, syntetazie glutaminy (SG) i swoistemu antygenowi glicywowemu wspólnemu dla astrocytów i oligodendrocytów, na hodowlach organotypowych mózdzku noworodków szczurzych, w których doświadczalnie wywoływano zmiany komórkowe typowe dla encefalopatii wątrobowej i choroby Wilsona.

Hodowle prowadzono z surowicami od chorych, ze zwyrodnieniem wątrobowo-soczewkowym lub śpiączką wątrobową oraz z dodatkiem egzogenego octanu miedzi, lub chlorku amonu.

Odczyny immunohistochemiczne wykazały obecność GFAP, SG i swoistego antygenu glejowego we wszystkich typach nieprawidłowych astrocytów stanowiących wykładniki gliopatii wątrobowej. Intensywność odczynu immunofluorescencyjnego wykazywała zależność od stopnia strukturalnego uszkodzenia komórek. Była ona najwyższa w przerosłych astrocytach i w komórkach Opalskiego, niższa w wyrodnijających komórkach gwiaździstych, a najniższa w komórkach Alzheimerera, typu II. Uzyskane wyniki wskazują, że nawet najbardziej zmienione lub uszkodzone komórki glejowe zachowywały typowe właściwości astrocytów. Wydaje się to szczególnie ważne w przypadku syntetazy glutaminy, gdyż jej obecność w uszkodzonych komórkach glejowych wskazuje na możliwość ich udziału w procesie detoksykacji amoniaku, stanowiącego jak się wydaje podstawowe ogniwo w patogenezie encefalopatii wątrobowej. Obecność swoistych antygenowych znaczników astroglejowych w komórkach Opalskiego może przesądzać o ich astrocytarnym pochodzeniu.

ИММУНОМОРФОЛОГИЯ ПЕЧЕНОЧНОЙ ГЛИОПАТИИ

Резюме

Проведено иммуноморфологические исследования с применением иммунных сывороток против кислого глиозного фибриллярного белка (GFAP), синтетазы глутамина (SG) и специфического глиального антигена общего для астроцитов и олигодендроцитов в органотипичных культурах мозжечка крысиных новорожденных, в которых экспериментально вызывано клеточные изменения типичные для печеночной энцефалопатии и болезни Вильсона.

Культуры были ведены с сыворотками от больных с гепато-лентикулярной дегенерацией или с печеночной комой и с добавкой экзогенного ацетата меди или хлористого аммония.

Иммуногистохимические реакции обнаружили наличие GFAP, SG и специфического глиального антигена во всех типах ненормальных астроцитов составляющих показатели печеночной глиопатии. Интенсивность иммунофлуоресцентной реакции показывала зависимость от степени повреждения структуральных клеток. Она была самой высокой в гипертрофических астроцитах и в клетках Опальского, низшей в вырождающихся астроцитах, а самой низкой в клетках Альцгеймера II типа. Полученные результаты указывают на то, что даже наиболее измененные или поврежденные глиальные клетки сохраняли типичные свойства астроцитов. Это кажется особенно важным в случае синтетазы глутамина, потому что его наличие в поврежденных глиальных клетках указывает на возможность их участия в процессе детоксикации аммиака, составляющей, как кажется, основное звено в патогенезе печеночной энцефалопатии. Наличие специфических антигенных астроглиальных показателей в клетках Опальского может предопределять их астроцитарное происхождение

REFERENCES

1. Antanitus D. S., Choi B. H., Lapham L. W.: Immunofluorescence staining of astrocytes *in vitro* using antiserum to glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.*, 1975, 89, 363—367.
2. Bignami A., Dahl D.: Differentiation of astrocytes in the newborn rats. An immunofluorescence study with antibodies to a protein specific to astrocytes. *Brain Res.*, 1973, 49, 393—402.

3. Bignami A., Dahl D.: Heterogenicity of glial fibrillary acidic protein in gliosed human brains. *J. Neurol. Sci.*, 1974, 23, 551—563.
4. Bignami A., Eng L. F., Dahl D., Uyeda C. T.: Localization of glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, 1972, 43, 429—435.
5. Bock E., Jørgensen O. S., Dittmann L., Eng L. F.: Determination of brain specific antigens in short term cultivated rat astroglial cells and in rat synaptosomes. *J. Neurochem.*, 1975, 25, 867—870.
6. Bock E., Møller M., Nessen C., Sensenbrenner M.: Glial fibrillary acidic protein in primary astroglial cell cultures derived from newborn rat brain. *FEBS Lett.*, 1977, 83, 207—211.
7. Bock E., Yavin Z., Jørgensen O. S., Yavin E.: Nervous system-specific proteins in developing rat cerebral cells in culture. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 1297—1302.
8. Eng L. F., Vanderhaegen J. S., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351—354.
9. Greenfield J. G.: *Neuropathology*. Second ed. Arnold. London, pp. 179—180.
10. Hilgier W.: Brain ammonia metabolism in experimental hepatogenic encephalopathy (Polish text). Doctor's thesis. Medical Research Center PASci, Warszawa, 1983.
11. Hinfelt B.: A mechanism in hyperammonemic coma with particular reference to hepatic encephalopathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 252, 116—123.
12. Kraśnicka Z., Albrecht J., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 495—510.
13. Kraśnicka Z., Borowicz J.: Ultrastructure of glial cells cultured *in vitro*. *Acta Med. Pol.*, 1971, 12, 199—202.
14. Kraśnicka Z., Mossakowski M. J.: Zagadnienie zmienności morfologicznej tkanki glejowej hodowanej *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1965, 3, 397—408.
15. Kryspin-Exner W.: Anatomische Befunde bei einem Fall von Westphal-Strumpelschen Pseudosklerose. *J. Psychiat.*, 1931, 47, 251—275.
16. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S100 and GFA proteins in the adult rat brain: an immunohistochemical study using horseradish peroxidase labelled antibodies. *J. comp. Neurol.*, 1976, 165, 179—208.
17. Martinez-Hernandez A., Bell K. P., Norenberg M. D.: Glutamine synthetase: glial localization in the brain. *Science*, 1977, 195, 1356—1358.
18. Mossakowski M. J.: Some remarks on the morphology and histochemistry of the so-called Opalski cells. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1965, 3, 659—668.
19. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 231—304.
20. Mossakowski M. J.: Experimental studies on the pathogenesis of hepatogenic encephalopathy. *Proc. Polish-Italian Neurological Symposium. Varenna, June 18—21, 1978. Riv. Patol. Nerv. Ment.*, 1978, 37, 25—36.
21. Mossakowski M. J., Borowicz J., Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Ultrastructure of Opalski cells. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1971, 19, 301—306.
22. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Kassur B., Olejnik Z.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego w ostrych uszkodzeniach wątroby. *Neuropat. Pol.*, 1974, 12, 51—62.
23. Mossakowski M. J., Kraśnicka Z., Renkawek K.: The activity of oxidative enzymes in neuroglia cultured *in vitro*. *Pol. Med. J.*, 1966, 3, 1385—1401.
24. Mossakowski M. J., Renkawek K., Kraśnicka Z., Śmiałek M., Pronaszko A.: Morphology and histochemistry of Wilsonian and hepatogenic gliopathy in tissue culture. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1970, 16, 1—16.

25. Norenberg M. D.: A light and electron microscopic study of experimental portal-systemic (ammonia) encephalopathy. *Lab. Invest.*, 1977, 36, 618—627.
26. Norenberg M. D.: The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, 27, 756—762.
27. Norenberg M. D.: The astrocyte in liver disease. In: *Advances in Cellular Neurobiology*. Eds.: S. Fedoroff, L. Hertz. vol. 2. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. 1981, pp. 303—352.
28. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscope study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 422—435.
29. Norenberg M. D., Lapham L. W., Eastland M. W., May A. G.: Diffusion of protoplasmatic astrocytes in acute experimental hepatic encephalopathy. *Am. J. Path.*, 1972, 67, 403—411.
30. Norenberg M. D., Lapham L. W., Nichols F. A., May A. G.: An experimental model for the study of hepatic encephalopathy. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 106—109.
31. Norenberg M. D., Martinez-Hernandez A.: Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res.*, 1979, 161, 303—310.
32. Opalski A.: Über eine besondere Art von gliazellen bei der Wilson-Pseudosklerose-Gruppe. *Z. ges. Neurol. Psychiat.*, 1930, 124, 420—425.
33. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—354.
34. Riepe R. E., Norenberg M. D.: Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature (Lond.)*, 1977, 268, 654—655.
35. Renkawek K.: On the histochemical and enzyme-histochemical differences between various types of glial cells cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1972, 10, 307—315.
36. Renkawek K., Kraśnicka Z., Majdecki T., Mossakowski M. J.: Glial changes *in vitro* induced by the inhibitor of succinic dehydrogenase. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1973, 26, 107—114.
37. Seitelberger F.: General neuropathology of central neuroglia: the concept of glial syndromes. *Proc. VI Intern. Congress Neuropath. Masson, Paris 1970*, 392—403.
38. Victor M., Adams R. D., Cole M.: The acquired (non-Wilson) type of chronic hepatocerebral degeneration. *Medicine*, 1965, 44, 345—396.
39. Weinrauder H., Kraśnicka Z.: Antygeny glejowe w hodowli tkankowej mózgdzku szczura. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 181—190.
40. Weinrauder H., Lach B.: Immunofluorescence studies on the localization of the brain specific antigen(s) in the central nervous system of the rat. *Proc. VII Intern. Congress Neuropath. Ed.: S. Kornyei, G. Gostony. Exc. Med., Akademiai Kiado. Amsterdam, Budapest 1975*, pp. 115—118.
41. Weinrauder H., Lach B.: Localization of organospecific antigens in the nervous system of rat. *Acta neuropath. (Berl.)* 1977, 39, 109—114.

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

WOJCIECH HILGIER, JAN ALBRECHT

POZIOM AMONIAKU ORAZ JEGO METABOLITÓW W MÓZGU
W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ
PODCZAS PRZEDŁUŻONEGO DZIAŁANIA TIOACETAMIDU
I W OKRESIE POWROTU DO NORMY

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

W naszym Zespole opracowano nowy model toksycznej encefalopatii wątrobowej wywołanej kilkakrotnym podawaniem tioacetamidu. Cechą tego modelu jest szybkie pojawianie się zmian biochemicznych, typowych dla wczesnych stadiów encefalopatii wątrobowej. Zmiany te zachodzą już po dwukrotnym podaniu tioacetamidu w odstępach 24-godzinnych i cechuje je duża powtarzalność (Hilgier 1983). Uprzednio stwierdzono, że w modelu tym mamy do czynienia z bardzo wydolnym cyklem detoksykacji amoniaku w mózgu, czego wykładnikiem był brak zmian w jego zawartości w ośrodkowym układzie nerwowym, przy wyraźnym wzroście we krwi. Ponadto w mózgu nie stwierdzono zmian poziomu α -ketoglutaranu, przy wyraźnym wzroście poziomu glutaminy. Typowo zachowywały się również enzymy związane z cyklem detoksykacji amoniaku (Hilgier 1983; Hilgier i wsp. 1983). Brakowało jednak w tym modelu elementu bardziej pogłębionej encefalopatii wątrobowej, o charakterze ostrym, w którym zwierzęta byłyby doprowadzone do stanu śpiączki. Nie oceniono również parametrów biochemicznych w późnych okresach po podaniu tioacetamidu.

W badanym dotychczas okresie 7 dni od zaprzestania zatruwania tioacetamidem utrzymywał się jeszcze podwyższony poziom amoniaku we krwi (Hilgier i wsp. 1983). W doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy stan śpiączki uzyskiwano po 3-krotnym podaniu tioacetamidu w odstępach 24-godzinnych, a stan powrotu do normy oceniano po 14 dniach od zaprzestania zatruwania zwierząt.

MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono na samicach albinotycznych szczurów rasy Wistar, o masie ciała 180—220 g. Uszkodzenie wątroby wywoływano przez dootrzewnowe wstrzykiwanie tioacetamidu w fizjologicznym roz-

tworze soli (NaCl) w dawce 250mg/kg masy ciała. Zwierzęta kontrolne otrzymywały w tych samych warunkach i objętościach dootrzewnowe wstrzyknięcia roztworu fizjologicznego soli.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację (bez użycia narkozy) w następujących przedziałach czasowych: grupa I: 3-krotne wstrzyknięcie w odstępie 24 godzin i dekapitacja po 24 godzinach; grupa II: 2-krotne wstrzyknięcie w odstępie 24 godzin i dekapitacja po 14 dniach.

Do badań biochemicznych natychmiast po dekapitacji pobierano obie półkule mózgowe bez pnia i mózdzku oraz krew. Poziom amoniaku w surowicy po odwirowaniu krwi przy 3000 x g oznaczano przy użyciu standardowych testów (Blood Ammonia Test, firmy Hyland). Poziom amoniaku w mózgu oznaczano przy zastosowaniu odczynnika Nesslera. Materiał do oznaczeń przygotowywano według metody opisanej przez Sadasivudu i wsp. (1977). Poziom α -ketoglutaranu oznaczano metodą spektrofotometryczną według Bergmeyera i Bernta (1963) przy użyciu dehydrogenazy glutaminowej. Poziom glutaminy oznaczano według swojej spektrofotometrycznej metody Kupchika i Knoxa (1971).

Znamiennosć statystyczną otrzymanych wyników oceniano przy użyciu testu „t”-Studenta.

WYNIKI

Poziom amoniaku w surowicy krwi oraz zawartość amoniaku, α -ketoglutaranu i glutaminy w mózгах zwierząt kontrolnych i badanych przedstawiono w tabeli 1.

Poziom amoniaku w surowicy krwi w I grupie doświadczalnej wzrósł wyraźnie (około 123%) w stosunku do kontroli. W grupie II natomiast zawartość amoniaku nie odbiegała od poziomu kontrolnego.

Poziom amoniaku w mózgu w I grupie doświadczalnej wzrósł około 27%, natomiast w grupie II był niższy około 20% od wartości kontrolnych.

Poziom α -ketoglutaranu w grupie I był obniżony około 38%, natomiast w grupie II był podwyższony w stosunku do wartości kontrolnych około 38%.

Poziom glutaminy w obu grupach doświadczalnych był podwyższony około 171% w grupie I i około 75% w grupie II.

OMÓWIENIE

Jak wynika z porównania danych w tabeli 1, wysokiemu poziomowi amoniaku we krwi, stwierdzonemu po trzykrotnym zatruciu zwierząt, towarzyszył wzrost jego poziomu w mózgu, przy jednoczesnym znaczącym obniżeniu się zawartości α -ketoglutaranu. W naszych poprzednich badaniach przeprowadzonych na modelu z jedno- i dwukrotnym podawa-

Tabela 1. Zawartość amoniaku w surowicy krwi oraz poziom amoniaku, α -ketoglutaranu i glutaminy w mózgu szczura w następstwie zatrucia tioacetamidem

Table 1. The ammonia content in blood serum and ammonia, α -ketoglutarate and glutamine level in rat brain following thioacetamide intoxication

Parametr badany Parameter	Grupa doświadczalna I		Experimental group II	
	kontrola control	tioacetamid thioacetamide	kontrola control	tioacetamid thioacetamide
amoniak w surowicy mikromole/l serum ammonia μ moles/l	64,0 \pm 8,0 (6)*	143,0 \pm 11,0 (5) ^a +123%	63,0 \pm 5,0 (6)	69,0 \pm 12,0 (5) ^b
amoniak w mózgu mikromole/kg tkanki brain ammonia μ moles/kg tissue	0,22 \pm 0,01 (6)	0,28 \pm 0,03 (7) ^a +27%	0,20 \pm 0,01 (5)	0,16 \pm 0,01 (5) ^a -20%
α -ketoglutaran mikromole/kg tkanki α -ketoglutarate μ moles/kg tissue	77,5 \pm 6,9 (5)	47,9 \pm 9,5 (8) ^a -38%	85,9 \pm 11,0 (6)	118,7 \pm 14,9 (7) ^a +38%
glutamina mikromole/kg tkanki glutamine μ moles/kg tissue	5,09 \pm 0,26 (6)	13,69 \pm 0,69 (7) ^a +171%	5,13 \pm 0,36 (5)	8,97 \pm 0,54 (5) ^a +75%

* — wartości średnie \pm odchylenie standardowe. W nawiasach liczba zwierząt
mean \pm SD with number of animals in parentheses

^a — różnica statystycznie znamienne (p < 0,01)
difference statistically significant at p < 0,01

^b — różnica statystycznie nieznamienne
difference statistically insignificant

niem tioacetamidu (Hilgier 1983; Hilgier i wsp. 1983) również występował wzrost zawartości amoniaku we krwi, nie towarzyszyły mu jednak zmiany w zawartości amoniaku oraz α -ketoglutaranu w mózgu. Można więc przypuszczać, że w następstwie 3-krotnego podania tioacetamidu następuje częściowe załamanie się układu detoksykacyjnego amoniaku w mózgu, i że jest ono związane z obniżoną dostępnością α -ketoglutaranu jako pierwszego ogniwa cyklu detoksykacji na szlaku do glutaminy, która utrzymuje się na podwyższonym poziomie. Wynik ten stanowi potwierdzenie hipotezy Bessmana i Bessman (1955), wiążącej patomechanizm śpiączki hiperamonemicznej z obniżonym metabolizmem energetycznym w mózgu, wynikającym ze spadku poziomu substratów cyklu Krebsa. Warto też nadmienić, że wstępna ocena czynności bioelektrycznej mózgu (EEG), po 3-krotnym zatruciu tioacetamidem, daje zapis charakterystyczny dla stanów śpiączkowych (tak zwany stan 3 i 4 wg Opolona i wsp.

1976), czego nie stwierdzono po dwukrotnym podaniu tego związku (Pluta i wsp. — dane niepublikowane).

Wydaje się, że różnice w dostępności α -ketoglutaranu dla cyklu detoksykacji amoniaku w mózgu w obu grupach mogą w pewnym stopniu wynikać z różnic w aktywności anhidrazy węglowej. Nowsze koncepcje na temat roli tego enzymu w mózgu zakładają jego udział w metabolizmie amoniaku (Norenberg 1981; Albrecht, Hilgier 1983). Anhidraza węglowa warunkowałaby wiązanie CO_2 do pirogronianu z wytworzeniem szczawiooctanu, a ten z kolei wzbogacałby cykl kwasów trójkarboksylowych, co w konsekwencji mogłoby powodować zwiększoną syntezę α -ketoglutaranu. Wykazany w poprzedniej pracy wzrost aktywności anhidrazy węglowej po 2-krotnym podaniu tioacetamidu, przy braku wzrostu po podaniu 3-krotnym, jest zgodny z tą hipotezą (Albrecht, Hilgier 1983).

Po 14 dniach, po dwukrotnym podaniu tioacetamidu stwierdzono, że zawartość amoniaku we krwi powraca do normy, czego po 7 dniach po zaprzestaniu doświadczenia nie obserwowano (Hilgier i wsp. 1983). Z kolei stwierdzony w tym okresie zarówno obniżony poziom amoniaku, jak i podwyższony poziom α -ketoglutaranu w mózgu, wskazuje na wystąpienie kompensacyjnego wzrostu aktywności układu detoksykacji amoniaku w ośrodkowym układzie nerwowym. Powyższy mechanizm kompensacyjny raczej nie jest związany z aktywnością anhidrazy węglowej, która w tym okresie nie wykazuje odchyień od wartości kontrolnych (Albrecht, Hilgier 1983). Warto dodać, że zjawiska obniżenia poziomu amoniaku w mózgu nie obserwowano dotychczas w żadnym z opisanych modeli doświadczalnej encefalopatii wątrobowej (Norenberg 1981). Wydaje się więc, że niniejszy model jest modelem z wyboru dla badania mechanizmów kompensacyjnych w późnej fazie powrotu do normy. Przewodzone obecnie badania nad aktywnością enzymów cyklu detoksykacji amoniaku w mózgu oraz nad zjawiskami kompensacyjnymi w astrogleju pozwolą, być może, na wyjaśnienie istoty tego mechanizmu.

**УРОВЕНЬ АММИАКА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ
ВО ВРЕМЯ ПРОДЛЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ТИОАЦЕТАМИДА
И В ПЕРИОДЕ ПОЛНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ**

Резюме

В исследованиях представленных в настоящей работе авторы определили содержание аммиака в крови, а также аммиака, α -кетоглутарата и глутамина в головном мозгу крысы в экспериментальной печеночной энцефалопатии вызванной тиоацетамидом (ТАА). Проверено два варианта модели: трехкратное введение ТАА в дозе 250 мг/кг веса тела в 24-часовых промежутках, с декапитацией по истечении 24 часов после последнего введения (продленная модель) и двукратное введение соединения с декапитацией по истечении 14 дней от последнего введения (период полного восстановления).

В продленной модели констатировано значительный рост содержания аммиака в крови, которому сопутствовал небольшой но значимый рост уровня аммиака и спад содержания α -кетоглутарата в мозгу, свидетельствующий о частичном преломлении системы детоксикации аммиака. В то же время констатировано очень высокий уровень глутамина, что и есть явлением типичным для разных стадий печеночной энцефалопатии. В периоде полного восстановления уровень аммиака в крови не отличался от контрольных значений, зато в головном мозгу наблюдался спад уровня аммиака с одновременным ростом α -кетоглутарата и удерживающимся повышенным уровнем глутамина, что указывает на компенсационную активацию системы детоксикации аммиака.

THE LEVEL OF AMMONIA AND ITS METABOLITES IN EXPERIMENTAL HEPATOGENIC ENCEPHALOPATHY INDUCED BY PROLONGED ADMINISTRATION OF THIOACETAMIDE AND DURING RECOVERY

Summary

In this work the blood ammonia level and the brain ammonia, α -ketoglutarate and glutamine content were measured in rats subjected to hepatic encephalopathy in the thioacetamide (TAA) model. Two variants of the model were employed: a) three TAA administrations in a 250 mg/kg body weight dose, with decapitation 24 h after last administration (so-called "prolonged model") and b) two TAA administrations and examination 14 days thereafter (recovery period). In the prolonged model a marked increase of blood ammonia was observed, accompanied by a notable rise of the brain ammonia and a concomitant decrease of α -ketoglutarate content which was indicative of a partially decreased ability of the brain to detoxify ammonia. In the same period a very high brain glutamine level was observed which is typical of various stages of hepatic encephalopathy. In the period of recovery the blood ammonia content remained unchanged; however, in the brain, a decrease of ammonia content was observed with a simultaneous increase of the α -ketoglutarate content, and still sustaining increased glutamine level, which suggests that at this stage a compensatory activation of the ammonia detoxification system has taken place.

PIŚMIENICTWO

1. Albrecht J., Hilgier W.: Brain carbonic anhydrase activity in rats in experimental hepatogenic encephalopathy. *Neurosci. Lett.*, (w druku).
2. Bergmeyer H. V., Bernt E.: α -Oxoglutarate. W: *Methods of enzymatic analysis*. Red. H. V. Bergmeyer, Acad. Press, New York, London 1963, 324—327.
3. Bessman S. P., Bessman A. N.: Cerebral and peripheral uptake of ammonia in liver disease with hypothesis for mechanisms of hepatic coma. *J. Clin. Inv.*, 1955, 36, 622—628.
4. Hilgier W.: Encefalopatia wątrobowa u szczura wywołana podawaniem tioacetamidu. III. Zawartość amoniaku i substratów jego metabolizmu w mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 511—518.
5. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
6. Kupchik H. Z., Knox W.: Assay of glutamine and its aminotransferase with the enolborate of phenylpyruvate. *Arch. Biochem Biophys.*, 1970, 136, 178—186.

7. Norenberg M. D.: The astrocyte in liver disease. W: *Advances in Cellular Neurobiology*. Red. S. Fedoroff, L. Hertz. Acad. Press, New York 1981, 2, 303—352.
8. Opolon P., Lovallard M. C., Huget U., Granger A., Gollot D., Bloch P.: Hemodialysis versus cross hemodialysis in experimental hepatic coma. *Surg. Gyn. Obst.*, 1976, 142, 845—854.
9. Sadasivudu B., Indira Rao T., Radhakrishna Murthy C.: Acute metabolic effects of ammonia in mouse brain. *Neurochem. Res.*, 1977, 2, 639—655.

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

MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI,
JERZY W. BOROWICZ, WOJCIECH HILGIER

ELECTRON MICROSCOPY OF HEPATOGENIC ENCEPHALOPATHY IN RATS INDUCED BY THIOACETAMIDE INTOXICATION

Department of Neuropathology and Laboratory of Ultrastructure of the Nervous System, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, Warszawa

Chemical liver impairment by the use of various hepatotoxic substances, alongside with surgically performed portal-systemic shunt, constitutes a most common model for experimental studies on the pathogenesis of hepatic encephalopathy (Diemer 1978; Mossakowski 1981). The hepatotoxic action of most chemical compounds used is accompanied by numerous disadvantageous factors. On one hand they consist in a fulminant action of some of them on the liver, reducing the time necessary for development of the exponents of nervous system involvement, on the other, in the necessity of their prolonged application of many months, leading to the appearance of some additional, even incidental pathogenic factors. The possibility of simultaneous action on both liver and brain parenchyma has also to be taken into consideration, thus limiting the distinction between brain lesions resulting from liver impairment and those due to the direct influence of the toxic substance on the nerve tissue.

In recent years, in the search for the possibly best hepatotoxic substance free of the above mentioned inconveniences, thioacetamide, known for a long time in experimental liver pathology (Gupta et al. 1956; Vorbrodt et al. 1966) has been successfully applied.

Thioacetamide intoxication leads within a short period of time to severe liver damage with typical biochemical exponents of its acute failure and both morphological and biochemical abnormalities characteristic of hepatogenic encephalopathy (Hilgier 1983a; Hilgier et al. 1983). Moreover, comparative studies carried out on nerve tissue cultures, showed that features of hepatogenic gliopathy *in vitro* appeared only in cultures grown in nutrient media containing blood serum of rats with previously thioacetamide-induced liver impairment. In the cultures which were run with an exogenous compound added directly to their nutrient

medium, non-specific degenerative changes were the only feature (Kraśnicka et al. 1983). The hepatotoxic action of thioacetamide given in a single or double dose was found to be short-lasting, as far as biochemical exponents of acute liver failure are concerned. This raised the question of either persistence or reversibility of morphological abnormalities in the brain parenchyma, prompting us to perform a series of electron microscopic studies on the central nervous system of rats intoxicated with thioacetamide at the time when the abnormalities in blood biochemistry indicating liver failure were disappearing.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on albinotic female rats, weighing 180–200 g, which were given in an interval of 24 h two intraperitoneal injections of thioacetamide in a dose of 250 mg/kg body weight. The control animals received intraperitoneal injections of buffered physiological salt solution.

The animals were sacrificed in groups of three (2 — experimental ones and 1 control) by intracardiac perfusion with 2 percent glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.2, on the 14th and 21st days after the second injection. Brains removed from the skull were left in the same fixative for the next 24 h at 4°C. Then they were cut coronally into slices 1 mm thick. For electron microscopy, tissue samples, 1 mm³ in diameter were taken from the frontal cortex, striatum and subcortical white matter. They were postfixed for 1 h in 2 percent osmium tetroxide, dehydrated in graded ethanol solutions, embedded in Epon 812 and then cut on a ultramicrotome. The ultrathin sections were counterstained on grids with uranyl acetate and lead citrate and examined under an electron microscope JEM 7A.

RESULTS

Ultrastructural abnormalities were present in all the examined regions of the brain. They were of the same nature and they did not differ essentially in animals sacrificed 14 and 21 days after intoxication.

The great majority of cortical and striatal nerve cells were normal (Fig. 1). In both structures some "dark neurons" were seen incidentally. They revealed an increased density of the cytoplasm and marked distention of channels and cisternae of the rough endoplasmic reticulum. In the cerebral cortex some nerve cells with features of progressing disintegration were found. This took the form of reduction and/or disappearance of rough endoplasmic reticulum and accumulation of small, irregular aggregates of floccular substances in their cytoplasm (Fig. 2). Neuronal elements such as dendrites, nerve terminals and myelinated and nonmyelinated axons were apparently normal. So were oligodendrocy-

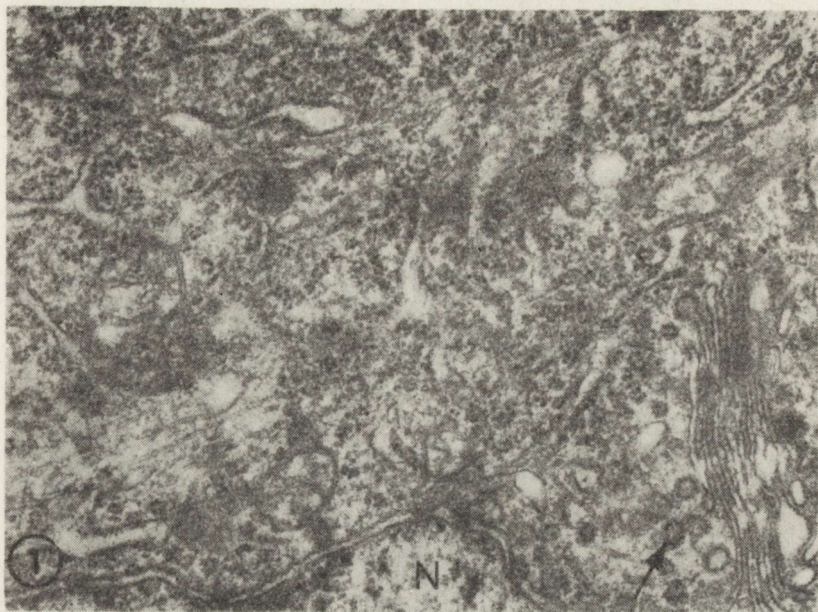


Fig. 1. Animal surviving 14 days after intoxication. Fragment of cortical neuron. In the vicinity of the nucleus (N) channels of rough endoplasmic reticulum, some mitochondria, aggregates of ribosomes, and Golgi apparatus with a few coated vesicles (arrow) are visible. $\times 37\ 500$

Ryc. 1. Zwierzę z 14-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment komórki nerwowej kory. W pobliżu jądra (N) widoczne są kanały siateczki śródplazmatycznej szorstkiej, pojedyncze mitochondria, skupienia rybosomów oraz fragment układu Golgiego z pojedynczymi pęcherzykami opłaszczonymi (strzałka). Pow. $37\ 500 \times$

tes both in the grey and white matter (Fig. 3). Astrocytes on the contrary, revealed pathological changes, varying in intensity. Numerous astrocytes with evident features of degeneration were present in all the examined structures alongside with those, which did not show any ultrastructural abnormality. The light cytoplasm of affected astroglial cells was greatly impoverished in all subcellular organelles (Fig. 4). In extreme situations, enlarged, sharply delineated nuclei with delicate, evenly distributed chromatin were situated against the background of amorphous substances, containing some remnants of severely damaged cytoplasmic organelles, mostly shrunken mitochondria (Figs 5, 6). Astrocytic processes either lying free in the neuropil or surrounding capillaries were changed in a similar manner. Perivascular end feet were severely swollen. Many of them were filled with delicate amorphous masses with some residual, impaired subcellular structures, mostly dark, condensed mitochondria (Figs 7, 8).

This type of changes was present in both experimental groups. It seemed, however, that they were more common and advanced in animals surviving 21 days following thioacetamide intoxication. Alongside with capillaries surrounded by abnormal astrocytic processes, numerous blood vessels with entirely normal tissue surroundings were also present (Fig. 9).

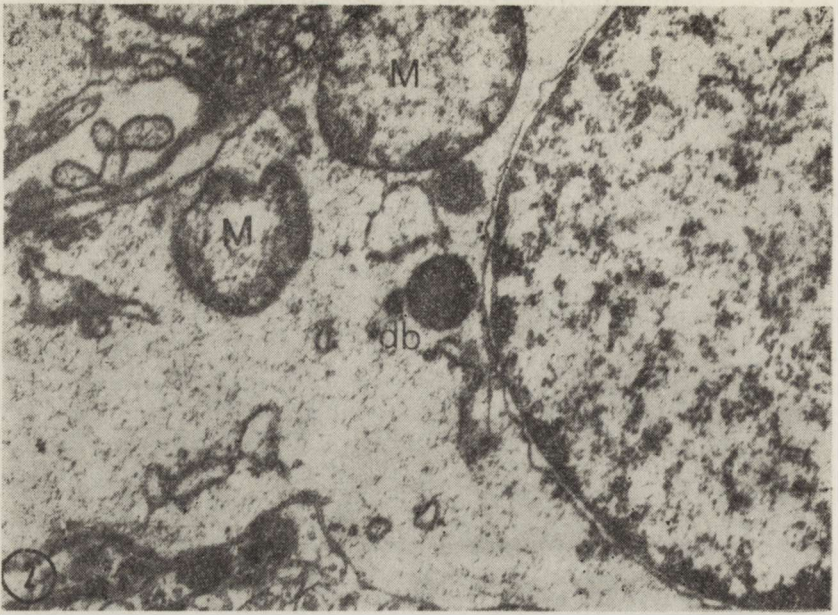


Fig. 2. Animal surviving 21 days after intoxication. Fragment of cortical neuron with almost complete lack of rough endoplasmic reticulum. Among irregular floccular substance aggregates single dense bodies (db) and degenerating mitochondria (M) are visible. $\times 40\ 000$

Ryc. 2. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment komórki nerwowej (stożek aksonalny) kory. Prawie całkowity brak struktur siateczki śródplazmatycznej. Wśród nieregularnej substancji włóknistej pojedyncze ciała gęste (db) i wyrodniałe mitochondria (M). Pow. $40\ 000 \times$

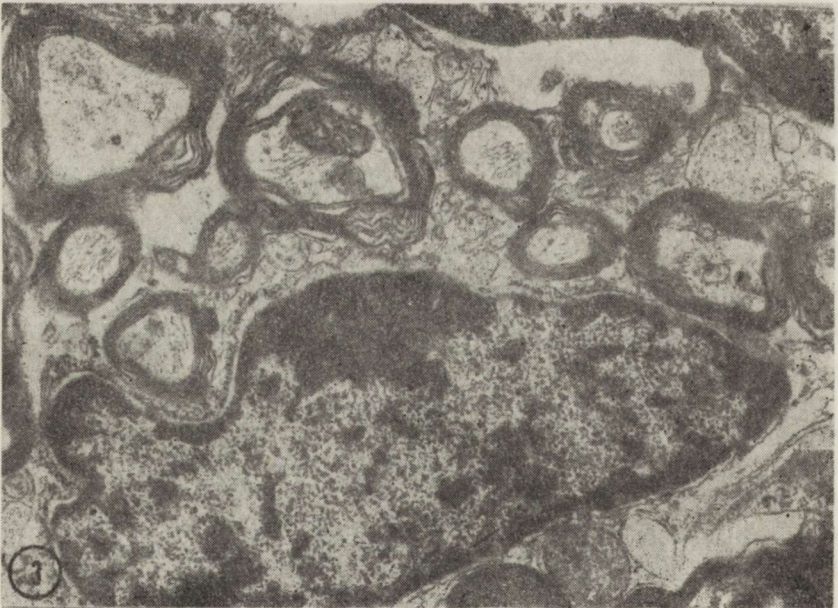


Fig. 3. Animal surviving 21 days after intoxication. Fragment of subcortical white matter with unchanged oligodendrocyte among myelinated nerve fibers. $\times 12\ 500$

Ryc. 3. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Podkorowa istota biała. Wśród licznych zmielinizowanych aksonów widoczna prawidłowa komórka oligodendrogleju. Pow. $12\ 500 \times$

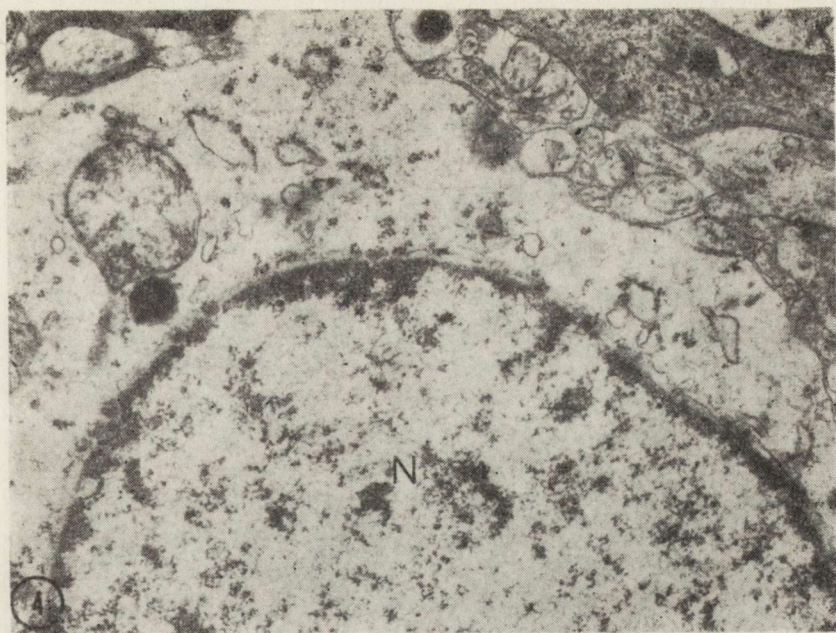


Fig. 4. Animal surviving 14 days after intoxication. Fragment of astrocyte from cerebral cortex. Nucleus (N) with irregular aggregations of coarse chromatin and light nucleoplasm. Light cytoplasm with rudimentary channels of rough endoplasmic reticulum, and small aggregates of ribosomes. Single mitochondrion and dense body are visible. $\times 26\ 000$

Ryc. 4. Zwierzę z 14-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment astrocytu kory. W jądrze (N) nieregularne skupienia chromatyny oraz przejaśnienie nukleoplazmy. Cytoplazma jasna ze szczątkowo zachowanymi kanałami siateczki śródplazmatycznej oraz drobnymi skupieniami rybosomów. Mitochondrium i ciało gęste. Pow. $26\ 000 \times$

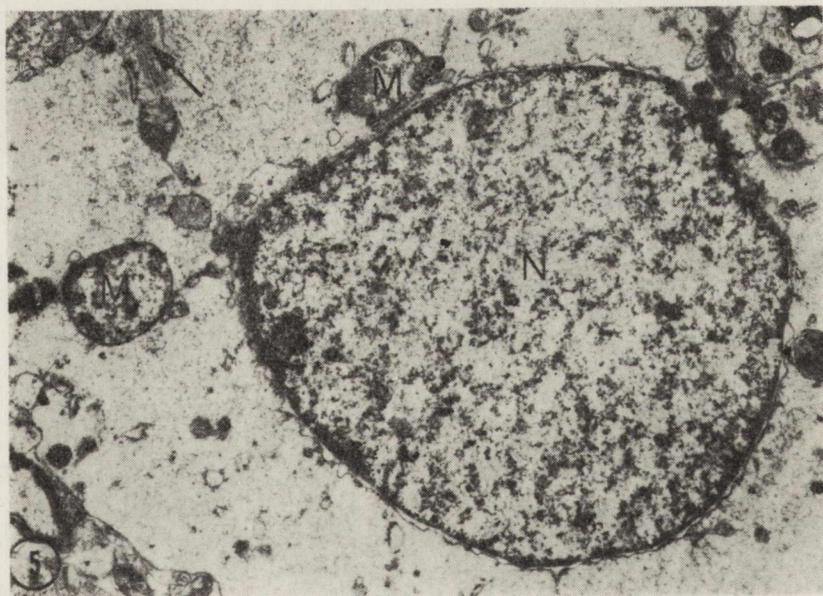


Fig. 5. Animal surviving 21 days after intoxication. Cortical astrocyte with well preserved nucleus (N). Cytoplasm filled with dispersed amorphous substance. A few degenerating mitochondria (M) and delicate bundle of gliofilaments (arrow) are visible. $\times 21\ 000$

Ryc. 5. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Astrocyt kory mózgu. Dobrze zachowane jądro komórkowe (N). W miejscu cytoplazmy rozproszona substancja amorficzna z pojedynczymi wyrodniejącymi mitochondriami (M), oraz delikatnym pęczkiem włókienek glejowych (strzałka). Pow. $21\ 000 \times$

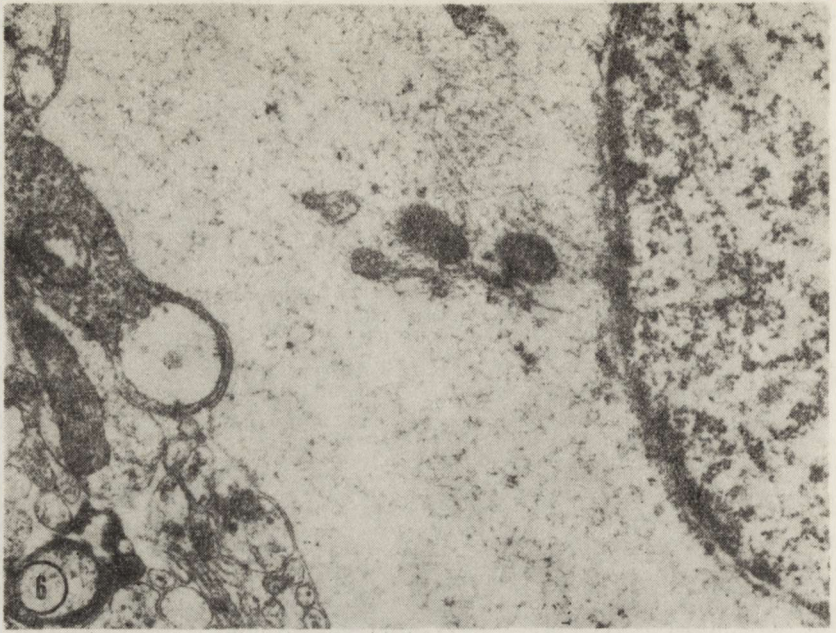


Fig. 6. Animal surviving 21 days after intoxication. Fragment of striatal astrocyte. Total disintegration of cytoplasm with well preserved nucleus. $\times 21\,500$

Ryc. 6. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment astrocytu ze zwojów podstawy. Widoczna całkowita dezintegracja cytoplazmy, przy zachowanym jądrze komórkowym. Pow. $21\,500 \times$

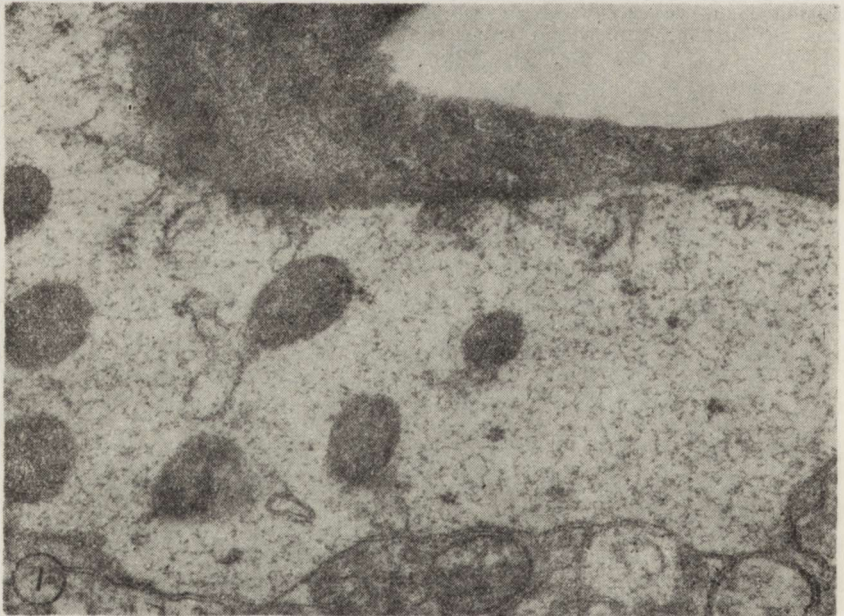


Fig. 7. Animal surviving 21 days after intoxication. Fragment of striatal capillary vessel. Neighbouring astrocytic process with a few rudiments of rough endoplasmic reticulum and single mitochondria. $\times 37\,500$

Ryc. 7. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment naczynia włosowatego zwojów podstawy. Do ściany naczynia przylega wypustka astrocytu, w której widoczne są jedynie resztki siateczki śródplazmatycznej i pojedyncze mitochondria. Pow. $37\,500 \times$

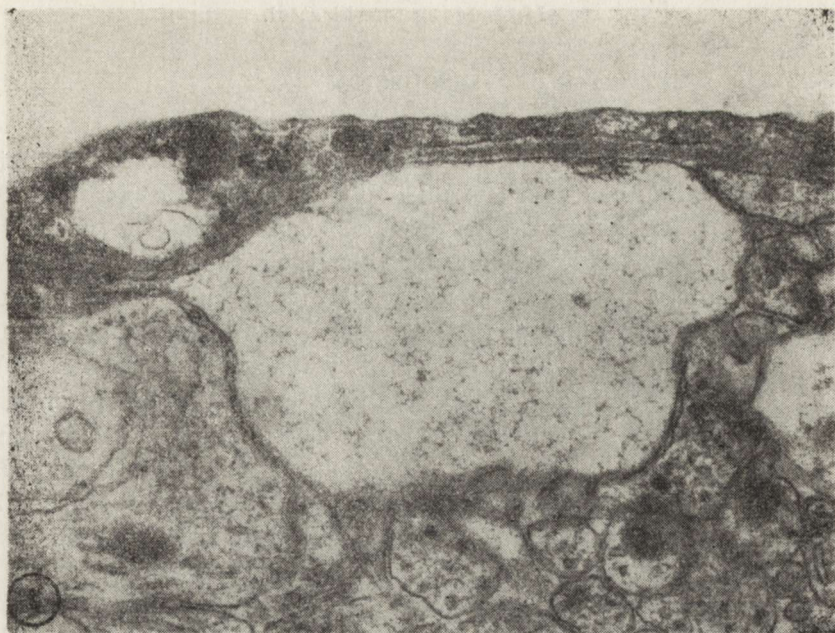


Fig. 8. Animal surviving 21 days after intoxication. Fragment of cortical capillary. Neighbouring astrocytic process totally devoid of any subcellular structures. $\times 37\,500$

Ryc. 8. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment naczynia włosowatego kory mózgu z przylegającą wypustką astrocytu pozbawioną wszelkich struktur. Pow. $37\,500 \times$



Fig. 9. Animal surviving 21 days after intoxication. Fragment of striatal capillary vessel with entirely normal structure of the tissue surroundings. $\times 33\,000$

Ryc. 9. Zwierzę z 21-dniowym przeżyciem po zatruciu. Fragment naczynia włosowatego zwojów podstawy. Obraz prawidłowy, bez zmian patologicznych. Pow. $33\,000 \times$

DISCUSSION

Ultrastructural abnormalities found in the brains of rats intoxicated with thioacetamide concerned exclusively the astrocytic population, with almost entirely unchanged other cellular elements of the nerve tissue. Impaired neurons were so sporadic that they could be considered as either incidental or secondary findings, this being in full agreement with the opinion considering astrocyte lesion as a primary feature in hepatogenic encephalopathy (Mossakowski 1966; Seitelberger 1970).

The electron microscopic abnormalities of astrocytes resembled to a great extent those described by Ostenda et al. (1976) in experimental hepatic encephalopathy induced by prolonged carbon tetrachloride intoxication and by Norenberg et al. (1974) in late stages of portal-systemic encephalopathy. They were also similar to lesions found in some cases of human hepato-cerebral pathology (Martinez 1968; Foncin 1970; Foncin, Nicolaidis 1970). They revealed a typical evolution of the pathological process, leading to the appearance of enlarged, sharply delineated astrocytic nuclei, surrounded by remnants of highly disintegrated cytoplasm. This picture seemed to represent an electron microscopic equivalent of Alzheimer cells, type II. Abnormalities involving astrocytic processes, as confronted with light microscopic observations, could correspond to the features of klasmatodendrosis. Therefore, astrocytic lesions varying in intensity can be considered as subsequent stages of Alzheimer cells, type II formation. In the light of the accepted role of astrocytes in transport phenomena in the brain, severe alteration of their perivascular processes may lead to profound disturbances in the function of the blood-brain interphase.

Against the background of the presented electron microscope observations, compensatory features concerning ammonia metabolism in the brain noticed at this stage of the pathological process (Hilgier 1983a) seem to be connected with the function of the remaining, unchanged astrocytic population. Astrocyte proliferation, difficult for electron microscopic evaluation, is also a typical feature of hepatogenic encephalopathy both in humans and in experimental animals (Mossakowski 1978). Its exponents were found in early stages of hepatogenic encephalopathy in rats intoxicated with thioacetamide (Hilgier et al. 1983).

It seems worth mentioning that characteristic astroglial abnormalities in the experimental model used were present and progressing at that time, when biochemical exponents of acute liver failure and brain metabolic abnormalities were disappearing (Hilgier 1983a; Hilgier et al. 1983). This may have been connected with what is called maturation of the pathological process. The maturation phenomenon, described originally by Klatzo (1975) in the ischemic pathology of the brain, seems to be a feature of a more universal nature. On the other hand, it may

result from a protracted accumulation of toxic substance(s) in the brain. The astrocytic pathology in hepatogenic encephalopathy has been usually connected with the toxic action of ammonia, owing to its excess accumulation in the brain, resulting from its insufficient detoxication (Mossakowski 1978). However, in the applied experimental model and scheme of thioacetamide intoxication, excess accumulation of brain ammonia was not a feature at any period of observation, despite its highly increased content in the blood serum. The continuously noticed accumulation of brain glutamine was considered as an indication of a highly sufficient ammonia detoxication system.

Basing on the observations in other experimental models of hepatogenic encephalopathy, Hilgier (1983b) postulated the existence of an alternative mechanism of astrocytic damage, connected with the neurotoxic action of α -ketoglutaramate. This substance, being a direct product of glutamine metabolism, is known to accumulate in the brain in hepatogenic encephalopathy (Duffy et al. 1974). In the light of the data presented this mechanism seems to be highly probable in the case of hepatogenic encephalopathy induced by thioacetamide intoxication. However, this hypothesis requires biochemical confirmation.

MIKROSKOPOWO-ELEKTRONOWY OBRAZ ENCEFALOPATII WĄTROBOWEJ U SZCZURÓW W ZATRUCIU TIOACETAMIDEM

Streszczenie

Przedstawiono wyniki analizy mikroskopowo-elektronowej mózgu szczurów zatrutowanych tioacetamidem w okresie cofania się wykładników biochemicznych niewydolności wątroby i zaburzeń metabolicznych w ośrodkowym układzie nerwowym. Stwierdzono, iż nieprawidłowości tkankowe w mózgu dotyczą wybiórczo astrocytów. Prześledzono kolejne fazy uszkodzeń komórek gwiazdzistych, aż do uformowania komórek Alzheimer'a typu II.

Wobec braku nagromadzenia amoniaku w mózgu, przy wybitnym wzroście glutaminy, wysunięto przypuszczenie, że czynnikiem odpowiedzialnym za uszkodzenie astrocytów może być α -ketoglutaraminian, stanowiący neurotoksyczny produkt metabolizmu glutaminy.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКАЯ КАРТИНА ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ У КРЫС ОТРАВЛЕННЫХ ТИОАЦЕТАМИДОМ

Резюме

Представлены результаты электронно-микроскопического анализа головного мозга у крыс отравляемых тиоацетамидом в периоде отступления биохимических показателей недостаточности печени и метаболических расстройств в центральной нервной системе. Констатировано, что тканевые аномалии в головном мозгу относятся селективно к астро-

цитам. Прослежено поочередно фазы повреждений астроцитов вплоть до образования клеток Альцгеймера II типа.

Из-за недостатка накопления аммиака в головном мозгу во время выдающегося роста глутамина сделано предположение, что фактором ответственным за повреждение астроцитов может быть α -кетоглутарамат, представляющий собой невротоксический продукт метаболизма глутамина.

REFERENCES

1. Diemer N. H.: Glial and neuronal changes in experimental hepatic encephalopathy. *Acta neurol. Scand.*, 1978, suppl. 71, 58, 1—144.
2. Duffy T. E., Vergara F., Plum F.: Alfaketoglutaramate in hepatic encephalopathy. In: *Brain disfunction in metabolic disorders*. Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis., vol. 53. Ed. F. Plum. Raven Press, New York 1974, 39—52.
3. Foncin J. F.: Pathologie ultrastructurale chez l'homme. *Proc. VI Internat. Congress Neuropath.* Masson, Paris 1970, 371—391.
4. Foncin J. F., Nicolaidis S.: Encephalopathie porto-cave: contribution à la pathologie ultrastructurale de la glie chez l'homme. *Rev. Neurol.*, 1970, 123, 81—87.
5. Gupta D. N.: Acute changes in the liver after administration of thioacetamide. *J. Path. Bact.*, 1956, 72, 183—191.
6. Hilgier W.: Encefalopatia wątrobowa wywołana podawaniem tioacetamidu. III. Zawartość amoniaku i substratów jego metabolizmu w mózgu. *Neuropat. Pol.*, 1983a, 21, 511—518.
7. Hilgier W.: Brain ammonia metabolism in experimental encephalopathy. (Polish text). Doctor's Thesis. Medical Research Centre, Pol. Acad. Sci. Warszawa 1983b.
8. Hilgier W., Albrecht J., Kraśnicka Z.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in rat. I. Preliminary morphological and biochemical observations. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 487—494.
9. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. In: *The nervous system — the basic neurosciences*. Ed. D. B. Tower, Raven Press, New York, 1975, 313—322.
10. Kraśnicka Z., Albrecht J., Gajkowska B., Mossakowski M. J.: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. II. Cytochemical and ultrastructural studies on astrocytes cultured *in vitro*. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 495—510.
11. Martinez A.: Electron microscopy in human hepatic encephalopathy. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1968, 11, 82—86.
12. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 231—304.
13. Mossakowski M. J.: Experimental studies on the pathogenesis of hepatogenic encephalopathy. *Proc. Polish-Italian Neurol. Soc. Symposium, Varenna, June 18—21, 1978. Riv. Patol. Nerv. Ment.*, 1978, 37, 25—36.
14. Mossakowski M. J.: Experimental modelling of hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 261—276.
15. Norenberg M. D., Lapham L. W.: The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscope study. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1974, 33, 422—435.
16. Ostenda M., Mossakowski M. J., Pronaszko-Kurczyńska A.: Ultrastructural studies on experimental hepatogenic encephalopathy. *Neuropat. Pol.*, 1976, 14, 347—354.

17. Seitelberger F.: General neuropathology of central neuroglia: the concept of glial syndromes. Proc. VI Intern. Congress Neuropath. Masson, Paris 1970, 392—403.
18. Vorbrodz A., Stęplewski Z., Krzyżowska-Gruca S.: The effect of thioacetamide on the rat liver parenchymal cells. Folia Histochem. Cytochem., 1966, 8, 11—21.

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

URSZULA WYSMYK-CYBULA

BADANIA METABOLIZMU KWASU γ -AMINOMASŁOWEGO (GABA)
W MÓZGU SZCZURA W DOŚWIADCZALNEJ ENCEFALOPATII
WĄTROBOWEJ WYWOŁANEJ CZTEROCHLORKIEM WĘGLA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN,
Warszawa

Patomechanizm uszkodzeń tkanki nerwowej związanych z zespołem encefalopatii pochodzenia wątrobowego, występującej spontanicznie, jak i wywołanej działaniem niektórych związków hepatotoksycznych, jest od wielu lat przedmiotem dyskusji i nie został jeszcze w pełni wyjaśniony. Czterochlorek węgla, jako środek silnie uszkadzający wątrobę, stosowany był wielokrotnie w celu wywołania doświadczalnej encefalopatii wątrobowej (Baraona i wsp. 1965; Mossakowski i wsp. 1970; Diemer 1978). Uszkodzenie wątroby, w tym modelu doświadczalnym, w trwały sposób upośledza metabolizm amoniaku w cyklu mocznikowym, wskutek czego jego nadmiar przedostając się drogą łożyska naczyniowego do mózgu obciąża istniejący tam cykl detoksykacyjny, wywołując szereg zmian w poziomie związków pośrednich tego cyklu (Hilgier, Mossakowski 1979; Hilgier 1980, 1981). Zmiany takie, jak spadek poziomu α -ketoglutaranu (Hilgier 1980), wahania poziomu glutaminy oraz zmiany aktywności syntetazy glutaminowej i glutaminazy (Hilgier 1981), mogą wskazywać na możliwość wystąpienia zaburzeń na bocznej odnodze cyklu metabolizmu amoniaku w mózgu, prowadzącej do syntezy kwasu γ -aminomasłowego (GABA). Wielokrotnie zwracano uwagę na możliwość pojawienia się zmian w poziomie tego neurotransmitera w różnych modelach encefalopatii, jednakże jego rola w tym procesie nie została w pełni udowodniona (Goetcheus et al. 1965; Schafer 1982; Wysmyk-Cybula 1983a,b). Biorąc pod uwagę występujące w modelu czterochlorkowym zaburzenia w metabolizmie związków stanowiących substraty do syntezy GABA, jak również zmiany morfologiczne w tych komórkach mózgu, z którymi związane są jego przemiany, wydawało się celowe zbadanie poziomu GABA oraz aktywności enzymów uczestniczących w metabolizmie tego związku — dekarboksylazy kwasu glutaminowego (GAD) oraz transaminazy kwasu γ -aminomasłowego (GABA-T).

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 8-tygodniowych samicach szczurów rasy Wistar o masie ciała 180—200 g. W momencie zakończenia doświadczenia wiek zwierząt w każdej grupie wynosił 8 miesięcy.

W celu wywołania marskości wątroby zwierzętom wstrzykiwano podskórnie co drugi dzień czterochlorek węgla (CCl_4), rozpuszczony w płynnej parafinie, w dawce 0,1 ml na 100 g masy ciała (Georgijew i wsp. 1968). Zwierzętom kontrolnym podawano płynną parafinę w analogiczny sposób. Szczury dekapitowano bez znieczulenia po upływie 2, 4 i 6 miesięcy od pierwszego wstrzyknięcia. Tkanę do badań (kora, prążkowie, mózdzek) pobierano z mózgowia umieszczonego na płytce szklanej oziębionej suchym lodem i natychmiast homogenizowano w roztworach dobranych odpowiednio do dalszej preparatyki. Homogenaty do badań enzymatycznych zamrażane były w mieszaninie suchego lodu z metanolem i przechowywane w temperaturze -22°C , natomiast ekstrakty etanolowe GABA poddawane były natychmiast dalszej obróbce.

Oznaczenie poziomu GABA: Poziom GABA oznaczano fluorometrycznie według metody Grahama i Aprisona (1966). Pomiary prowadzono na fluorymetrze Aminco-Bowman przy długości fali wzbudzenia 365 nm i emisji 465 nm. Wyniki wyrażano w μmol ach GABA/g świeżej tkanki.

Oznaczanie aktywności dekarboksylazy glutaminowej (GAD): Aktywność GAD oznaczano w 10% homogenatach kory, prążkowie i mózdku według metody opisanej przez Baxtera (1972), polegającej na pomiarze uwolnionego $^{14}\text{CO}_2$, powstającego w reakcji $^*\text{GLU} \xrightarrow[\text{PLP}]{\text{GAD}} \text{GABA} + ^*\text{CO}_2$. Wyniki przedstawiono w μmol ach CO_2/g świeżej tkanki/godzinę.

Oznaczanie aktywności transaminazy kwasu γ -aminomasłowego (GABA-T): Pomiary aktywności enzymu przeprowadzono również w 10% homogenacie kory, prążkowie i mózdku, opierając się na metodzie kolorymetrycznej opisanej przez Baxtera (1972). Aktywność enzymu wyrażano w μmol ach glutaminianu/g tkanki/godzinę.

WYNIKI

W tabeli 1 przedstawiono wyniki dotyczące poziomu kwasu γ -aminomasłowego w trzech strukturach mózgu, w następstwie zatrucia CCl_4 . Jak wynika z przedstawionych danych, spadek poziomu GABA zaobserwowano jedynie w prążkowie zarówno w 4, jak i w 6 miesiącu trwania doświadczenia, odpowiednio około 6 i 15%. W pozostałych strukturach poziom GABA w żadnej grupie doświadczalnej nie odbiegał w sposób statystycznie znamieny od wartości kontrolnych.

Zmiany aktywności enzymu syntetyzującego GABA — dekarboksylazy kwasu glutaminowego — przedstawiono w tabeli 2. Najwyższą aktywność enzymu zaobserwowano w mózdku po 2 miesiącach wstrzykiwa-

Tabela 1. Poziom GABA w mózgu szczura po podaniu czterochlorku węgla (CCl₄)
 Table 1. The GABA level in the rat brain following carbon tetrachloride (CCl₄) administration

Okres zatruwania (miesiące) Intoxication period (months)	Grupa Group		Zawartość GABA (μmole/g świeżej tkanki) Content of GABA (μmoles/g of wet tissue)		
			kora cortex (n) $\bar{X} \pm SD$	prążkowie striatum (n) $\bar{X} \pm SD$	mózdzek cerebellum (n) $\bar{X} \pm SD$
2	C	K	1,56±0,08 (5)	1,86±0,09 (5)	1,04±0,13 (5)
	E	D	1,54±0,11 (7)	1,87±0,09 (7)	1,06±0,10 (7)
4	C	K	1,39±0,06 (6)	1,83±0,06 (6)	1,13±0,13 (6)
	E	D	1,40±0,11 (6)	*1,71±0,05 (6)	1,12±0,10 (6)
6	C	K	1,42±0,09 (6)	2,03±0,16 (6)	0,89±0,09 (6)
	E	D	1,32±0,14 (6)	*1,72±0,05 (6)	1,01±0,09 (6)

$\bar{X} \pm SD$ średnia arytmetyczna \pm odchylenie standardowe
 arithmetic mean \pm standard deviation

n — liczba zwierząt
 number of animals

* — różnica znamienna statystycznie ($p < 0,01$)
 difference statistically significant ($p < 0,01$)

K — grupa kontrolna C — control group

D — grupa doświadczalna E — experimental group

nia CCl₄ — około 40% w stosunku do wartości kontrolnych. Nieznacznie podwyższona aktywność (ok. 10%) występowała jeszcze w 4 miesiącu, natomiast w 6 miesiącu nie odbiegała od wartości kontrolnych. Zmiany o odmiennym charakterze wystąpiły w korze mózgu, gdzie zanotowano spadek aktywności enzymu około 10% w 2 i 4 miesiącu doświadczenia, a w 6 miesiącu jej wzrost około 12% w stosunku do wartości kontrolnych. W prążkowie nie zanotowano wahań aktywności GAD.

Aktywność GABA-T (tab. 3) w 2 miesiącu doświadczenia nie wykazywała zmian w żadnej ze struktur. W 4 miesiącu zaobserwowano wzrost aktywności enzymu w korze około 48% i w prążkowie około 30%, natomiast w móżdżku ujawnił się jego niewielki spadek, w 6 miesiącu aktywność enzymu była około 40% wyższa od kontrolnej.

OMÓWIENIE

Podsumowując otrzymane wyniki można stwierdzić, że zaobserwowane wahania aktywności enzymów — zarówno wzrost, jak i spadek — nie znajdują odzwierciedlenia w zmianach poziomu GABA. Jedyną strukturą, gdzie zaobserwowany spadek poziomu neurotransmitera charakteryzuje się pewną regularnością oraz jest skorelowany ze zmianami aktywności enzymów, jest prążkowie. Przyczyną obniżenia stężenia neurotransmitera w tej okolicy mózgu mogły być przyspieszony jego katabolizm

Tabela 2. Aktywność GAD w mózgu szczura po podaniu czterochlorku węgla (CCl₄)
 Table 2. GAD activity in the rat brain following carbon tetrachloride (CCl₄) administration

Okres zatruwania (miesiące) Intoxication period (months)	Grupa Group	Aktywność GAD (μ mole ¹⁴ CO ₂ /g świeżej tkanki/godz) GAD activity (μ moles ¹⁴ CO ₂ /g of wet tissue/h)			
		kora cortex (n)	prążkowie striatum (n)	móżdżek cerebellum (n)	
		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
2	C	K	13,01 ± 0,89 (5)	9,42 ± 1,72 (6)	7,55 ± 0,78 (6)
	E	D	*11,64 ± 1,19 (8)	9,41 ± 1,52 (8)	*10,55 ± 0,63 (8)
4	C	K	13,02 ± 0,72 (7)	15,01 ± 1,37 (7)	9,40 ± 0,74 (7)
	E	D	*11,82 ± 1,07 (7)	15,58 ± 1,94 (7)	*10,28 ± 0,75 (6)
6	C	K	12,65 ± 0,46 (6)	12,99 ± 1,78 (6)	8,87 ± 0,95 (7)
	E	D	*14,20 ± 0,50 (6)	12,24 ± 0,95 (6)	9,23 ± 0,40 (7)

$\bar{X} \pm SD$ średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe
 arithmetic mean ± standard deviation

n — liczba zwierząt
 number of animals

* — różnica znamienna statystycznie (p < 0,01)
 difference statistically significant (p < 0.01)

K — grupa kontrolna C — control group

D — grupa doświadczalna E — experimental group

Tabela 3. Aktywność GABA-T w mózgu szczura po podaniu czterochlorku węgla (CCl₄)
 Table 3. GABA-T activity in the rat brain following carbon tetrachloride (CCl₄) administration

Okres zatruwania (miesiące) Intoxication period (months)	Grupa Group	Aktywność GABA-T (μ mole glutaminianu/g świeżej tkanki/godz) GABA-T activity (μ moles glutamate/g wet tissue/h)			
		kora cortex (n)	prążkowie striatum (n)	móżdżek cerebellum (n)	
		$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	
2	C	K	32,8 ± 5,1 (6)	51,8 ± 6,0 (6)	59,3 ± 6,6 (6)
	E	D	30,9 ± 4,6 (8)	47,4 ± 9,9 (8)	61,5 ± 4,6 (7)
4	C	K	54,9 ± 5,9 (6)	26,3 ± 5,6 (6)	45,6 ± 2,5 (7)
	E	D	*81,5 ± 0,9 (7)	*34,0 ± 4,8 (6)	*38,1 ± 0,9 (6)
6	C	K	49,3 ± 2,7 (7)	40,0 ± 2,0 (7)	47,7 ± 4,8 (6)
	E	D	*45,3 ± 3,0 (7)	*50,6 ± 3,5 (7)	*66,9 ± 2,1 (7)

$\bar{X} \pm SD$ średnia arytmetyczna ± odchylenie standardowe
 arithmetic mean ± standard deviation

n — liczba zwierząt
 number of animals

* — różnica znamienna statystycznie (p < 0,01)
 difference statistically significant (p < 0.01)

K — grupa kontrolna C — control group

D — grupa doświadczalna E — experimental group

na skutek podwyższonej aktywności GABA-T, który jeszcze po 6 miesiącach zatruwania zwierząt utrzymywał się na wysokim poziomie (tab. 3). Szukając przyczyn pobudzenia GABA-T należy wziąć pod uwagę fakt, że enzym ten zlokalizowany jest w komórkach glejowych (najświeższe dane z literatury na ten temat czytelnik znajdzie w pracach Hertza, 1981 oraz Turnera i Whittle'a, 1983). W badaniach morfologicznych wielokrotnie wykazano, że rozplem komórek glejowych oraz ich przerost są głównymi wykładnikami nieprawidłowości tkankowych zarówno w patologii opisywanej u ludzi, jak i w encefalopatii doświadczalnej (Mossakowski 1966; Mossakowski i wsp. 1970; Cavanagh i wsp. 1972; Diemer 1978). Badania biochemiczne potwierdzają tezę o aktywacji gleju w encefalopatii wątrobowej. Z doświadczeń wykonanych w naszej pracowni wiadomo, że w modelu doświadczalnym, analogicznym do opisywanego, wystąpiło zwiększone wbudowywanie znakowanej $^3\text{[H]}$ urydyny do RNA jąder astrogleju, mogące świadczyć o swoistej odpowiedzi astrocytów na podwyższone stężenie amoniaku w mózgu (Albrecht 1981). Jednym z wykładników przerostu komórek astrogleju w encefalopatii wątrobowej jest zwiększenie ilości siateczki śródplazmatycznej (Norenberg 1981). Z kolei, w tym samym modelu zaobserwowano wzrost aktywności syntetazy glutaminowej (Hilgier 1981), enzymu o udowodnionej lokalizacji astroglejowej (Martinez-Hernandez i wsp. 1977; Norenberg 1979).

Aktywację GABA-T odnotowano także w pozostałych strukturach mózgu, w przypadku kory wzrost ten zaznaczył się również w 4 miesiącu, w mózdku natomiast wystąpił on później — w miesiącu szóstym. Zaobserwowane zmiany, jak się wydaje, mogą być wykładnikiem postępującego rozplemu glejowego towarzyszącego zwyrodnieniu OUN, przebiegającego jednak w poszczególnych strukturach mózgowych w odmiennych przedziałach czasowych.

Interpretacja danych dotyczących dekarboksylazy kwasu glutaminowego jest znacznie trudniejsza. Dane z literatury zarówno biochemiczne, jak i morfologiczne, nie wskazują na znaczące uszkodzenie komórek nerwowych w encefalopatii wątrobowej. Wydaje się, że zaobserwowane w korze mózgu zaburzenia aktywności GAD można powiązać ze stwierdzonym przez Hilgiera (1980, 1981), w analogicznym modelu doświadczalnym, upośledzeniem cyklu detoksykacji amoniaku wyrażającym się obniżeniem poziomu glutaminianu i α -ketoglutaranu (odpowiednio w 2 oraz 4 i 6 miesiącu), z jednoczesną istotną aktywacją glutaminazy w 6 miesiącu podawania CCl_4 . Niedobory substratów mogłyby być początkowo przyczyną obniżenia aktywności GAD, natomiast późniejsza aktywacja glutaminazy, umożliwiającą zwiększone dostarczanie glutaminianu do szlaku metabolicznego GABA mogłaby pobudzać ten enzym. Zmiany aktywności GAD w mózdku, które pojawiły się już w 2 miesiącu podawania CCl_4 , pozwalają sądzić, że w tym wypadku mamy do czynienia

z metabolicznym pobudzeniem GABA-ergiczných neuronów mózdku. Wiele danych wskazuje, że enzym ten umiejscowiony jest w komórkach Purkiniego (Wood i wsp. 1976), które jak podaje Diemer (1978), w analogicznym modelu doświadczalnym, nie uległy istotnemu uszkodzeniu. Warto zaznaczyć, że uprzednio, w ostrym modelu uszkodzenia wątroby tioacetamidem, zanotowano wzrost poziomu GABA zarówno w korze, jak i w prążkowie (Wysmyk-Cybula 1983a), czego w modelu przewlekłym nie stwierdzono. Świadczyć to może z jednej strony o odmienności ostrego i przewlekłego modelu encefalopatii wątrobowej, z drugiej zaś strony pozwala na przypuszczenie, że GABA nie odgrywa istotnej roli w patomechanizmie przewlekłej encefalopatii wątrobowej.

Autorka składa podziękowania Pani Teresie Pańkowskiej za pomoc techniczną przy wykonywaniu pracy doświadczalnej.

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЗМА γ -АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ (GABA) В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫСЫ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПЕЧЕНОЧНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ ВЫЗВАННОЙ ЧЕТЫРЕХХЛОРИСТЫМ УГЛЕРОДОМ

Резюме

В настоящей работе определено активность декарбоксилазы глутаминовой кислоты (GAD), трансминазы γ -аминомасляной кислоты (GABA-T) и уровень самого нейротрансмиттера в головных мозгах крыс, у которых печеночную энцефалопатию вызвано длительным введением четыреххлористого углерода (2, 4, 6 месяцев). Активность энзимов и уровень соединения определялись в 10% гомогенатах отдельных головномозговых строениях: коры, стриатума, мозжечка. Констатируется большие колебания активности энзимов, которым в общем не сопутствовали изменения в уровне GABA. Исключение составлял стриатум, в котором росту активности GABA-T — энзима катаболизирующего GABA — сопутствовал спад уровня нейротрансмиттера в 4 и 6 месяце эксперимента, соответственно на ок. 6 и 15%. Кажется, что наблюдаемый рост активности GABA-T в коре и в стратуме в четвертом, а в мозжечке в шестом месяце введения соединения можно связывать с возбуждением астроглии, наблюдаемым неоднократно в разных стадиях печеночной энцефалопатии.

THE LEVEL OF γ -AMINOBUTYRIC ACID (GABA) AND THE ACTIVITY OF GABA METABOLIZING ENZYMES IN THE RAT BRAIN IN HEPATIC ENCEPHALOPATHY INDUCED BY ADMINISTRATION OF CARBON TETRACHLORIDE

Summary

The glutamic acid decarboxylase (GAD), and γ -aminobutyric acid transaminase (GABA-T) activities and the GABA level were measured in the brains of rats in which hepatic encephalopathy was induced by long-term treatment with carbon tetrachloride (2, 4, 6 months). The enzymes activities and the neurotransmitter content were determined in 10% homogenates of the particular brain structures: cortex, striatum and cerebellum. It was found that rather significant fluctuations of the enzymes activities were not accompanied by changes in the GABA

level. The only exception was striatum, in which the increased GABA-T activity coincided with the decrease of neurotransmitter level in the 4th and 6th month of the experiment, accordingly by about 6 and 15%. The rise of GABA-T activity observed in the cortex and striatum after 4 months and in the cerebellum after 6 months of carbon tetrachloride administration, may be related to astroglial activation which typically accompanies different stages of hepatic encephalopathy.

PIŚMIENICTWO

1. Albrecht J.: Cerebral RNA synthesis in experimental hepatogenic encephalopathy. *J. Neurosci. Res.*, 1981, 6, 553—558.
2. Baraona E., Salinas A., Navia E., Orrego H.: Alterations of ammonia metabolism in the cerebral cortex of rats with hepatic damage induced by carbon tetrachloride. *Clin. Sci.*, 1965, 28, 201—208.
3. Baxter C. F.: Assay of γ -aminobutyric acid and enzymes involved in its metabolism. W: *Methods of neurochemistry*. Red. R. Fried, M. Dekker, New York 1972, 1—61.
4. Cavanagh J. B., Lewis P. D., Blakemore W. F., Kyu M. H.: Changes in the cerebellar cortex in rats after portocaval anastomosis. *J. Neurol. Sci.*, 1972, 15, 13—26.
5. Diemer N. H.: Glial and neuronal changes in experimental hepatic encephalopathy. *Acta Neurol. Scand.*, 1978, 58, Supl. 71.
6. Georgijew A., Kołczak M., Węgiel J.: Niektóre obserwacje dotyczące wpływu CCl_4 na wątrobę prawidłową i regenerującą. *Pat. Pol.*, 1968, 19, 179—187.
7. Goetcheus J. S., Leslie T., Webster J. R.: γ -aminobutyrate and hepatic coma. *J. Lab. Clin. Med.*, 1965, 65, 257—267.
8. Graham L. T., Aprison M. H.: Fluorometric determination of aspartate glutamate, and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymatic methods. *Anal. Biochem.*, 1966, 15, 487—497.
9. Hertz L.: Functional interactions between astrocytes and neurons. *Progr. Clin. Biol. Res.*, 1981, 59, 45—58.
10. Hilgier W., Mossakowski J.: Aktywność 1-glutamino-aminohydrolazy w mózgu szczurów w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 287—293.
11. Hilgier W.: Zawartość α -ketoglutaranu i glutaminianu w mózgu szczurów w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1980, 18, 121—126.
12. Hilgier W.: Zawartość amoniaku oraz aktywność syntetazy glutaminowej i glutaminazy w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 351—358.
13. Martinez-Hernandez A., Bell K. P., Norenberg M. D.: Glutamine synthetase: Glial localization in brain. *Science*, 1977, 195, 1356—1358.
14. Mossakowski M. J.: Patomorfologia i histochemia spontanicznych i doświadczalnych encefalopatii pochodzenia wątrobowego. *Neuropat. Pol.*, 1966, 4, 231—304.
15. Mossakowski M. J., Śmiałek M., Pronaszko A.: Zaburzenia przepuszczalności naczyń krwionośnych mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1970, 8, 365—374.
16. Norenberg M. D.: The distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, 27, 756—762.
17. Norenberg M. D.: The astrocyte in liver disease. W: *Advances in Cellular Neurobiology*. Red. S. Fedoroff, L. Hertz. Academic Press, New York 1981, 2, 304—338.

18. Schafer D. F.: Hepatic encephalopathy and the γ -aminobutyric acid neurotransmitter system. *Lancet* 1982, 2, 18—20.
19. Turner A. J., Whittle S. R.: Biochemical dissection of γ -aminobutyrate synapse. *Biochem. J.*, 1983, 209, 29—41.
20. Wood J. G., McLaughlin B. J., Vaughn H. E.: Immunocytochemical localization of GAD in electron microscopic preparations of rodent C.N.S. W: GABA in nervous system function. Red. E. Roberts, T. N. Chase, D. B. Tower. Raven Press, New York 1976, 133—148.
21. Wysmyk-Cybula U.: Zawartość kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1983a, 21, 129—134.
22. Wysmyk-Cybula U.: Próba oceny metabolizmu kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej. *Neuropat. Pol.*, 1983b, 21, 519—527.

Adres autorki: Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Dwor-kowa 3, 00-784 Warszawa

IRMINA B. ZELMAN, ANNA TARASZEWSKA

PATOLOGIA MIELINY U KRÓLIKA PT

Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej Centrum Medycyny
Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Mińsk Mazowiecki

Królik pt jest mutantem neurologicznym, który charakteryzuje się zróżnicowanym przebiegiem choroby i złożoną strukturą procesu patologicznego (Osetowska i wsp. 1975). W zespole objawowym występują rytmiczne drżenia ciała, grubofaliste, często kolebiące, nasilające się przy pobudzeniu i ruchach czynnych i zanikające w spoczynku. Pojawiają się one zazwyczaj pomiędzy 10—12 dniem życia. W późniejszym okresie, przeważnie na początku 3 tygodnia życia, rozwija się spastyczny niedowład kończyn, zwłaszcza tylnych, narastający u niektórych zwierząt do pełnych porażen. Można wyróżnić dwa zasadnicze warianty przebiegu klinicznego. Pierwszy z nich charakteryzuje ciężki, postępujący przebieg choroby prowadzący do śmierci zwierzęcia lub trwałego kalectwa przed ukończeniem pierwszego półrocza życia. Drugi wyróżnia się poprawą kliniczną po okresie zmiennie nasilonych drżeń i niedowładów, z kilkuletnim przeżyciem i zdolnością do reprodukcji.

Zespół patologiczny charakteryzuje rozsiane, uogólnione, nieswoiste uszkodzenie neuronów, najbardziej nasilone w ugrupowaniach jądrowych pnia mózgu i niektórych strukturach podkorowych, glejoza komórkowa, nieproporcjonalna do nasilenia uszkodzeń neuronalnych oraz nieprawidłowości w obrazie mieliny. Te ostatnie traktowano początkowo jako następstwo rozpadu osłonek mielinowych, jednakże hipoteza ta nie znalazła potwierdzenia w badaniach mikroskopowo-elektronowych, które wykazały u królika pt zmiany wskazujące na zaburzenie procesu mielinizacji z minimalnym tylko komponentem wtórnego zwyrodnienia osłonek mielinowych (Taraszevska 1979, 1983a,b).

Istotne znaczenie tego faktu zarówno w odniesieniu do zróżnicowanej ekspresji klinicznej mutacji pt, jak i złożonej struktury procesu patologicznego skłoniło nas do zwrócenia szczególnej uwagi na patologię mieliny u królika pt. Celem niniejszej pracy jest histologiczna ocena pro-

cesu mielinizacji u mutantu pt w okresie rozwoju objawów klinicznych oraz ocena mieliny w przewlekłym okresie choroby w porównaniu z bezobjawowymi królikami pt i królikami zdrowymi, nie obciążonymi genetycznie cechą pt.

MATERIAŁ I METODY

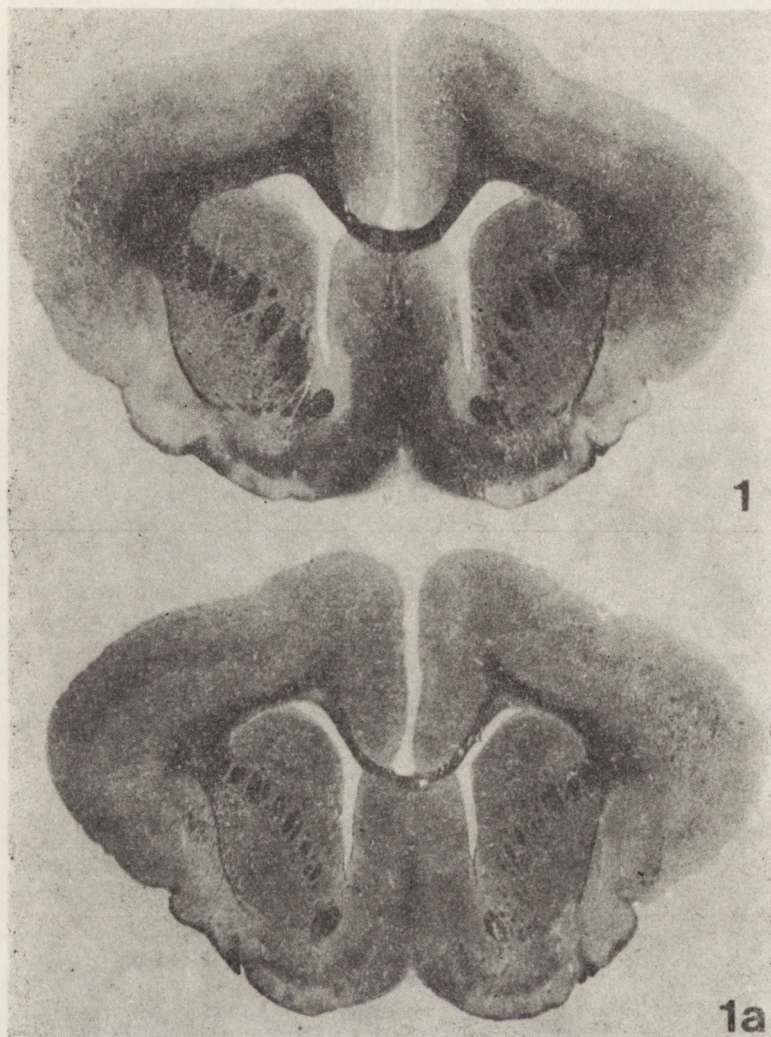
Badania przeprowadzono na królikach ze stada pt, objawowych samcach i samicach w wieku od 10 dni do 5 miesięcy oraz królikach pt z poprawą kliniczną po okresie objawowym, w wieku od 1 roku do 3 lat. Materiałem porównawczym były bezobjawowe króliki pt w tym samym wieku oraz normalne zdrowe króliki hodowane w takich samych warunkach, jak stado pt. Badania rozpoczęto od 10 dnia życia ponieważ w tym okresie można wyselekcjonować zwierzęta objawowe. Z kolei u 5-miesięcznych królików w prawidłowych warunkach zarówno histologiczny, jak i histochemiczny obraz mieliny we wszystkich strukturach OUN jest taki sam, jak u dorosłych osobników (Almeida, Pearse 1958; Wender i wsp. 1969). Króliki w wieku 2—10 tygodni badano w odstępach 7-dniowych, króliki w wieku 3—5 miesięcy — w odstępach 14-dniowych.

Mózgi królików przeznaczonych do badania utrwalano *in situ*, stosując w narkozie (Eunarcon) przezsercową perfuzję 10% roztworu formaliny. Po wyjęciu z jamy czaszki mózgi pozostawiono w płynie perfuzyjnym przez 24 godz. Następnie pobierano w płaszczyźnie czołowej 4 bloczki przez obie półkule mózgu oraz wycinki ze śródmózgowia, mostu wraz z mózdzkiem i opuszki. Skrawki parafinowe barwiono metodą Klüvera—Barrery, Heidehaina lub Kelemana oraz hematoksyliną-eozyną. Ponadto na skrawkach mrozkowych z mózgów królików w wieku 2, 4, 8 i 12 tygodni wykonano barwienie Sudanem III i Sudanem czarnym B, barwienie kwaśną hemateiną według Bakera, na metachromazję według Feyrtera, odczyn PAS oraz barwienie czernią amidową 10B (w modyfikacji do barwienia skrawków tkankowych wg Seitelbergera i wsp. 1957).

WYNIKI

Lupowa ocena skrawków z mózgów królików w wieku od 10 dni do 5 miesięcy, barwionych na osłonki mielinowe, wykazuje we wszystkich przedziałach wieku różnice w nasileniu mielinizacji pomiędzy objawowymi mutantami i kontrolnymi oraz bezobjawowymi zwierzętami. Nieprawidłowości w obrazie mieliny są zróżnicowane w zależności od wieku zwierząt i wykazują znaczne wahania indywidualne u królików objawowych w tym samym wieku.

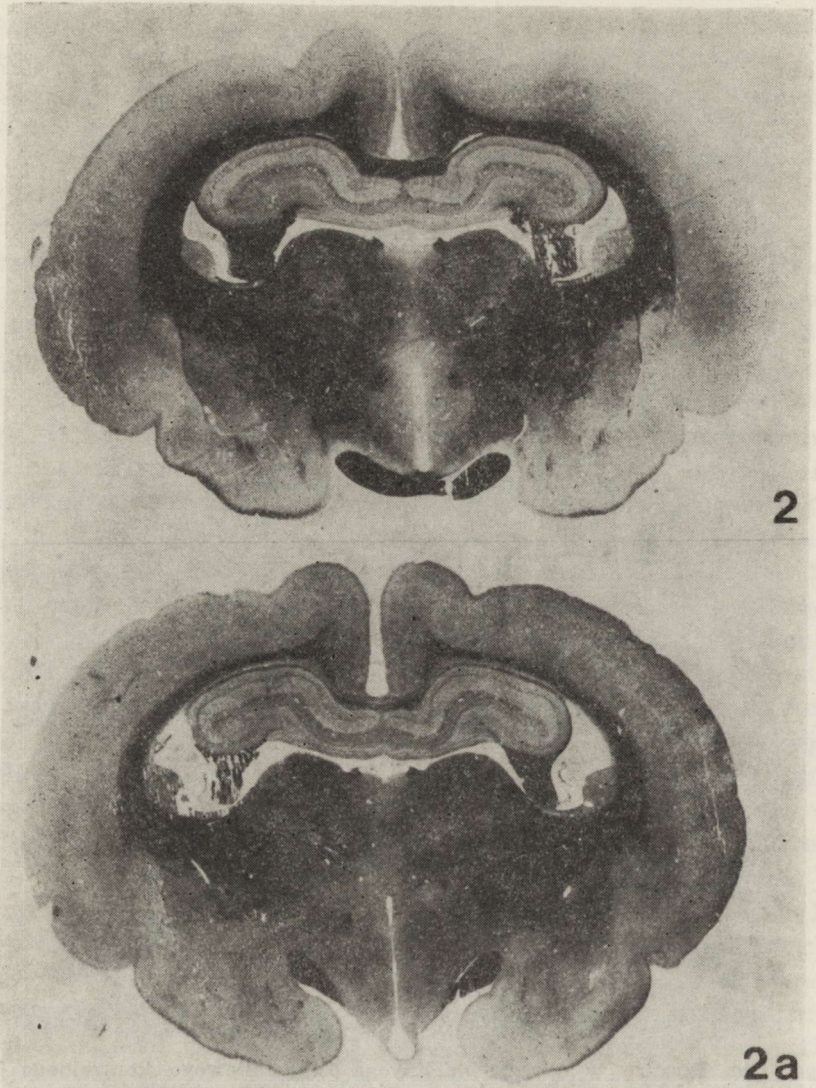
Najmniejsze różnice występują u najmłodszych mutantów (10- i 14-dniowych), w związku ze słabo zaawansowaną mielinizacją w tym okresie życia u normalnych królików oraz większym zagęszczeniem gleju



Ryc. 1,1a. Różnice w obrazie mielinie u 6-tygodniowego kontrolnego królika i u objawowego mutantu w tym samym wieku. U królika pt mniej zaawansowany rozwój mielinie we wszystkich strukturach. Heidenhain. Pow. lupowe

Fig. 1,1a. Differences in myelin staining in 6-week control rabbit and in symptomatic pt mutant of the same age. In pt rabbit less advanced myelin development in all brain structures. Heidenhain. Magn. glass

i bardziej intensywnym zabarwieniem podłoża u królików pt. Dwa następne tygodnie życia charakteryzuje duży postęp w rozwoju osłonek mielinowych w strukturach pnia mózgu, kresomózgowia i mózdzku u zdrowych królików i znacznie wolniejszy przyrost zmielinizowanych włókien u objawowych mutantów. W obu grupach zwierząt zachowany jest przy tym podobny wzorec w zróżnicowaniu nasilenia mielinizacji w poszczególnych strukturach białych. Tylko pozamózgowe odcinki nerwów czaszkowych barwią się podobnie u królików pt i u zdrowych



Ryc. 2,2a. Mielinizacja u 2-miesięcznego zdrowego królika i objawowego mutantu. U królika pt rozlane zblednięcie mieliny, tylko pasma wzrokowe są względnie dobrze zmielinizowane. Heidenhain. Pow. lupowe

Fig. 2,2a. Myelination in 2-month healthy rabbit and in symptomatic mutant. In pt rabbit diffuse pallor of myelin staining, only optic tracts are comparatively well myelinated. Heidenhain. Pow. lupowe

zwierząt. Różnice w obrazie mieliny utrzymują się również w dalszych przedziałach wieku. U 6-tygodniowych i starszych królików objawowych, oprócz słabszego zabarwienia wszystkich struktur, zwraca uwagę gorszy rozwój istoty białej przy dobrze wykształconej korze i strukturach podkorowych (ryc. 1, 1a).

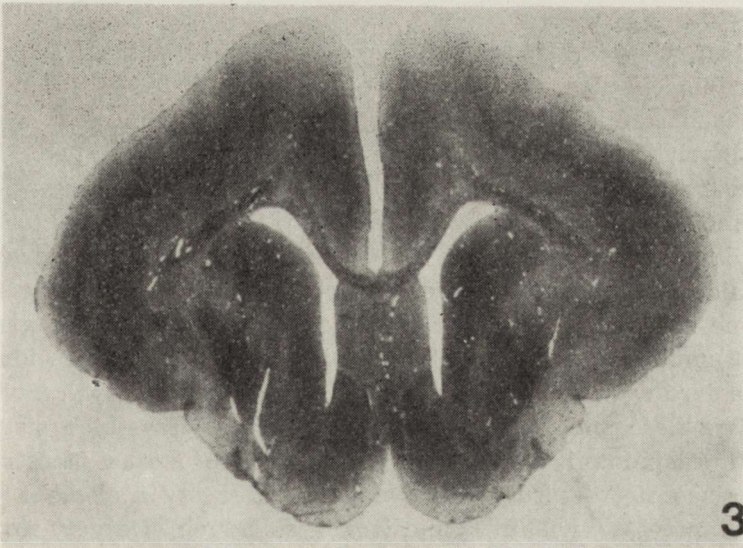
U zdrowych 2-miesięcznych królików istota biała jest już w pełni zmielinizowana z wyjątkiem niektórych części ciała modzelowatego. Na-

tomiast u objawowych mutantów w tym samym wieku przy widocznym postępie mielinizacji nadal zachowany jest obraz ogólnie słabszego zabarwienia istoty białej i niepełnej mielinizacji włókien, zwłaszcza w strukturach, w których mielinizacja rozpoczyna się w późniejszym okresie życia (ryc. 2, 2a).

W dalszych przedziałach wieku (3—5 miesięcy) u normalnego królika wykształca się obraz mieliny charakterystyczny dla dojrzałego zwierzęcia. W tym okresie u niektórych objawowych królików pt zmniejszają się różnice w porównaniu z kontrolą i obraz mieliny zbliża się bardziej do normy. Równocześnie zaznaczają się przejaśnienia przede wszystkim w istocie białej i konarach mózdzku, we włóknach tworzących siatkowatego, układach pęczkowych wzgórza i gałki bladej oraz w konarach mózgu. W większości przypadków, zwłaszcza z ciężkim postępującym zespołem objawowym, zblednięcie mieliny ma charakter uogólniony i rozlany oraz jest szczególnie nasilone w istocie białej mózdzku.

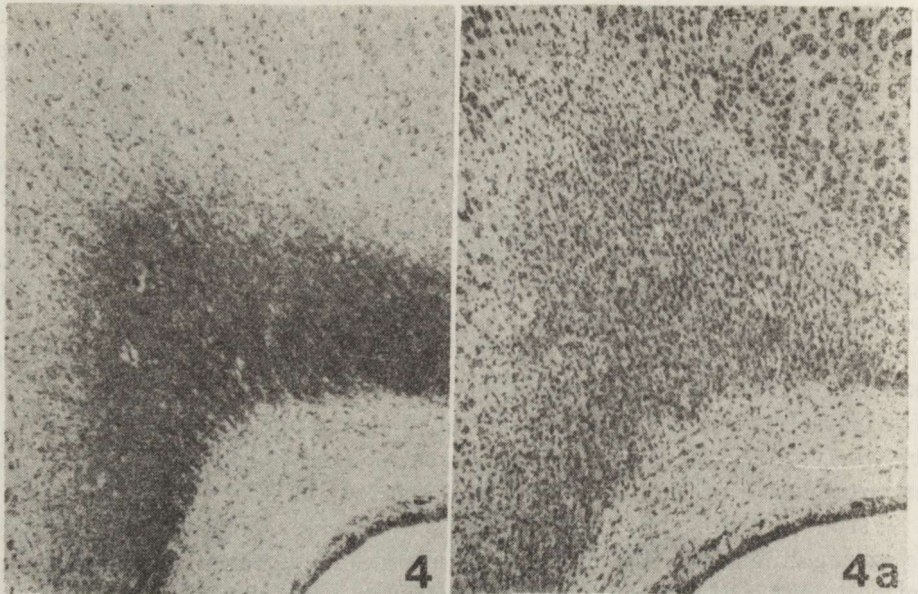
Wśród objawowych królików pt spotyka się osobniki wyróżniające się szczególnie skąpą ilością mieliny i brakiem wyraźnego postępu mielinizacji. W tych przypadkach zwraca uwagę szczególnie słabe zabarwienie istoty białej z charakterystycznym zatarciem rysunku struktur anatomicznych (ryc. 3).

Mikroskopowa ocena mieliny u rozwijających się królików jeszcze bardziej podkreśla różnice między objawowym mutantem i zdrowym



Ryc. 3. Królik pt 2-miesięczny z ciężkim postępującym zespołem klinicznym. Zwiększone nasilenie nieprawidłowości w obrazie mieliny. Istota biała słabo rozwinięta, rysunek struktur anatomicznych zatarty. Heidenhain. Pow. lupowe

Fig. 3. 2-month pt rabbit with severe protracted course of the disease. Increased intensity of abnormalities in myelin staining. Underdeveloped and poorly delineated white matter. Heidenhain. Magn. glass



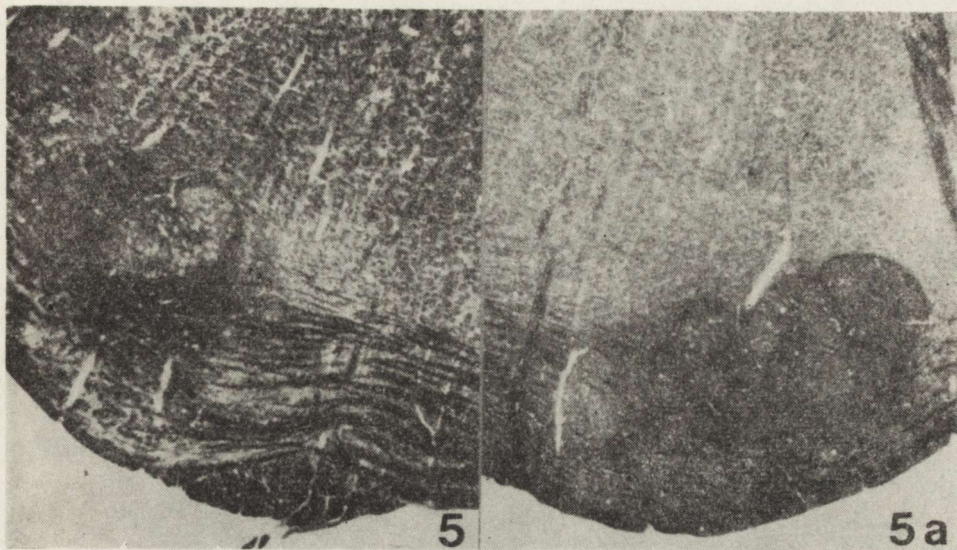
Ryc. 4,4a. Rozwój mieliny w podkorowej istocie białej u 3-tygodniowego kontrolnego królika i u objawowego mutantu. U królika pt intensywne zabarwienie podłoża i zwiększona glejoza komórkowa. Zmielinizowane włókna nieliczne, słabo widoczne. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 4,4a. Myelin development in subcortical white matter in 3-week normal rabbit and symptomatic mutant. In pt rabbit intensive staining of the background, increased cellular gliosis and few poorly visible myelinated fibers. Klüver—Barrera. × 100

zwierzęciem. U najmłodszych królików pt (10—14 dni życia) często nie stwierdza się obecności wykształconej mieliny lub obserwuje się tylko nieliczne słabo zmielinizowane włókna w tych strukturach, w których u normalnych królików mielinizacja jest już w pełnym toku. Podobne różnice spotyka się również u 3-tygodniowych mutantów zarówno w pniu mózgu i mózdzku, jak i w półkulach mózgu. W strukturach, które u normalnych królików wykazują w tym wieku zaawansowany rozwój mieliny, u objawowych mutantów często obserwuje się przede wszystkim intensywne zabarwienie podłoża i duże zagęszczenie komórek glejowych, natomiast zmielinizowane włókna są nieliczne, słabo zabarwione i widoczne dopiero w większych powiększeniach mikroskopowych (ryc. 4, 4a):

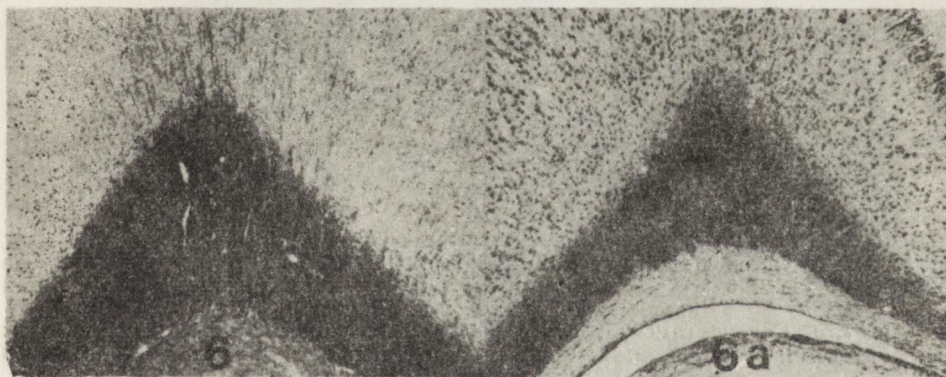
Mniejsza ilość zmielinizowanych włókien we wszystkich strukturach OUN, ich osłabiona i nierównomierna barwliwość oraz nieostre jakby „rozmywające się” kontury stanowią charakterystyczną cechę objawowych mutantów w wieku 1 miesiąca i starszych. Dotyczy to zarówno struktur pnia mózgu (ryc. 5, 5a) i mózdzku, jak i struktur kresomózgowia (ryc. 6, 6a), przy czym nasilenie nieprawidłowości w obrazie mieliny zmniejsza się wraz z postępowaniem mielinizacji.

U objawowych królików pt, podobnie jak w kontroli, rozwój osłonek mieliny wypredca glejoza mielinizacyjna. U normalnych królików



Ryc. 5,5a. Mielinizacja na poziomie mostu u kontrolnego królika i objawowego mutanta w wieku 6 tygodni. Heidenhain. Pow. 25 ×

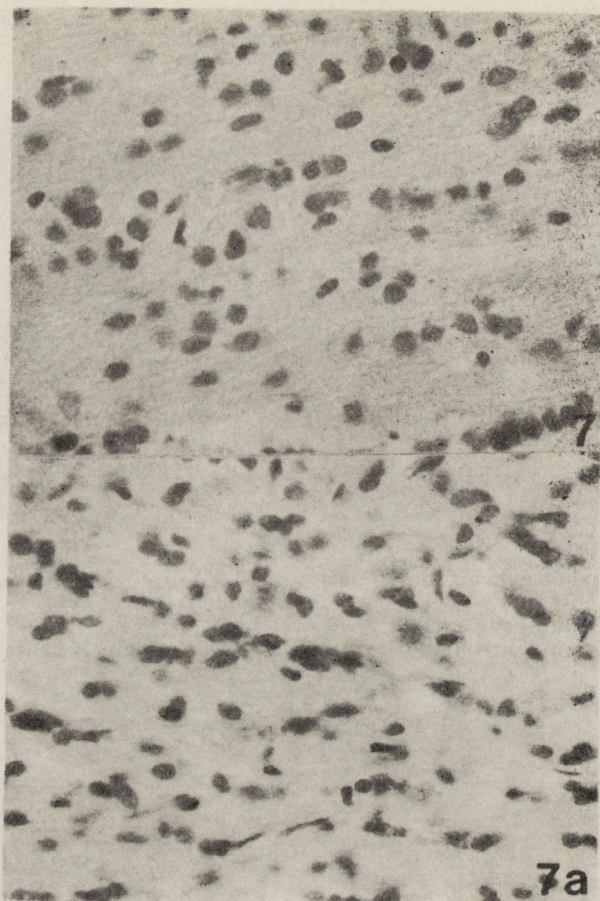
Fig. 5,5a. Myelin development in 6-week normal rabbit and in symptomatic mutant on the level of pons. Heidenhain. × 25



Ryc. 6,6a. Kontrolny królik 9-tygodniowy i objawowy pt. U mutanta słabiej zmielinizowana podkorowa istota biała, brak zmielinizowanych włókien w korze. Klüver—Barrera. Pow. 60 ×

Fig. 6,6a. 9-week control rabbit and symptomatic pt. Less advanced myelin development in subcortical white matter, lack of myelinated fibers in cerebral cortex of mutant brain. Klüver—Barrera. × 60

komórkowy obraz histologiczny, charakterystyczny dla dorosłych zwierząt, ustala się w różnym czasie w poszczególnych strukturach odpowiednio do zróżnicowanego okresu ich mielinizacji. U królików pt zagęszczenie gleju we wszystkich mielinizujących się strukturach jest większe i utrzymuje się dłużej niż u normalnych królików (ryc. 7, 7a). Wydaje się również, że u objawowych mutantów występuje większa liczba mniej zróżnicowanych komórek glejowych niż u zdrowych królików w tym samym wieku.



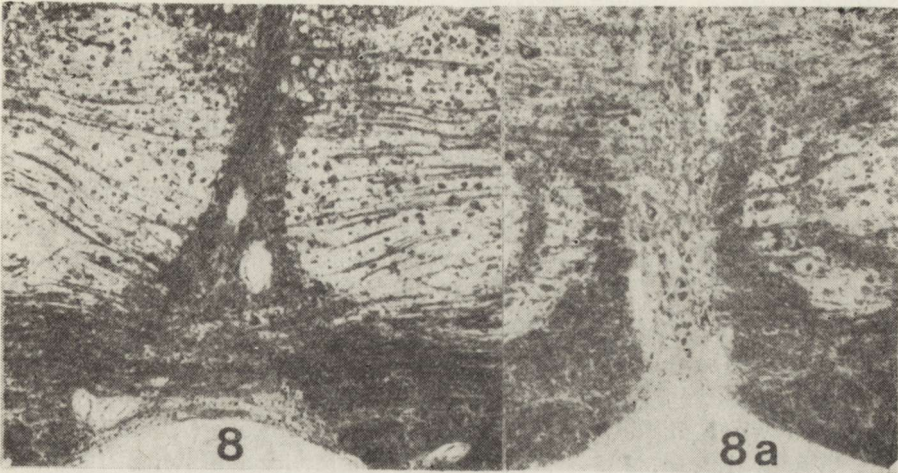
Ryc. 7,7a. Obraz gleju w spoidle wielkim u kontrolnego królika i objawowego mutantu w wieku 6 tyg. U królika pt większe zagęszczenie i nieregularny układ komórek glejowych. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 7,7a. Corpus callosum of control and pt rabbit 6-week of age. In pt increased cellular gliosis and irregular arrangement of glial cells. H—E. ×400

Zastosowane metody histochemiczne poza różnicami w nasileniu odczynu w podłożu i we włóknach oraz przesunięciami czasowymi odpowiednio do osłabionej i przedłużonej mielinizacji u królika pt nie wykazały innych nieprawidłowości.

Tylko w barwieniu Sudanem III i Sudanem czarnym B stwierdzono u niektórych objawowych mutantów obecność złogów sudanofilnych, występujących szczególnie licznie w istocie białej mózdzku i pojedynczo rozsianych w innych strukturach OUN. Zagadnienie to zostało szczegółowo przedstawione w odrębnej pracy, uwzględniającej również submikroskopową lokalizację materiału sudanofilnego u królika pt (Taraszewska 1983b).

Obraz mielinu u dorosłych mutantów z poprawą kliniczną po okresie



Ryc. 8,8a. Obraz mieliny w pniu mózgu u kontrolnego królika w wieku 14-miesiący i królika pt z poprawą kliniczną. Widoczne przejaśnienie mieliny i przerzedzenie włókien we wszystkich strukturach, najbardziej nasilone w obrębie tworu siatkowatego. Klüver—Barrera. Pow. 25 ×

Fig. 8,8a. Myelin staining on the level of brain stem in control rabbit and pt with clinical improvement, both 14 months of age. Diffuse slight myelin pallor and rarefaction of myelinated fibers accentuated within reticular formation. Klüver—Barrera. × 25

objawowym wykazuje stosunkowo niewielkie różnice w porównaniu z kontrolą. Ograniczają się one do zaznaczającej się redukcji istoty białej, mniej zbitego układu włókien i rozlanego, niewielkiego na ogół, przejaśnienia mieliny. U niektórych królików obserwuje się większe zblednięcia w obrębie długich dróg pnia mózgu, we włóknach tworu siatkowatego (ryc. 8, 8a), we wstędze przyśrodkowej oraz konarach mózgu, a przede wszystkim w istocie białej mózdzku.

OMÓWIENIE

Z przeprowadzonych badań wynika, że proces mielinizacji w mózgu objawowych królików pt przebiega nieprawidłowo; rozpoczyna się z opóźnieniem, charakteryzuje znacznie wolniejszym przyrostem mieliny oraz trwa dłużej niż u normalnych królików (Almeida, Pearse 1958; Wender i wsp. 1969). Nie prowadzi on również do pełnej mielinizacji OUN, takiej jaka charakteryzuje zdrowe zwierzęta. Opóźnionej i niepełnej mielinizacji towarzyszą zmiany w ultrastrukturze osłonek mielinowych (Taraszewska 1979, 1983a). Stanowią one przyczynę widocznej w mikroskopie świetlnym zmniejszonej i nierównej barwliwości zmielinizowanych włókien oraz ich nieostrych konturów.

Zróznicowanie nasilenia zmian w obrazie mieliny w zależności od przebiegu klinicznego i okresu choroby sugeruje bezpośredni związek zaburzonego procesu mielinizacji z fenotypową ekspresją mutacji pt.

Postępujący ciężki przebieg kliniczny rozwija się prawdopodobnie na podłożu największych zaburzeń w rozwoju mieliny, natomiast w przypadku mniej nasilonych nieprawidłowości objawy neurologiczne ulegają remisji. Taką możliwość sugeruje obraz mieliny u królików pt w późnym okresie rozwoju objawów klinicznych oraz u dorosłych mutantów z poprawą kliniczną. U tych ostatnich obraz mieliny tylko nieznacznie różni się od kontroli, zwłaszcza w przypadkach, w których nie obserwuje się dodatkowych przejaśnień mieliny rozwijających się prawdopodobnie w następstwie nakładania się wtórnych zmian zwyrodnieniowych (Taraszewska, Zelman 1981).

Warto ponadto podkreślić, że pojawienie się u królika pt pierwszych objawów klinicznych w postaci drżeń występuje w okresie odpowiadającym intensywnej mielinizacji u normalnych królików (Almeida, Pearse 1958; Wender i wsp. 1969; Dąbska, Danielewicz-Kotowicz 1978). Ponadto zrytmizowane drżenia nasilające się przy ruchach czynnych występują na początku drugiej dekady życia u wszystkich mutantów z hipomielinizacją, wyprzedzając inne objawy neurologiczne, najczęściej napady drgawkowe i/lub niedowłady kończyn (Hogan 1977; Guenet 1980).

We wczesnym okresie mielinogenezy występuje u zdrowego królika rozlane, delikatnie ziarniste zabarwienie podłoża. Jest ono widoczne w rutynowych barwieniach histologicznych, przede wszystkim jednak w barwieniach histochemicznych na fosfo- i glikolipidy. Wyprzedza ono rozwój osłonek mielinowych w poszczególnych strukturach i zanika w miarę pojawiania się wykształconej mieliny. U normalnych królików utrzymuje się najdłużej do końca 4 tygodnia życia (Almeida, Pearse 1958), natomiast u objawowych królików pt jest ono bardziej nasilone i widoczne u niektórych królików w 2, a nawet w 3 miesiącu życia, w zależności od nasilenia zaburzeń w procesie mielinizacji. Almeida i Pearse (1958) wiązali to zjawisko z przejściowym spichrzaniem lipidów w tkance przed ich wbudowaniem w osłonkę mielinową. W przypadku królika pt bardziej intensywne i dłużej utrzymujące się zabarwienie podłoża może wskazywać na niedostateczne wykorzystanie prekursorów lipidowych do syntezy błon mielinowych.

Przejściowa obecność materiału sudanofilnego we wczesnym okresie mielinizacji jest traktowana jako normalne zjawisko u człowieka i niektórych gatunków zwierząt, natomiast tego rodzaju złogów nie stwierdza się w mózgu królika, a także szczura i kota (Mickel, Gilles 1970). Można przypuszczać, że występowanie materiału sudanofilnego u objawowych królików pt jest związane z zaburzonym procesem mielinizacji. W badaniach mikroskopowo-elektronowych Taraszewska (1983b) ustaliła, że złogi sudanofilne zlokalizowane są w astrogliu i występują bez towarzyszącego zwyrodnienia osłonek mielinowych.

Opóźnionej i niepełnej mielinizacji u królika pt towarzyszy nadmier-
na i przedłużona glejoza mielinizacyjna. Zmiany w ultrastrukturze oli-

godendrocytów, sugerujące ich metaboliczną niewydolność (Taraszewska 1983a), mogą wskazywać na bezpośredni związek tych komórek z zaburzonym procesem mielinizacji, zwłaszcza że obwodowy układ nerwowy, przynajmniej na poziomie mikroskopu świetlnego, wydaje się prawidłowy.

Zaburzenia ilościowe i zróżnicowane zmiany submikroskopowe w populacji oligodendrocytów występują często u mutantów z hipomielinizacją. U myszy jimpy, którą charakteryzuje prawie całkowity brak mieliny w OUN i zmniejszanie się liczby zmielinizowanych włókien wraz z wiekiem zwierząt, stwierdzono redukcję liczby oligodendrocytów i nieprawidłowe dojrzewanie tych komórek (Farkas-Bargeton i wsp. 1972; Meier, Bischoff 1974), potwierdzone w warunkach hodowli tkankowej (Sandru i wsp. 1980). W przeciwieństwie do myszy jimpy u mutantu quaking obserwowano nadmierne zagęszczenie oligodendrocytów (Nagara, Suzuki 1981). Quaking wyróżnia ponadto mniejsze nasilenie zaburzeń w procesie mielinizacji, przyrost mieliny z wiekiem zwierząt oraz nieprawidłowości w obwodowym układzie nerwowym. Te ostatnie wskazują na udział zarówno oligodendrocytów, jak i komórek Schwanna w procesie nieprawidłowej mielinogenezy.

U królika pt zmiany w obrazie mieliny są mniej nasilone niż u myszy quaking, a nieprawidłowości w ultrastrukturze oligodendrocytów mają odmienny charakter (Taraszewska 1983a). Należy również uwzględnić, że nadmierna glejoza mielinizacyjna u mutantu pt może wynikać, przynajmniej częściowo, z redukcji istoty białej. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia wymaga dalszych badań. Zaburzenie mielinizacji u mutantu pt wydaje się ograniczone do ośrodkowego układu nerwowego, w związku z czym udział oligodendrocytów w ich rozwoju jest bardzo prawdopodobny. Wiadomo jednak, że w rozwoju mieliny uczestniczą również aksony i komórki nerwowe, chociaż ich rola w procesie mielinizacji jest mało poznana (Weinberg, Spencer 1976). U królika pt zmiany komórkowe neuronów ujawniają się przed wystąpieniem objawów klinicznych (Taraszewska, Osetowska 1975), a nasilają się i uogólniają w dalszym przebiegu choroby. Nie można również pominąć zmian w wypustkach osiowych, które u królika pt kształtują się odmiennie w ostrym i przewlekłym okresie procesu patologicznego. Badając poszczególne odcinki układu wzrokowego Sawicki (dane niepublikowane) stwierdził, że zmiany we włóknach nerwu wzrokowego rozwijają się z wyprzedzeniem w stosunku do zmian w komórkach zwojowych siatkówki. W okresie ostrym mają one charakter odcinkowego poszerzenia aksonów oraz ich obniżonej i niepełnej impregnacji, natomiast okres przewlekły charakteryzuje przede wszystkim przerzedzenie i drobnoziarnisty rozpad włókien.

Zmiany w aksonach w postaci ich odcinkowego obrzmienia i typowych sferoidów nie należą do rzadkości u mutantów z hipomielinizacją.

Występują one w sposób uogólniony u szczura md (Dentinger i wsp. 1982) oraz z wybiórczą lokalizacją w mózdzku i jego połączeniach u myszy quaking (Suzuki, Zagoren 1975). W obu przypadkach autorzy traktują je jako nieswoiste zmiany zwyrodnieniowe związane z zaburzeniem metabolizmu komórki nerwowej w następstwie nieprawidłowej mielinizacji włókien nerwowych.

Przy tak zróżnicowanych nieprawidłowościach morfologicznych, jakie obserwuje się u mutantu pt, ustalenie udziału poszczególnych elementów w procesie zaburzonej mielinizacji jest szczególnie trudne i wymaga dalszych ukierunkowanych oraz wielometodycznych badań.

Mutanty z zaburzonym procesem mielinizacji spotyka się u różnych zwierząt laboratoryjnych. Szczególnie często występują one u myszy (Hogan 1977; Guenet 1980) i są od wielu lat przedmiotem wielokierunkowych badań (Baumann 1980). Opisano również mutantu z hipomielinizacją u szczura rasy Wistar (Dentinger i wsp. 1982) oraz u prosiąt Landrace (Patterson i wsp. 1972). Z wyjątkiem myszy twicher, która jest analogiem leukodystrofii globoidalnej (Duchen i wsp. 1980), nie stanowią one modeli określonych zespołów kliniczno-patologicznych występujących u człowieka.

Z punktu widzenia patologii, mutanty z hipomielinizacją stanowią modele procesów określonych przez Posera (1978) jako zaburzenia dysmielinizacyjne. Podłoże patogenetyczne tego typu zaburzeń i mechanizm rozwoju są zróżnicowane zarówno u człowieka, jak i u zwierząt. W tej sytuacji mutanty stanowią bogaty materiał do badań nad patobiologią mielinogenezy i kontrolą procesu mielinizacji w normalnym układzie nerwowym.

ПАТОЛОГИЯ МИЕЛИНА У КРОЛИКА РТ

Резюме

Сопоставлено в оптическом микроскопе картину миеллина в мозгах полносимптомных кроликов рт в возрасте от 10 дней до 5 месяцев и кроликов рт в возрасте 1–3 лет с клиническим улучшением после симптоматического периода с бессимптомными кроликами рт и с нормальными здоровыми кроликами в том же самом возрасте.

В головных мозгах симптоматических кроликов рт в периоде развития констатировано замедление и продление процесса миелинизации и более медленный прирост миеллина, более отмеченный в филогенетически младших структурах центральной нервной системы, с сопутствующим чрезмерным и дольше удерживающимся миелинизационным глиозом. Не констатировано у мутанта суданофильных и метакроматических продуктов распада миеллина, зато в реакциях с фосфо- и глюколипидами наблюдалась в периоде миелинизации более интенсивная и дольше удерживающаяся окраска субстрата, которая может указывать на недостаточное использование липидных прекурсоров для синтеза миеллина. У взрослых кроликов рт с клиническим улучшением изменения в картине миеллина заключались в незначительном сокращении белого вещества, уменьшении густоты миелиновых волокон и в более слабой окрашиваемости оболочек.

Дифференциация интенсивности расстройств в картине миелина у кроликов pt в остром и хроническом периоде болезни подсказывает их непосредственную связь с фенотипичной клинической экспрессией мутации. Тяжелое прогрессирующее клиническое течение развивается вероятно на фоне самых больших расстройств при образовании оболочек. Эти расстройства менее интенсивны или подвергаются компенсации в случаях с клиническим улучшением.

С патологической точки зрения кролик pt является мутантом, у которого дисмиелинизационный процесс протекает иначе, чем у известных до настоящего времени мутантов с гипомиелинизацией, и не является он экспериментальной моделью ни одного из определенных болезненных синдромов у человека.

PATHOLOGY OF MYELIN IN PT RABBIT

Summary

Light microscopic evaluation of myelin in symptomatic pt rabbits aged from 10 days up to 5 months and in adult, 1—3 year old pt rabbits with clinical improvement, was performed in comparison with that of their unaffected litter mates and normal rabbits in the appropriate age.

In the developing pt rabbits delayed and prolonged myelination was found in all brain structures, being more pronounced in the phylogenetically younger areas. The abnormalities in myelin picture were accompanied by increased and prolonged myelination gliosis. Sudanophilic and metachromatic breakdown products were not a feature. Histochemical reactions for phospho- and glycolipids revealed diffuse staining of the background which was more intense and persisted longer in pt rabbits than in normal animals. This phenomenon may indicate an insufficient utilization of lipid precursors in the synthesis of myelin membranes.

Myelin in adult pt rabbits with clinical recovery exhibited only non remarkable white matter reduction, slightly decreased myelin staining and less compacted fibers arrangement. The various intensity of myelin abnormalities in animals with an acute and chronic course of the disease suggests the direct connection of the disturbed myelin development with phenotypic expression of the mutation. Severe progressive course of the disease leading to animals' death develops probably on the ground of the most pronounced abnormalities in myelin development. These abnormalities are less marked and at least partially reversible in cases with clinical improvement.

From pathological point of view pt rabbit is a mutant in which the dysmyelinating process seems to be different than in other mutants with affected myelination and does not imitate any of the defined clinico-pathological entity in human pathology.

PIŚMIENNICTWO

1. Almeida D. F., Pearse de, A.G.E.: Comparative histochemistry of lipids in relation to myelination in rabbit brain. *J. Neurochem.*, 1958, 3, 132—138.
2. Baumann N.: Neurological mutations affecting myelination. *INSERM Symp. No 14. Red. N. Baumann, Elsevier, Amsterdam 1980.*
3. Dąmbska M., Danielewicz-Kotowicz A.: Morphological study on myelination of some structures in rabbit brain. *Neuropat. Pol.*, 1978, 16, 203—218.
4. Dentinger M. P., Barron K. D., Csiza C. K.: Ultrastructure of the central nervous system in a myelin deficient rat. *J. Neurocytol.*, 1982, 11, 671—691.

5. Duchen L. W., Eicher E. M., Jacobs J. M., Scaravilli F., Teixeira F.: Hereditary leucodystrophy in the mouse: the new mutant twitcher. *Brain*, 1980, 103, 695—710.
6. Farkas-Bargeton E., Robain O., Mandel P.: Abnormal glial maturation in the white matter of jimpy mice. An optical study. *Acta neuropathol.*, (Berl.) 1972, 21, 272—281.
7. Guénet J. L.: Mutants of the mouse with an abnormal myelination: a review for geneticists. W: *Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symp. No 14. Red. N. Baumann, Elsevier, Amsterdam 1980, 11—21.*
8. Hogan E. L.: Animal models of genetic disorders of myelin. W: *Myelin. Red. P. Morell, Plenum Press, New York 1977, 489—520.*
9. Meier C., Bischoff A.: Dysmyelination in Jimpy mouse. *J. Neuropathol. exp. Neurol.*, 1974, 33, 343—353.
10. Mickel S., Gilles F. H.: Changes in glial cells during human telencephalic myelinogenesis. *Brain*, 1970, 93, 337—346.
11. Nagara H., Suzuki K.: Chronological study of oligodendroglial alterations and myelination in quaking mice. *Neuropath. appl. Neurobiol.*, 1981, 7, 135—149.
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. 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 hypomyelination. *J. Neurochem.*, 1972, 19, 2791—2799.
14. Poser C. M.: Dysmyelination revisited. *Arch. Neurol.*, 1978, 35, 401—408.
15. Sandru L., Siegrist H. P., Wiesmann U. N., Herschkowitz N.: Development of oligodendrocytes in jimpy brain cultures. W: *Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symp. No 14. Red. N. Baumann, Elsevier, Amsterdam 1980, 469—474.*
16. Seitelberger F., Vogel G., Stepan H.: Spätinfantile amaurotische Idiotie. *Arch. Psychiat. Ztsch. Neurol.*, 1957, 166, 154—190.
17. Suzuki K., Zagoren J. C.: Focal axonal swelling in cerebellum of Quaking mouse: light and electron microscopic studies. *Brain Res.*, 1975, 85, 38—43.
18. Taraszewska A.: Zmiany ultrastrukturalne w rdzeniu kręgowym u królika pt w okresie objawowym choroby. *Neuropat. Pol.*, 1979, 17, 19—37.
19. Taraszewska A.: Ocena zaburzeń w tworzeniu osłonek mielinowych u królika pt w oparciu o badanie mikroskopowo-elektronowe rdzenia kręgowego. *Neuropat. Pol.*, 1983 a, 21, 327—342.
20. Taraszewska A.: Sudanophilic deposits in astroglial cells in pt rabbit. 4th Hungarian-Polish Neuropath. Symp., Balatonszemes, May 8—10, 1983 b.
21. Taraszewska A., Osetowska E.: Zmiany w mózgu królika pt w okresie przedobjawowym. *Neuropat. Pol.*, 1975, 13, 283—290.
22. 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.
23. 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.
24. Wender M., Kozik M., Owsianowski M.: Histoenzymatic study of neuroglia during myelination of rabbit brain. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1969, 7, 135—150.

Adres autorek: Ośrodek Doświadczalny Neurologii Porównawczej CMD i K PAN, 05-300 Mińsk Mazowiecki, ul. Warszawska 126

LECH IWANOWSKI

MYELIN IN THE SENILE RAT BRAIN

Preliminary report

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

The aim of this study was observation of the fine structure of myelin sheath in the brains of old animals whose vessels showed senile changes (Iwanowski, Ostenda 1974).

MATERIAL AND METHODS

Eight Wistar rats of age from 26 to 36 months were examined. The control group consisted of 4 mature rats aged below 1 year. Myelin sheath was examined in the samples, where senile changes of terminal vascular net in routine light and electron microscopy examination have been found. The rats were perfused with 4% glutaraldehyde in pH 7.2 cacodylate buffer and decapitated. Brain tissue samples were taken from the areas of fronto-parietal cortex, hippocampus, lateral ventricle wall, corpus callosum, and griseum pontis. The samples for ultrastructural studies were handled routinely. The observations were performed under JEM 7A or Tesla 500 BS microscope.

RESULTS

Light microscopy showed perivascular pallor in specimens stained for myelin. This phenomenon was caused by removal of nerve fibers by perivascular fibrous gliosis. Early electron microscopic changes of myelin sheath consist in disintegration of the intraperiod line followed by formation of loops, vesicles (Fig. 1), and irregular multivesicular structures (Fig. 2). Some of vesicles were transparent, other filled with a granular electron dense substance. Occasionally the inner lamellae of myelin sheath protruded into the lumen, and in consequence spheroid



Fig. 1. Vesicles (p) formed in the myelin sheath are protruding towards axolemma (Ax). $\times 18\,000$

Ryc. 1. Rozwarstwiona osłonka tworzy pęcherzyki (p) wpuklające się do aksolemmy (Ax). Pow. $18\,000 \times$

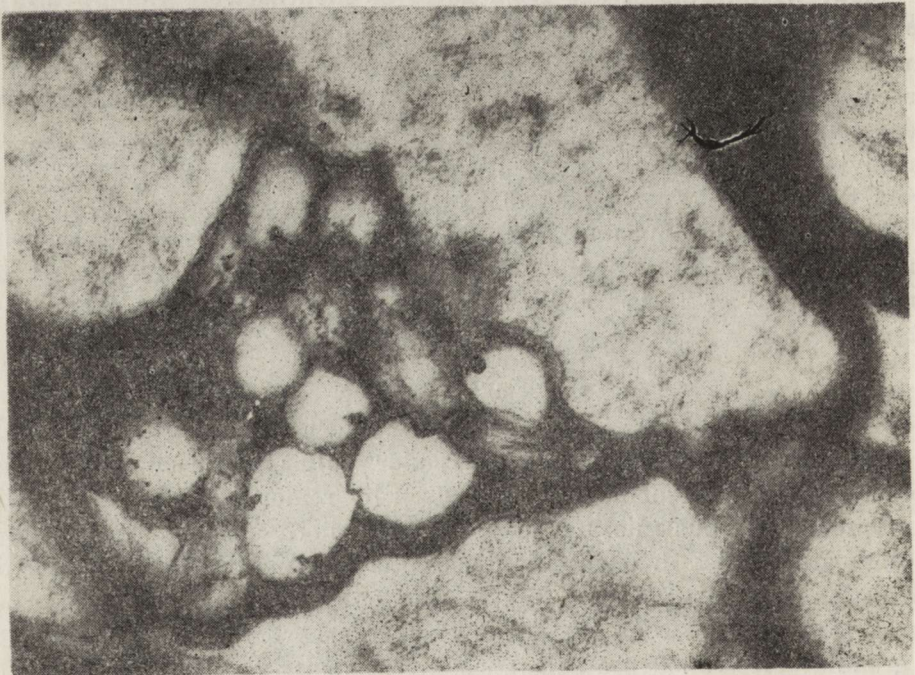


Fig. 2. Vesicles transformed into irregular multivesicular structure. $\times 24\,000$

Ryc. 2. Pęcherzyki przekształciły się w nieregularny twór wielopęcherzykowy, Pow. $24\,000 \times$



Fig. 3. Spheroid formation in protruded myelin sheath (S); axon (Ax). $\times 44\ 000$
Ryc. 3. Tworzenie się sferoidu w uwypuklonej osłonce mielinowej (S); włókno osiowe (Ax). Pow. $44\ 000 \times$

formations have been noted (Fig. 3). The changes in myelin sheaths were often accompanied by Wallerian degeneration of axons and vacuolar changes of oligodendrocytes. Lipid accumulation in the neuropil was often observed. Some pericytes showed phagocytic activity.

DISCUSSION

Degenerative changes of the myelin sheath both concomitant with an axon lesion and without a marked damage of the axon, were often observed in the brains of old rats. Some oligodendroglial changes are, according to Cook and Wiśniewski (1973), secondary and mainly phagocytic in relation to the primary axon lesion. The kinetics of myelin degeneration as observed in this study seems to be identical regardless of the primary location of the process, which seems to be gradual and slow. Easy splitting of the intraperiod line was raised by Hirano (1982), who evaluated the intraperiod line as a potential extracellular space. The myelin sheath degeneration of the above described type is known to occur in the brains of young animals, including newborn kittens (Berthold, Skolund 1968).

The incidence of Wallerian degeneration subsequently triggering transsynaptic changes (Wiśniewski et al. 1972) could be caused by vas-

cular changes in old brain (Wiśniewski, Terry 1973). As demonstrated in earlier studies (Iwanowski, Ostenda 1974) perivascular gliosis observed in light microscopic examinations is indicative of an increased permeability of vessel walls due to degenerative change. It may be hypothesized that vascular changes are the first factor causing axon damage and subsequent myelin degeneration. The etiology of the spheroid formation is still unknown. The spheroids were found in corpus callosum, but brain stem and spinal cord were not examined in this study. The author observed no formation of spheroids in other old animals examined, like dogs, cats and rabbits (Iwanowski 1980). All described changes of myelin observed in the brain of senile rats are nonspecific.

OBRAZ MIELINY MÓZGOWEJ STARYCH SZCZURÓW

Doniesienie wstępne

Streszczenie

W pracy oceniono ultrastrukturę zmian w osłonce mielinowej u 8 szczurów rasy Wistar w wieku od 2 lat i 2 miesięcy do 3 lat. U zwierząt tych stwierdzono zmiany zwyrodnieniowe ścian naczyń prowadzące do zwiększenia ich przepuszczalności. Zmiany te przebiegały w stałej kolejności, zaczynając się od rozwarstwienia linii śródokresowej i prowadząc do powstawania pęcherzyków, a następnie nieregularnych tworów wielopęcherzykowych. Zmianom w osłonce często towarzyszyło uszkodzenie aksonu i zmiany w oligodendrocytach. Obserwowano także tworzenie się sferoidów w zwyrodniałej osłonce.

Autor sugeruje, że uszkodzenie mielinu u zwierząt starych jest nieswoiste i występuje w następstwie zmian naczyniowych, które powodują zmiany osiowe we włóknach nerwowych z wtórną demielinizacją.

КАРТИНА ГОЛОВНОМОЗГОВОГО МИЕЛИНА СТАРЫХ КРЫС

Предварительное сообщение

Резюме

С целью прослежения ультраструктуры изменений в миелиновой оболочке головного мозга старых животных обследовано 8 крыс расы Вистар в возрасте от 2 лет и 2 месяцев до 3 лет. У тех же самых животных констатировано дегенеративные изменения стенок сосудов ведущие к увеличению их проницаемости. Изменения протекали в постоянной очередности, начиная от расслоения интрапериодичной линии, приводя к возникновению пузырьков, а затем нерегулярных многопузырьковых образований. Изменениям в оболочке часто сопутствовало повреждение аксона и изменения в олигодендроцитах. Автор наблюдал также образование сфероидов в слущивающейся оболочке. Автор наводит на мысль, что повреждение миелина у старых животных неспецифично и выступает вследствие сосудистых изменений, которые вызывают изменения аксиально в нервных волокнах с вторичной демиелинизацией.

REFERENCES

1. Berthold C. H., Skolund S.: Ultrastructure of postnatally developing feline peripheral nodes of Ranvier. *Acta Soc. Med. Ups.*, 1968, 73, 145—166.
2. Cook R. D., Wiśniewski H. M.: The role of oligodendroglia and astroglia in Wallerian degeneration of the optic nerve. *Brain Res.*, 1973, 61, 191—206.
3. Hirano A.: Myelin-associated extracellular spaces. IXth Int. Congress of Neuropath., Vienna, 5—10 Sept. 1982. Abstracts p. 43.
4. Iwanowski L.: Rola zmian w naczyniach i spłocie naczyniówkowym w procesie starzenia się mózgu. *Warszawska Akademia Medyczna*, Warszawa 1980.
5. Iwanowski L., Ostenda M.: Ultrastructural changes in the brain capillaries of old rats. *Alterns veränderungen des Zentralnervensystems. Material der 4 Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropathologie der DDR. Mühlhausen (Thür)*, 1974, 121—122.
6. Wiśniewski H. M., Ghetti B., Horoupian D. S.: The fate of synaptic membranes of degenerating optic nerve terminals, and their role in the mechanism of transsynaptic changes. *J. Neurocytol.*, 1972, 1, 297—310.
7. Wiśniewski H. M., Terry R. D.: Morphology of the aging brain, human and animal. *Progr. Brain Res.*, 1973, 40, 167—186.

Author's address: Laboratory of Developmental Neuropathology, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Pasteura Str., 02-093 Warszawa

DARIUSZ ADAMEK, JÓZEF KAŁUŻA, WITOLD MIEŻYŃSKI, TADEUSZ MAŁEK

OSŁONIAKI ZŁOŚLIWE (*SCHWANNOMA MALIGNUM*) U DZIECI PATOMORFOLOGIA I EPIKRYZA KLINICZNA *

Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologii, Kraków
Pracownia Patologii i Klinika Chirurgiczna Instytutu Pediatrii AM, Kraków

Oślioniak złośliwy (*schwannoma malignum*) jest guzem rzadko występującym. Potwierdzają to doniesienia dotyczące w większości pojedynczych przypadków (Ashley, Wilson 1970; Krawczykowa i wsp. 1970; Grabski 1973; Alvira i wsp. 1976) i tylko nieliczne opracowania oparte są na większych zbiorach nowotworów. Najliczniejsze zbiory opracowali Ghosh i wsp. (1973) — 115 przypadków, D'Agostino i wsp. (1963a) — 24 przypadki, White (1971) — 15 przypadków. Erlandson i Woodruff (1982) — 10 przypadków, Ingels i wsp. (1971) opracowali łącznie 94 przypadki opisane uprzednio w piśmiennictwie, dodając do nich 2 własne. Ze-stawienie Trojanowskiego i wsp. (1980), w którym nie ma ani jednego przypadku nowotworu w wieku dziecięcym, przemawia za bardzo rzadkim występowaniem osłoniaków złośliwych również u dzieci.

Rzadkie występowanie tych guzów, trudności w ustaleniu kryteriów oceny ich złośliwości i trwające nadal rozważania na temat ich pochodzenia tkankowego (np. Sobel i wsp. 1973) sugerują, że *schwannoma malignum* i *myoblastoma granulocellulare* pochodzą z niezróżnicowanych komórek fibroblastopodobnych i uzasadniają opis tych nowotworów w oparciu o obserwowane przypadki własne.

MATERIAŁ I METODY

Zbiór nasz obejmuje 5 przypadków, dotyczących chorych w wieku od 2 miesięcy do 7 lat. Dwoje dzieci było płci męskiej, a 3 — płci żeńskiej. Szczególną uwagę chcielibyśmy zwrócić na przypadki 1 i 2, w których guzy były zlokalizowane w oczodole (przypadek 1) lub w gałce ocznej (przypadek 2). Pozostałe trzy guzy były umiejscowione następu-

* Część pracy została przedstawiona na posiedzeniu Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich w kwietniu 1982 r.

Tabela 1. Podstawowe dane kliniczne i cechy makroskopowe guza
Table 1. Basic clinical data and macroscopic features of the tumors

Przypadek i nr badania histopatologicznego Case and No of histopathological examination	Wiek Age	Płeć Sex	Umiejscowienie guza Localization of the tumor	Cechy makroskopowe guza Macroscopic features of the tumor	Makroskopowy związek z nerwem Macroscopic relation of the tumor with the nerve
1 A. P. 777 749	2 m-ce 2 months	M	pozagątkowo, w prawym oczodole behind the eyeball in the right orbit	guz o gładkiej powierzchni, dość twardy, wypełniał znaczną część oczodołu the tumor had a smooth surface, was fairly hard, and occupied the most of the orbit	niepewny uncertain
2 A. P. 772 462	2 lata 2 years	Ż F	wewnątrzgałkowy, wypełniał część komory ciała szklanego w pobliżu tarczy nerwu wzrokowego (ryc. 1) inside the eyeball, invaded the posterior part of the vitreous body at the vicinity of the optic disc (Fig. 1)	guz dobrze odgraniczony, dość twardy, o kilkumilimetrowej średnicy the tumor was very well delineated from the surroundings, of hard consistency, few millimeters of diameter	dobrze widoczny związek z nerwem wzrokowym very well visible connection with the optic nerve

		2,5 roku	M	guz lewego uda, nerwu kulszowego i lewego pośladka	guz nie wykazujący wyraźnej granicy w stosunku do otoczenia, o charakterze rozlanego nacieku, w okolicy biodrowej lewej	dolny biegun guza na udzie był ściśle związany z nerwem kulszowym
3	I. P.	19 504				
		19 754				
		21 370	2,5 year	M	on the left thigh, ischiadic nerve and on the left buttock	the tumor did not show good delineation from the surroundings, infiltrated diffusely the left iliac region
			7 lat	Ż	dystalna część podudzia lewego na poziomie nasad dolnych, częściowo zachodziła na staw skokowy (ryc. 2)	guz bez wyraźnej granicy, naciekał otaczające tkanki. Na przekrojach widoczne były ogniska martwicy
4	I. P.	19 806				
		21 021	7 years	F	in the distal part of the sh:nk partially invading the calcaneal region (Fig. 2)	the tumor did not show delineation from the surroundings. On transverse sections necroses were present
		21 030				
			7 lat	Ż	śródpiersie tylne po stronie lewej	związek z nerwem trudny do ustalenia w czasie zabiegu operacyjnego
5	I. P.	22 682	7 years	F	posterior mediastinum on the left side	guz dobrze odgraniczony, posiadający pseudotorebkę, białoszary, włóknisty, twardy, ogniskowo martwicy
					the tumor was well defined by a pseudocapsule. On section white-greyish hard, fibrotic, focally necrotic	związek z nerwem niepewny, ale szypuła guza wychodziła z III przestrzeni międzyżebrowej
						the connection with the nerve uncertain, but the footstalk grew out from the III intercostal space

jąco: dwa na kończynach dolnych, jeden w śródpiersiu tylnym w łączności z nerwem międzyżebrowym. Podstawowe dane kliniczne i cechy makroskopowe guzów w poszczególnych przypadkach przedstawiono w tabeli 1.

Materiał pobrany w czasie zabiegów operacyjnych utrwalano w formalinie i w sposób rutynowy zatapiano w parafinie. Z materiału tego sporządzano standardowe preparaty, które barwiono H—E i Tri-chromem według Massona; wybrane skrawki barwiono według metody Klüvera—Barrery i impregnowano według metody Perdrau'a. Obserwacje przeprowadzono w mikroskopie świetlnym. Materiał pochodzący z przypadku 3 i 5 badano również przy pomocy mikroskopu elektronowego. Badania te wykonano w Samodzielnej Pracowni Mikroskopii Elektronowej Instytutu Pediatrii AM w Krakowie (kierownik doc. dr hab. F. Kaczmarek). Wycinki przeznaczone do badania w ME utrwalano w 3,5% aldehydzie glutarowym w buforze kakodylowym przez 2 godz.



Ryc. 1. Przypadek 2. Przekrój przez gałkę oczną. W przedłużeniu nerwu wzrokowego guz wpuklający się do ciała szklanego. Pow. 25 ×

Fig. 1. Case 2. Transverse section through the eyeball. Along the axis of the optic nerve a tumor outgrowing from the optic nerve into the vitreous body. × 25

Ryc. 2. Przypadek 4. Guz podudzia. Szczypcami trzymany jest nerw strzałkowy. Widoczny makroskopowy stosunek guza do nerwu

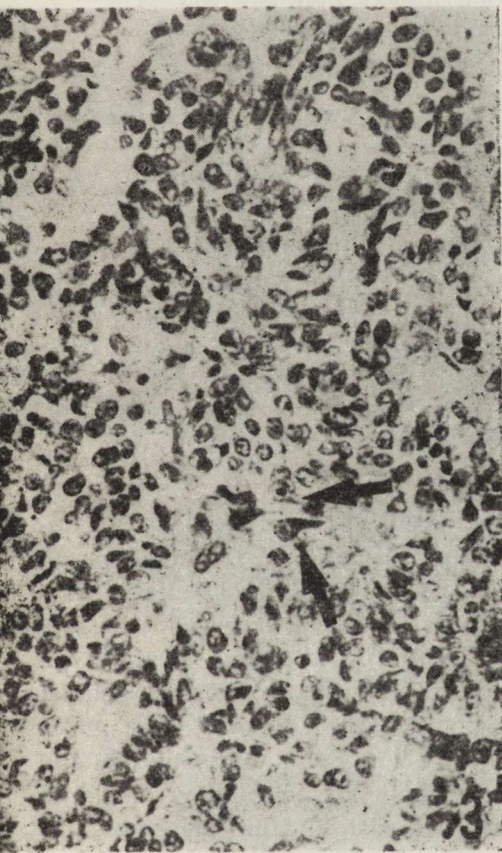
Fig. 2. Case 4. Tumor of the shin. The peroneal nerve is kept with the forceps. The relation of the tumor with the nerve is macroscopically illustrated

oraz w 10% czterotlenku osmu przez 2 godz. i odwadniano w alkoholach o wzrastających stężeniach. Zatapiano je następnie w Eponie 812, krojono na ultramikrotomie Porter-Blooma i oglądano w mikroskopie elektronowym Philipsa EM 300.

OPIS PRZYPADKÓW

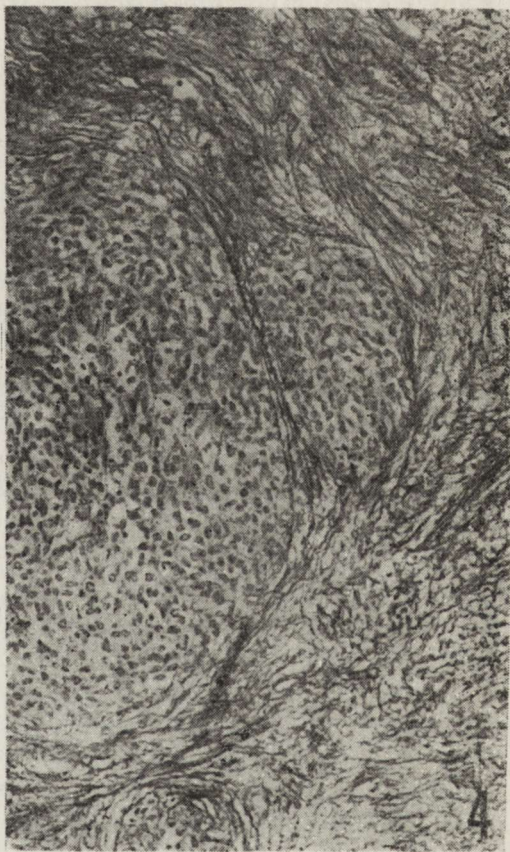
Przypadek 1

Chory P.K. 2 miesiące, przyjęty do Kliniki Laryngologicznej AM w Krakowie. Badaniem przedmiotowym stwierdzono: wytrzeszcz prawej gałki ocznej, gałka oczna nieruchoma, źrenica szeroka, bez reakcji na światło, z obrzękiem spojówki gałkowej górnej i dolnej.



Ryc. 3. Przypadek 1. Utkanie guza z tendencją do tworzenia rozet. Komórki podobne do komórek zwojowych z cechami atypii. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 3. Case 1. Tumor tissue showing the tendency to rosette formation. The cells with an appearance of ganglion-cell with marked atypia. H—E. × 200



Ryc. 4. Przypadek 1. Pęczki włókien srebrochłonnych o równoległym przebiegu oddzielają części nowotworu, które podobne są do nerwu obwodowego z cechami przerostu. Impregnacja metodą Perdrau'a. Pow. 200 ×

Fig. 4. Case 1. Parallely arranged bundles of reticulin fibers separate fragments of the neoplasm, showing the appearance of hypertrophied peripheral nerve. Impregnation after Perdrau. × 200

Z wywiadu wiadomo, iż wytrzeszcz występował od urodzenia dziecka. Rozwój dziecka był poza tym prawidłowy. Obraz rtg przemawiał za guzem wewnątrzoczdolowym. W czasie zabiegu operacyjnego znaleziono guz o powierzchni gładkiej, dość twardy, zajmujący znaczną część oczodołu i za pomocą szypuły łączący się poprzez *foramen opticum* i *fissura orbitalis superior* z częścią guza znajdującą się w jamie czaszki. Usunięto w całości oczodolową część guza wraz z szypułą. Histologicznie stwierdzono bogatokomórkowe utkanie guza ze znacznym pleomorfizmem jąder, licznymi układami przeplatających się pęczków komórek, które niekiedy przypominały przecięte pęczki nerwowe. W utkaniu guza znajdowały się również struktury neuroepitelialne (ryc. 3). Mitozy występowały ze średnią częstością 1/HPV. Metody impregnacyjne ujawniły dość gęstą, niecharakterystyczną sieć włókien srebrochłonnych (ryc. 4).

Przypadek 2

Chora K.K., 2 lata, operowana była w Klinice Okulistycznej AM w Krakowie, gdzie wykonano enukleację gałki ocznej z powodu wewnątrzgałkowego nowotworu. Klinicznie podejrzewano guz o typie *retinoblastoma*. W drobnym, kilkumilimetrowej średnicy, dość twardym guzku łączącym się z nerwem wzrokowym i siatkówką, stwierdzono monotonne utkanie bogatokomórkowego nowotworu o niezbyt dużym pleomorfizmie jąder i ciał komórkowych, o jądrach okrągłych z pojedynczymi figurami mitotycznymi (ryc. 5) i jasnej, skąpej cytoplazmie. Impregnacja srebrowa utkania była ujemna.

Przypadek 3

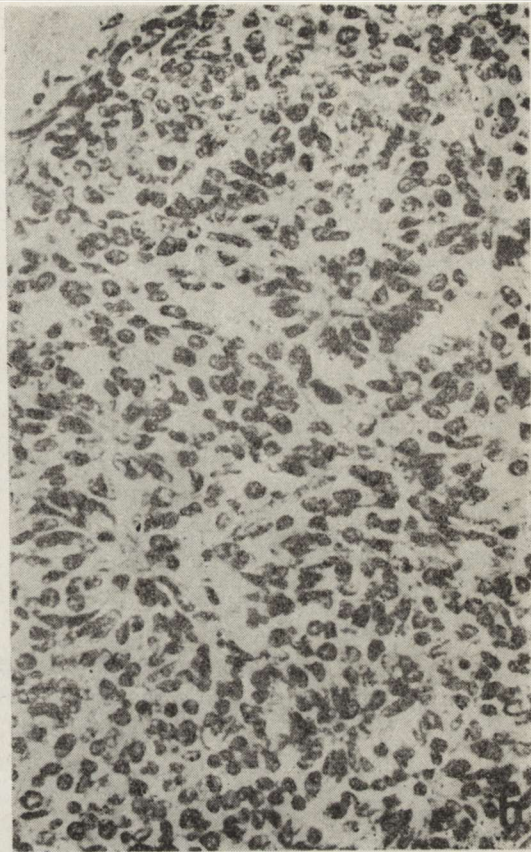
Chory S.S., 2,5 roku. Początkowo leczony w szpitalu rejonowym, gdzie w całości usunięto guz poślodka lewego rozpoznany histologicznie jako *neoplasma malignum nonepitheliale*. Dalsze leczenie prowadzono w Klinice Chirurgii Dziecięcej Instytutu Pediatrii AM w Krakowie. Zastosowano napromienianie rtg (4 500 r) i chemioterapię (winkrystyna, aktynomycyna D, cyklofosfamid). W trakcie leczenia, po 1,5 roku od pierwszego zabiegu, wystąpiła wznowa nowotworu w postaci guza grzbietowej powierzchni uda, w połowie jego długości oraz guzowatego, wrzecionowatego powiększenia nerwu kulszowego. Wykonano powtórny zabieg operacyjny (*discissio perineuri*) i pobrano wycinek do badania histopatologicznego. Po ponownym zastosowaniu napromieniania i chemioterapii nastąpiła regresja guza. W 28 miesiącu stwierdzono wznowę nowotworu na udzie. W związku z tym wykonano amputację kończyny na wysokości uda. W okresie pooperacyjnym wykryto wznowę guza na pośladku. W 38 miesiącu leczenia stwierdzono wielogniskowe przerzuty do płuc. Zastosowana terapia z użyciem Cis-platin i VM-26 nie przyniosła wyników.

Histologiczny obraz nowotworu (materiał pobrany ze wznowy) był



Ryc. 5. Przypadek 2. Styk nowotworu z siatkówką. Komórki nowotworu otaczają gniazdo komórek zawierających melaninę. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 5. Case 2. Contact of the tumor with the retina. The tumor cells surround an island of cells containing melanin. H—E. × 200



Ryc. 6. Przypadek 3. Utkanie nowotworu z tworzeniem struktur rozetowych. H—E. Pow. 200 ×

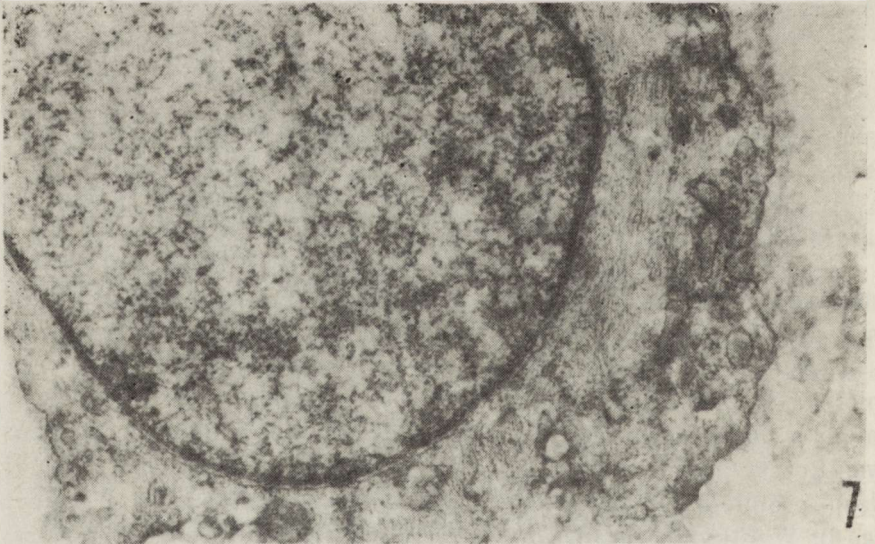
Fig. 6. Case 3. Tumor tissue with rosette-like structures. H—E. × 200

następujący: nowotwór bogatokomórkowy, znacznego stopnia pleomorfizm i atypia jąder i ciał komórkowych, liczne figury mitotyczne (średnio 2—3/1 HPV). Często stwierdzano obrazy przeplatających się ławic komórek. Niekiedy spotykano układy podobne do palisad. W niektórych miejscach nowotwór tworzył mniej lub bardziej regularne układy rozetowe. Rozety miały homogenne, eozynochłonne centrum lub tworzyły rodzaj promienistej struktury z centralnym pierścieniem wewnątrz (ryc. 6). W utkaniu nowotworu występowały ponadto struktury przypominające pęczki nerwowe. Wchodziły one w skład pseudotorebek oplatających gniazda nacieku nowotworowego, który w wielu miejscach wnikał w nie i rozrastał się wśród nich. W nowotworze spotykano pola martwicy i drobne nacieki limfocytów. Metodą impregnacyjną wykazano

dość liczne włókna srebrochłonne, w większości oplatające gniazda komórek nowotworowych, a niekiedy układające się w równoległe pasma pośród komórek nowotworu. W badaniu ME stwierdzono, iż guz złożony był z komórek o dużych, jasnych jądrach z drobnoziarnistą, rozproszoną chromatyną i wąskim rąbkem cytoplazmy, w której znajdowały się włókna zbliżone do gliofilamentów (ryc. 7). W niektórych komórkach, oprócz wyżej opisanych cech, stwierdzano liczne polirybosomy, pojedyncze mitochondria i nieciągłą błonę podstawną (ryc. 8).

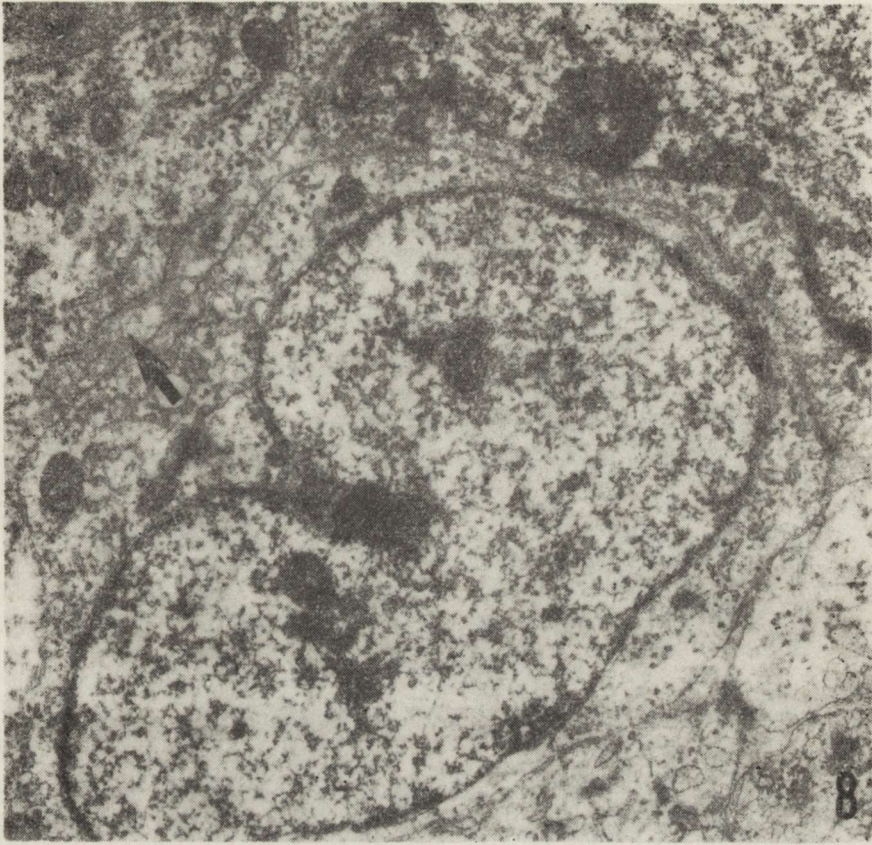
Przypadek 4

Chora B.B., 7 lat, leczona w Klinice Chirurgii Dziecięcej Instytutu Pediatrii AM w Krakowie, gdzie początkowo rozpoznano guz dystalnej części podudzia lewego umiejscowiony w okolicy ścięgna Achillesa. Guz miał średnicę 5 cm. W wywiadzie ustalono, że pogrubienie obrysów dystalnej części podudzia pojawiło się przed kilkoma miesiącami. Operacyjnie stwierdzono rozpadający się guz. W pobranym do badania histologicznego wycinku rozpoznano: *neoplasma malignum non-epitheliale*. Wobec braku zgody rodziców na zaproponowaną amputację, rozpoczęto leczenie promieniami rtg i chemioterapię (winkrystyna, cyklofosfamid, aktynomycyna D) kontynuowaną przez 2 lata. Uzyskano remisję, jednak po 32 miesiącach od rozpoczęcia leczenia stwierdzono miejscową wznowę nowotworu. Ponownie zastosowano leczenie promieniami jonizującymi (Co 2400 r i MeV 1500 r) i chemioterapię, uzyskując re-



Ryc. 7. Przypadek 3. Komórka o jasnym jądrze i wąskim rąbku cytoplazmy z licznymi delikatnymi włóknkami gliofibrylopodobnymi. Pow. 14 000 \times

Fig. 7. Case 3. Cell with clear nucleus and a narrow rim of cytoplasm with numerous gliofilament-like structures. \times 14 000

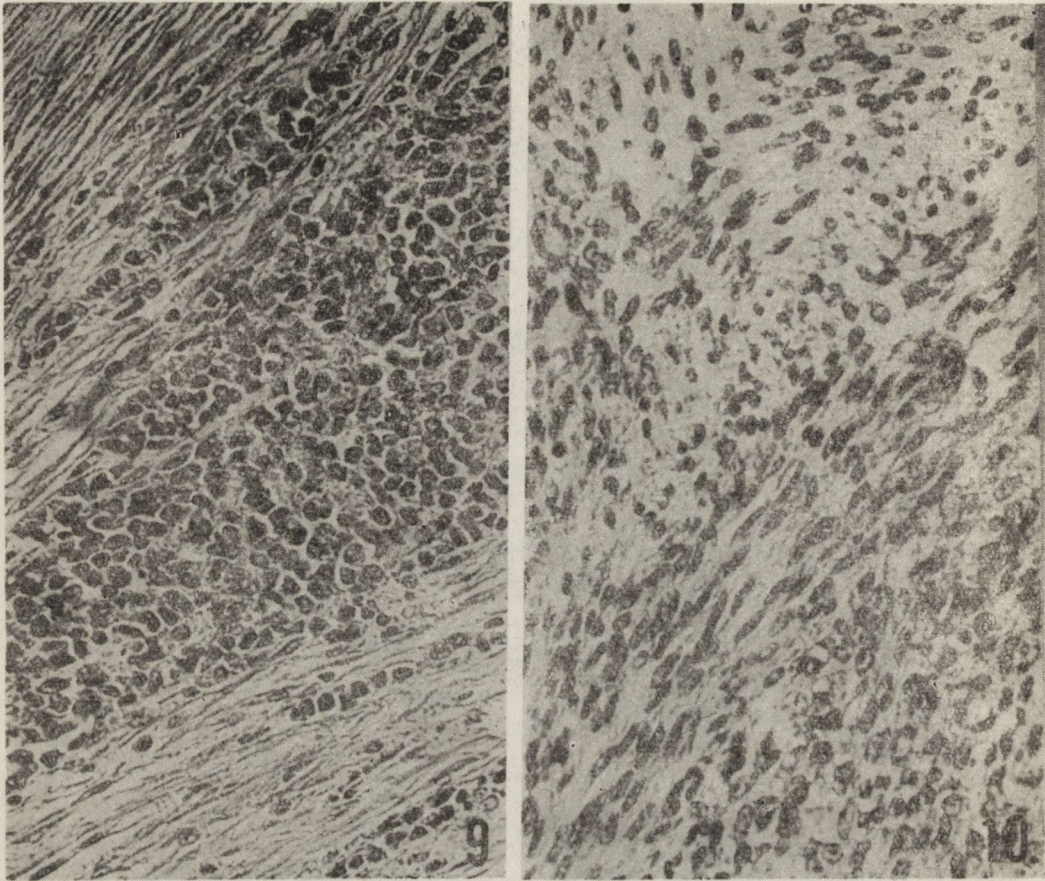


Ryc. 8. Przypadek 3. Komórki o jasnych jądrach z rozproszoną chromatyną i wyraźnymi jąderkami. W cytoplazmie widoczne są liczne polirybosomy oraz pojedyncze mitochondria i zbiorniki szorstkiej siateczki śródplazmatycznej. Komórki otoczone są nieciągłą błoną podstawną. Pow. 14 000 ×

Fig. 8. Case 3. Cells with clear nuclei containing fine dispersed chromatin and distinct nucleoli. In the cytoplasm numerous polyribosomes and a few mitochondria and cisterns of the rough endoplasmic reticulum are visible. The cells show basal membrane discontinuity. × 14 000

misję. W 45 miesiącu od rozpoczęcia leczenia przerwano chemioterapię z powodu wirusowego zapalenia wątroby (typ B). W 55 miesiącu leczenia ponownie stwierdzono wznowę guza, potwierdzoną histologicznie w materiale pobranym drogą punkcji cienkoigłowej. Wykonano amputację podudzia na wysokości 1/3 proksymalnej. Po 63 miesiącach od rozpoczęcia leczenia stwierdzono przerzuty do płuc i kości udowej lewej. Zastosowano napromienianie płuc i lewego uda oraz wznowiono chemioterapię (Cis-platin, VM-26, CCNU).

Badaniem histologicznym guza stwierdzono: utkanie bogatokomórkowe, znaczny polimorfizm jąder komórkowych. W nacieku nowotworowym dominowały układy przeplatających się pęczków wrzecionowatych



Ryc. 9. Przypadek 4. Rozrost nowotworu wzdłuż przebiegu włókien nerwowych o typie wzrostu międzypęczkowego. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 9. Case 4. The infiltrative growth of the tumor along the nerve fibers in a form of interfascicular invasion. H—E. × 200

Ryc. 10. Przypadek 4. Ławicowy układ komórek umiarkowanie izomorficznych z tendencją do tworzenia wirów, zacierany jest przez zaznaczający się polimorfizm komórek i jąder z pojawianiem się figur podziałowych. H—E. Pow. 200 ×

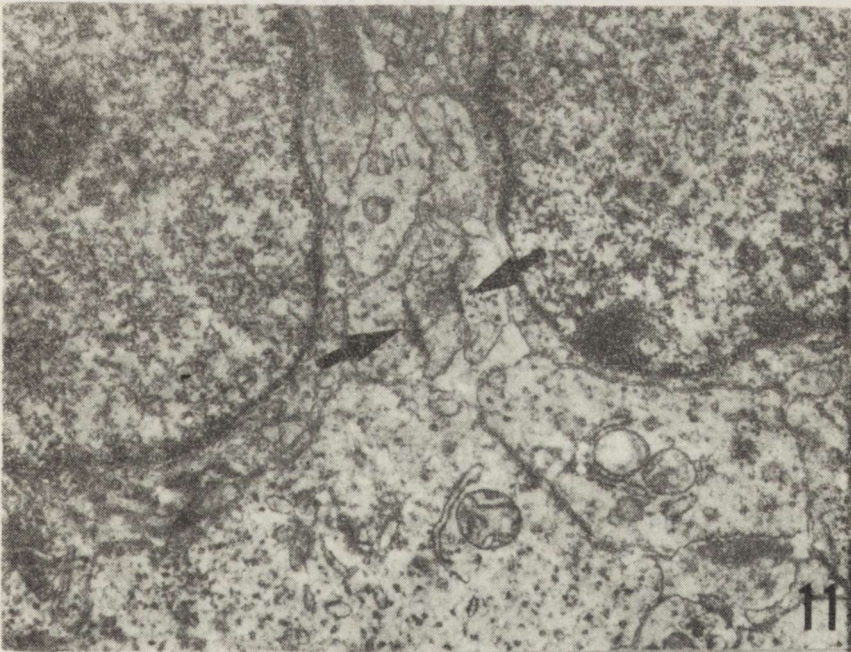
Fig. 10. Case 4. The bank-like appearance of the relatively isomorphic cells with tendency to whorls formation is obliterated by the enhanced polymorphism of the cells and nuclei with mitotic figures. H—E. × 200

komórek. Utkanie przybierało niekiedy cechy bardzo upodabniające je do obrazów typowych dla łagodnego osłoniaka (ryc. 10), jednak wszędzie widoczne były histologiczne cechy złośliwości nowotworu, m.in. figury mitotyczne spotykane średnio z częstością 1—2 HPV. Występował również naciekowy rozrost nowotworu wzdłuż pęczków nerwowych (ryc. 9). W wielu miejscach zwracała uwagę wzmożona eozynofilia komórek nowotworowych. Impregnacja srebrowa była ujemna. Spotykano obszary martwicy.

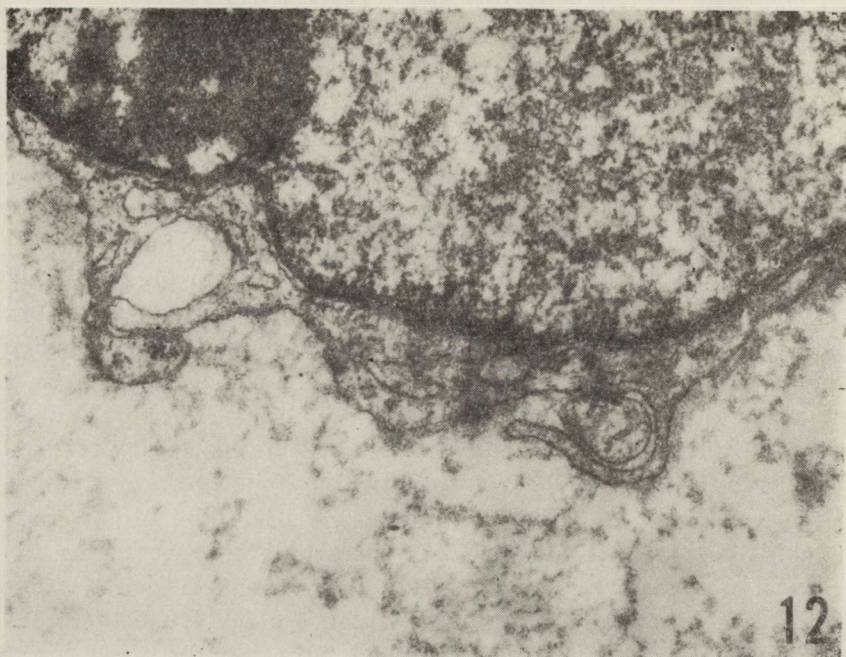
Przypadek 5

Chora M.A., 7 lat. Dwa tygodnie przed przyjęciem do Instytutu Pediatrii matka zauważyła opadanie powieki górnej lewej. Dwa miesiące przed przyjęciem do Instytutu dziecko chorowało na świnkę i od tego czasu było senne i osłabione. W Klinice Chirurgii Dziecięcej Instytutu Pediatrii AM w Krakowie stwierdzono powiększenie obwodu głowy, zespół Hornera po stronie lewej, na skórze liczne plamiste przebarwienia koloru mlecznej kawy o średnicy do 3 cm oraz uwypuklenie lewej okolicy nadobojczykowej. Badania radiologiczne wykazały guz śródpiersia tylnego o średnicy około 6 cm, uciskający od góry lewe płuco. Kręgi, otwory międzykręgowe oraz żebra nie wykazywały zmian. Zdjęcia rtg czaszki wykazały wodogłowie wewnętrzne. U chorej wykonano lewostronną torakotomię i w całości wyłuszczone guz leżący pod opłucną ścienną, szypułą związany z III przestrzenią międzyżebrową. Guz miał kształt gruszkowaty. Jego wymiary wynosiły $8 \times 5 \times 4$ cm. Był twardu, włóknisty, barwy białoszarej. Powierzchnia zewnętrzna guza była gładka. Na przekrojach widoczne były liczne ogniska martwiczo-krwotoczne. Przebieg pooperacyjny bez powikłań. Po zabiegu podjęto chemioterapię (aktynomycyna D, winkrystyna, cyklofosfamid).

Badanie histologiczne guza: nowotwór bogatokomórkowy, komórki



Ryc. 11. Przypadek 5. Przekrój przez wypustki cytoplazmatyczne komórek nowotworu. Pomiędzy wypustkami połączenia desmosomopodobne. Pow. $12\ 870 \times$
 Fig. 11. Case 5. Section through the cytoplasmic processes of neoplastic cells. Between the cell processes desmosome-like junctions are visible. $\times 12\ 870$



Ryc. 12. Przypadek 5. Fragment komórki nowotworu z przekrojami podłużnymi wypustek cytoplazmatycznych. Pomiędzy wypustką a komórką połączenie desmosomopodobne. Pow. 32 000 ×

Fig. 12. Case 5. Fragment of the neoplastic cell with longitudinal transection of the cell processes. Between the cell and the processes desmosome-like junctions are present. × 32 000

najczęściej wydłużone, znaczny polimorfizm jąder, bardzo liczne mitozy 8—9/HPV. W utkaniu nowotworu dominowały przeplatające się ławice lub pęczki komórek. Miejscami architektonika guza wyraźnie przypominała utkanie łagodnego osłoniaka. Przeważało jednak bezładne rozmieszczenie komórek, wzrost ich barwności i atypia jąder. Często spostrzegano zmiany martwicze i krwotoczne oraz nacieki komórek limfocytoidalnych. Badanie histopatologiczne wykazało, że punktem wyjścia nowotworu był zwój międzykręgowy, o czym wnioskowano na podstawie wykazania wspólnej otoczki (torebki?) łącznotkankowej dla zwoju i nowotworu. W nacieku nowotworowym znajdowała się także struktura mogąca przypominać przerośnięty, zwyrodniały nerw — zmianę często wykrywaną w *neurofibroma plexiforme*. Może to przemawiać za zezłościwieniem poprzednio istniejącego nerwiako-włókniaka splotowatego. W badaniu mikroskopowo-elektronowym stwierdzono obecność licznych komórek o pofałdowanej powierzchni z licznymi wypustkami, pomiędzy którymi znajdowały się styki desmosomopodobne (ryc. 11). Tego samego rodzaju styki obserwowano między komórkami nowotworu a wypustkami sąsiednich komórek (ryc. 12).

Rodzaj leczenia oraz istotniejsze elementy przebiegu klinicznego wszystkich 5 przypadków przedstawiono zbiorczo w tabeli 2.

Tablica 2. Rodzaj leczenia i przebieg kliniczny choroby po leczeniu
 Table 2. Type of therapy and clinical course of the disease after therapy

Przypadek nr Case no.	Rodzaj leczenia Type of therapy	Czas jaki upłynął od operacji do wystąpienia wznowy Time which elapsed from surgery to recurrence of the neoplasm	Przerzuty odległe Metastases	Przeżycie Survival
1	chirurgiczne, z częściowym usunięciem guza; chirurg niepewny czy część guza nie pozostała w jamie czaszki surgery: partial removal of the tumor. The surgeon was not certain if a part of the tumor remained in the cranial cavity	w odpowiedzi na ankietę otrzymano od rodziców chorego informację, że dziecko po 16 miesiącach czuje się dobrze, nie ma objawów wznowy according to the follow up inquiry the parents answered that the child is in very good condition without symptoms of recurrency	brak not appeared	16 mies 16 months
2	chirurgiczne, usunięcie gałki ocznej surgery: The eyeball removal	w 15 miesięcy od zabiegu operacyjnego nie obser- wuje się objawów wznowy no symptoms of recurrency are observed after surgery	brak not appeared	15 mies 15 months
3	chirurgiczne; usunięto guz i wznowę na udzie i w nerwie kulszowym; chemio- i rtg-terapia surgery: The tumor on the thigh and ischiadic nerve was removed. Chemo- and rtg therapy applied	po 1,5 roku od zabiegu operacyjnego wznowa na udzie i w nerwie kulszowym; po 32 miesiącach na pośladku 1,5 year after surgery recurrence of tumor on the thigh and ischiadic nerve. After 32 month another recurrency on the buttock	po 3 latach od zabiegu do płuc after 3 years from sur- gery to the lungs	Zgon po ponad 3 latach Death after 3 years from surgery
4	chirurgiczne, amputacja podudzia po 55 mie- siącach; początkowo pobrano wycinek i le- czono promieniami jonizującymi i cytostaty- kami surgery: amputation of the left shank 55 months after the onset of the disease. Initially only small samples of tumor were taken for diag- nostic purposes. Chemo- and rtg-therapy applied	po 32 i ponownie po 55 miesiącach objawy wznowy 32 month after the chemo- and rtg therapy recur- rence and the second one after 55 month	po 63 miesiącach prze- rzuty do płuc i kości udowej lewej 63 month after surgery to the lungs and the left femoral bone	6 lat 6 years
5	chirurgiczne, torakotomia i całkowite usunięcie guza, chemioterapia surgery: thoracotomy and total removal of the tumor. Chemotherapy	nie stwierdza się objawów wznowy po 12 miesiącach od zabiegu operacyjnego no symptoms of recurrency till 12 months after surgery	brak not appeared	12 miesięcy 12 months

OMÓWIENIE

Morfologia nowotworów, dla których w naszej pracy przyjęliśmy wspólną nazwę osłoniaki złośliwe — *schwannoma malignum* — ze względu na istotny udział komórek Schwanna lub form od nich pochodnych w utkaniu nowotworu oraz przypisywaną im rolę w jego histogenezie, jest bardzo bogata i różnorodna. Rozpoznanie utrudnia dodatkowo brak szczególnych cech wyróżniających *schwannoma malignum* w badaniu mikroskopowym od innych nowotworów np. *neurofibrosarcoma*. Zazwyczaj w opisach utkania osłoniaków złośliwych wymienia się szczególnie układy komórek wrzecionowatych z ciemnymi okrągłymi, owalnymi lub pęcherzykowymi jądrami, występujących niekiedy w postaci wzajemnie przeplatających się pęczków oraz zagęszczenie i układy stykowe komórek z figurami podziałowymi, których wskaźnik waha się w poszczególnych opracowaniach od 1—2/HPV do 2—8/HPV. Zdaniem D'Agostino i wsp. (1963a), pleomorfizm ciał i jąder komórek nigdy nie osiąga takiego stopnia, jak to ma miejsce w przypadkach złośliwych guzów tkanek miękkich z towarzyszącą neurofibromatozą. Większość autorów (Karcioglu i wsp. 1977; Guccion, Enzinger 1979; Gambarelli i wsp. 1982) uważa, że omawiane guzy wykazują cechy morfologiczne, świadczące o ich bardzo dużym zróżnicowaniu histoformatywnym. Zróżnicowanie to często wpływa na interpretację histogenezy nowotworów, a niekiedy i na ich klasyfikację histologiczną. W nowotworach tych spostrzegano nierzadko ogniska chrzęstno- i kostnopodobne, o cechach zbliżonych do *osteo-* lub *rhabdomyosarcoma*. Na to ostatnie zjawisko zwrócili uwagę Woodruff i wsp. (1975) opisując i podając kryteria tzw. malignant „Triton” tumors. Także Harkin i Reed (1969) zaliczyli niektóre tego rodzaju przypadki do tzw. „malignant mesenchymoma of nerve sheath origin”. Russel i Rubinstein (1959), wyjaśniając te zjawiska, zwracali uwagę na poliblastyczny charakter komórek Schwanna. Dla wytłumaczenia tych zjawisk, zwanych czasem ogniskami metaplazji łącznotkankowej, wysuwano również koncepcję ektomezenchymy lub mezektodermy, z której to „pośredniej” struktury miałyby pochodzić m.in. komórki Schwanna, a także komórki opon mózgu i rdzenia. W hodowli nowotworu i w nowotworze *in situ*, oprócz anaplastycznych komórek Schwanna, stale występują również komórki innego rodzaju, przede wszystkim fibroblasty, które mogą być przyczyną „metaplazji” łącznotkankowej. White (1971) uważa to jednak za zjawisko drugorzędne, rzadkie i nie mające wpływu na biologiczne cechy nowotworu. Z jednej strony osłoniaki złośliwe zawierają utkanie, wskazujące na ich powinowactwo do struktur mezenchymalnych, z drugiej natomiast wykazują cechy morfologiczne, sugerujące ich pochodzenie z neuroektodermy. Do tych ostatnich zaliczyć trzeba formacje neuroepitelialne. Gore (1952) obserwował struktury nabłonkowopodobne w 5 przypadkach spośród 8 opisanych pierwotnych złośliwych guzów

nerwu. Trzy z nich przypominały utkanie *melanoma*. White (1971) stwierdził układy nabłonkowopodobne w 4 z 15 przedstawionych przypadków. Jeden z nich miał cechy przypominające *melanoma amelanoticum*. Utkanie nabłonkowopodobne może dominować w nowotworze (Alvira i wsp. 1976); zajmuje ono wówczas centrum guza, podczas gdy jego obwodową część tworzą komórki coraz bardziej zróżnicowane w kierunku dojrzałych komórek Schwanna. Ghosh i wsp. (1973) twierdzą, że struktury nabłonkowopodobne występują w bardziej anaplastycznych okolicach nowotworu. Harkin i Reed (1969) wyodrębniają jako osobne grupy nowotworów tzw. *malignant epitheloid schwannoma* oraz *malignant melanocytic schwannoma*, zawierający komórki nabłonkowopodobne z melaniną. W przypadku 1 w serii Chena i wsp. (1980) występowały bardzo zróżnicowane układy nabłonkowate przypominające gruczoły. W przypadku 2 z naszej serii, w brzeżnej strefie guza, na granicy z siatkówką stwierdzono również obecność grupy komórek z melaniną. Wydaje się przy tym, że nie pochodziły one z barwnikowej blaszki nadnaczyńkowej, ani nie należały do nabłonka barwnikowego siatkówki, a więc najprawdopodobniej stanowiły element utkania nowotworu. Być może mamy w tym przypadku do czynienia z guzem z rodzaju *melanocytic schwannoma*.

W przypadkach 3 i 5 z naszego zbioru, „neuroepitelialne” utkanie stanowiło drobny, choć wyraźnie odrębny fragment nowotworu i wymagało różnicowania z *neuroblastoma*. Bardzo podobne neuroepitelialne struktury przedstawili Nesbitt i Vidone (1976) opisując własny przypadek guza nerwu kulszowego u 6-letniego chłopca, rozpoznany jako *neuroblastoma*. Według wyżej wymienionych autorów, niektóre guzy nerwów obwodowych wykazują cechy niezróżnicowanych nowotworów neuroektodermalnych. Sądzymy, że oba nasze przypadki (3 i 4) mogłyby odpowiadać cytowanemu przez Nesbitta i Vidone (1976) przypadkowi Michela. Przypuszczają oni, że przypadek ten może reprezentować raczej *schwannoma malignum* z komponentami epitelialnymi niż „czysty niezróżnicowany guz neuroektodermalny”. Zaznaczają oni jednak, że guzy ze strukturami neuroepitelialnymi występują rzadko. Według naszej opinii stwierdzenie rozetowych struktur neuroepitelialnych może być bardzo pomocne przy rozpoznawaniu *schwannoma malignum*, szczególnie w tych przypadkach, gdy nie jest całkowicie pewne pochodzenie złośliwego, wrzecionowato-komórkowego guza nerwu obwodowego, zwłaszcza przy braku współistnienia choroby Recklinghausena. Mimo to trudności diagnostyczne mogą być bardzo duże. D'Agostino i wsp. (1963b) stwierdzili nawet, że wobec braku histologicznej swoistości *schwannoma malignum*, jedyną cechą różniącą go od *fibrosarcoma* jest łączność z nerwem obwodowym. Ten rygorystyczny warunek, jakkolwiek złagodzony wprowadzeniem alternatywnej możliwości występowania cech różnicowania się nowotworu w kierunku komórek Schwanna (przy braku współistnienia choroby

Recklinghausena), podtrzymują także m.in. Harkin i Reed (1969). Różnicowanie w kierunku komórek Schwanna może być jednak trudne do ustalenia. W szczególności bardzo trudne jest wykazanie podobieństwa obrazu histopatologicznego osłoniaka złośliwego do utkania spotykanego w łagodnych jego odmianach. Ingels i wsp. (1971) oparli kryteria różnicowe na podobieństwie utkania guzów złośliwych do łagodnych, dotyczącym występowania układów komórkowych przypominających typ Antoni A i B. Skrajnie odmienny pogląd wyrazili D'Agostino i wsp. (1963a,b), Ghosh i wsp. (1973) oraz Alvira i wsp. (1976), którzy utrzymują, że w osłoniakach złośliwych nie występuje w ogóle utkanie typu Antoni A lub B. Jeżeli się zdarzy, że część guza wykazuje takie utkanie, to nawet przy stwierdzeniu pewnej liczby mitoz, nowotwór należy klasyfikować jako łagodny.

Trudności w ustaleniu cech złośliwości osłoniaka mogą się łączyć z występowaniem guzów, w których dominującą cechą jest znaczne zagęszczenie komórkowe. Dało to podstawę do wyodrębnienia grupy nowotworów pod nazwą „cellular schwannoma” (Erlandson, Woodruff 1982).

Uwzględniając tę niejasno rysującą się granicę między łagodnymi i złośliwymi guzami osłonek nerwów obwodowych, wielu autorów, wśród nich Alvira i wsp. (1976) oraz Chen i wsp. (1980), uważają za konieczne badanie tkanki nowotworowej w mikroskopie elektronowym. Ich zdaniem tylko w ME można przeprowadzić identyfikację komórek Schwanna, fibroblastów i innych elementów składowych guza. Erlandson i Woodruff (1982) przeprowadzili badania mikroskopowo-elektronowe 43 nowotworów, z których 10 rozpoznali jako złośliwe guzy osłonek nerwowych. Podobnie Trojanowski i wsp. (1980) pochodzenie złośliwych guzów osłonki nerwu ustalali wyłącznie na podstawie badania w mikroskopie elektronowym. Spośród cech morfologicznych uwidoczniających się w ME, a świadczących o złośliwości nowotworu, Vuia (1972), Alvira i wsp. (1976) oraz Conley i wsp. (1976) zwracają uwagę na stopień wykształcenia błony podstawnej i na ilość oraz charakter ścisłych złączy międzykomórkowych. Tymi cechami kierowali się również Ursell i wsp. (1982) przy ustaleniu rozpoznania złośliwego osłoniaka we wznowie guza prawej komory serca u 21-letniej kobiety z objawami choroby Recklinghausena. Przedstawione przez nas elektronogramy pozwoliły na ultrastrukturalne potwierdzenie rozpoznania osłoniaka złośliwego, dzięki wykazaniu obecności błony podstawnej w komórkach nowotworu, charakterystycznych wypustek i inwaginacji błony cytoplazmatycznej oraz ścisłych złączy międzykomórkowych.

Wyniki badań nowotworów w mikroskopie świetlnym i elektronowym przemawiają za tym, że rozpoznanie osłoniaka złośliwego jako odrębnego rodzaju nowotworu jest możliwe. Rozpoznanie to jest łatwiej ustalić wówczas, gdy guz wykazuje łączność z nerwem obwodowym lub

gdy w mikroskopie świetlnym widoczne są zachowane formacje tkankowe, przypominające osłoniak łagodny. Jeśli opisanych cech, ułatwiających rozpoznanie, nie udaje się stwierdzić, to poszukiwanie struktur świadczących o neuroektodermalnym pochodzeniu nowotworu zostaje zazwyczaj uwieńczone powodzeniem. Badanie w mikroskopie elektronowym pozwala wyodrębnić taki guz od nowotworu przynależnego do grupy *neuroblastoma*.

Prawidłowe rozpoznanie morfologiczne może znaleźć potwierdzenie w przebiegu klinicznym choroby. W miarę trwania choroby pojawiają się przerzuty, których występowanie jest znanym zjawiskiem towarzyszącym osłoniakowi złośliwemu. Najczęściej stwierdza się przerzuty do płuc, rzadko do węzłów chłonnych (White 1971). Niektórzy autorzy (D'Agostino i wsp. 1963a, White 1971) opisywali odległe naciekanie nowotworowe wzdłuż przebiegu nerwu, w czym upatrywali przyczynę powstawania wznowy.

Mimo skłonności do przerzutów, czas przeżycia chorych w osłoniakach złośliwych jest dłuższy niż w guzach o typie *neurofibrosarcoma*. Wskazują na to również i nasze obserwacje. Przedstawieni chorzy żyli po kilka lat z przerzutami do płuc, do innych nerwów obwodowych i do kości. W przypadku mięsaków czas przeżycia, mimo leczenia, jest krótszy. Sądzimy zatem, że rozpoznane przez nas nowotwory były osłoniakami złośliwymi. Potwierdza to również zbieżność wyników badań morfologicznych i obserwacji klinicznych.

WNIOSKI

1. Stosowane kryteria morfologiczne, oparte również na wykorzystaniu ME, pozwalają na rozpoznanie osłoniaka złośliwego (*schwannoma malignum*) jako odrębnego rodzaju nowotworu.

2. Badania nasze i dane z piśmiennictwa dowodzą, że osłoniak złośliwy może występować u dzieci, a jego patomorfologia jest podobna do stwierdzanej u chorych dorosłych.

3. Wykazane przez nas w utkaniu nowotworu formacje neuroepitelialne o różnym stopniu zróżnicowania przemawiają za możliwością „neuroblastycznej konwersji” komórek Schwanna lub komórek nowotworowych, które się z nich wywodzą.

4. Poliwalencja komórek Schwanna może być przyczyną występowania różnych struktur w utkaniu guza. Struktury te występując z dużą zmiennością upodobniają złośliwe osłoniaki albo do grupy guzów mezodermalnych, albo neuroektodermalnych. W opisanych przez nas przypadkach utkaniu nowotworów wykazywało cechy upodobniające je do guzów pochodzenia neuroektodermalnego.

ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ШВАННОМЫ У ДЕТЕЙ ПАТОМОРФОЛОГИЯ И КЛИНИЧЕСКИЙ ЭПИКРИЗ

Резюме

В 5 случаях у детей в возрасте от 2 месяцев до 7 лет диагностировано новообразование в типе злокачественной шванномы. Два из диагностированных новообразований имели особенно редкую локализацию, а именно в орбите. В одном случае опухоль была локализована вне глазного яблока и можно было констатировать ее тесную связь со зрительным нервом. Во втором случае опухоль выросла из зрительного нерва в стекловидное тело. В остальных случаях опухоли были связаны с периферическими нервами конечностей, а одна опухоль была в связи с нервами средостения. Все новообразования были лечены хирургически. Один больной умер спустя 3 года вследствие метастазов в легкие и кости. Четыре больные живут 9, 10 и 12 месяцев, а один из больных живет почти 6 лет. Диагноз в световом микроскопе был подтвержден в электронном микроскопе. Поиск псевроцителлиальных структур увенчился успехом в 2 случаях. В статье обсуждены разновидности гистологического строения новообразований и связанные с этим диагностические трудности.

MALIGNANT SCHWANNOMA IN CHILDREN PATHOMORPHOLOGY AND CLINICAL EPICRISIS

Summary

In 5 cases of children in the age from 2 month to 7 years a malignant tumor of the nerve sheath of malignant schwannoma type has been diagnosed. In one of the described cases the tumor was localized retrobulbarly and a close contact of the tumor with the optic nerve could be established. In the second case the tumor grew out of the optic nerve into the vitreous body. In the remaining three cases the tumors showed more or less evident connection with the peripheral nerves of the lower extremities or of the posterior mediastinum. In all patients the malignancy was surgically treated. One of the patients died after 3 years of treatment, the other four are still living after 9, 10 and 12 months of treatment and one of the patients even 6 years.

The diagnosis of the tumor made under the light microscope was in two cases confirmed with the use of electron microscopy. The search for neuroepithelial structures was successful in two investigated cases. The histological appearances of the tumors were described and the diagnostic difficulties related with them were discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Alvira, M. M., Mandybur, T. L., Menefee, M. G.: Light microscopic ultrastructural observations of metastasing malignant epitheloid schwannoma. *Cancer*, 1976, 38, 1977—1982.
2. Ashley, D. J. B., Wilson, P. J. E.: Malignant change in an intraspinal nerve sheath tumor. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, 1970, 33, 824—827.
3. Chen, K. T. K., Latorrace, R., Fabich, D., Padgug, A., Hafez, G. P. Gilbert, E. F.: Malignant schwannoma. A light microscopic and ultrastructural study. *Cancer*, 1980, 45, 1585—1593.
4. Conley, F. K., Rubinstein, L. J., Spence, A. M.: Studies on experimental malignant nerve sheath tumors maintained in tissue and organ culture systems.

- II. Electron microscopy observations. *Acta neuropathol. (Berl.)* 1976, 34, 293—310.
5. D'Agostino, A. N., Soule, E. H., Miller, R. H.: Primary malignant neoplasms of nerves (malignant neurilemmomas) in patients without manifestations of multiple neurofibromatosis (von Recklinghausens' disease). *Cancer*, 1963a, 16, 1003—1014.
 6. D'Agostino, A. N., Soule, E. H., Miller, R. H.: Sarcomas of the peripheral nerves and somatic soft tissues associated with multiple neurofibromatosis (von Recklinghausen's neurofibromatosis). *Cancer*, 1963b, 16, 1015—1027.
 7. Erlandson, R. A., Woodruff, J. M.: Peripheral nerve sheath tumors. An electron microscopic study of 43 cases. *Cancer*, 1982, 49, 273—287.
 8. Gambarelli, D., Hassoun, J., Chou, M., Togo, M.: Complex tumor with evidence of neuronal, glial and schwann cell differentiation. A histologic, immunocytochemical and ultrastructural study. *Cancer*, 1982, 49, 1420—1428.
 9. Ghosh, B. C., Ghosh, L., Huvos, A. G., Rortner, J. G.: Malignant schwannoma. A clinicopathologic study. *Cancer*, 1973, 31, 184—190.
 10. Gore, I.: Primary malignant tumors of nerve. A report of eight cases. *Cancer*, 1952, 5, 279—296.
 11. Grabski, R. S.: Olbrzymi osłoniak nerwowy złośliwy przedramienia. *Wiad. Lek.*, 1973, 26, 1457—1459.
 12. Guccion, J. G., Enzinger, R. M.: Malignant schwannoma associated with von Recklinghausen's neurofibromatosis. *Virchow's Arch. (Pathol. Anat.)*, 1979, 383, 43—57.
 13. Harkin, J. C., Reed, R. J.: Tumors of the peripheral nervous system. *Atlas of tumor pathology. Series 2, fasc. 3. AFIP, Washington*, 1969.
 14. Ingels, G. W., Cambell, D. C. Jr., Giampetro, A. M., Kozub, R. E., Bentlage, Ch. H.: Malignant schwannomas of the mediastinum. Report of two cases and review of the literature. *Cancer*, 1971, 27, 1190—1201.
 15. Krawczykowa, Z., Borsuk, J., Fryczkowski, A.: Przypadek olbrzymiego guza oczodołu (neurinoma). *Klinika Oczna*, 1970, 40, 871—874.
 16. Karcioğlu, Z., Someren, A., Mathes, S. J.: Ectomesenchymoma, a malignant tumor of migratory neural crest (ectomesenchyme) remnants showing ganglionic, schwannian, melanocytic and rhabdomyoblastic differentiation. *Cancer*, 1977, 39, 2486—2496.
 17. Nesbitt, K. A., Vidone, R. A.: Primitive neuroectodermal tumor (neuroblastoma) arising in sciatic nerve of a child. *Cancer*, 1976, 37, 1562—1570.
 18. Russel, D. S., Rubinstein, L. J.: *Pathology of tumors of the nervous system. Arnold, London* 1959.
 19. Sobel, H. J., Marquet, E., Schwartz, R.: Is schwannoma related to granular cell myoblastoma? *Arch. Pathol.*, 1973, 95, 396—401.
 20. Trojanowski, J. Q., Kleinman, G. M., Proppe, K. H.: Malignant tumors of nerve sheath origin. *Cancer*, 1980, 46, 1202—1212.
 21. Ursell, Ph. C., Albala, A., Fenoglio, J. J. Jr.: Malignant neurogenic tumor of the heart. *Hum. Pathol.*, 1982, 13, 640—645.
 22. Vuia, O.: Morphologic aspects of the neurofibrosarcoma (neurogenic sarcoma). *Eur. Neurol.*, 1972, 16, 1—7.
 23. White, H. R.: Survival in malignant schwannoma. An 18-year study. *Cancer*, 1971, 27, 720—729.
 24. Woodruff, J. M., Chermik, N. L., Smith, M. C.: Peripheral nerve tumors with rhabdomyosarcomatous differentiation (malignant „triton” tumors). *Cancer*, 1975, 32, 426—439.

Adres autorów: Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologii Akademii Medycznej, ul. Botaniczna 3, 31—503 Kraków

JERZY KULCZYCKI, MARIA KOZIAK, LUCYNA SZEMIS, DANUTA
WIERZBICKA

RAK TARCZYCY WYWODZĄCY SIĘ Z KOMÓREK HÜRTHLEGO Z PRZERZUTAMI DO OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO

Klinika Diagnostyki i Terapii Chorób Układu Nerwowego i Zakład Neuropatologii
Instytutu Psychoneurologicznego, Warszawa

Metaplazja lub zwyrodnienie nabłonka gruczołowego tarczycy, znane pod nazwą zwyrodnienia typu Hürthlego, występuje zarówno w wielu stanach patologicznych (w tym także w gruczolakach), jak i w utkaniu prawidłowym. Jest znacznie częstsze u kobiet (Chesky i wsp. 1951; Horn 1954; Regato, Ackerman 1967), co przemawia za wpływem układu dokrewnego. Związek z procesem starzenia się nie jest zjawiskiem stałym, gdyż opisano również pojedyncze przypadki wrodzonych gruczolaków Hürthlego (Chesky i wsp. 1951; Willis 1953). Identyczne morfologicznie komórki wykryto w wielu narządach, takich jak: przytarczyczki, przysadka, nadnercza, ślinianki, nerki, trzustka, jajowody, jądra i oskrzela, nadając im różne nazwy: onkocyty Hamperla, komórki Askanazego (Gardner 1955).

Klasyczna komórka Hürthlego ma cytoplazmę silnie kwasochłonną i delikatnie ziarnistą. W mikroskopie elektronowym stwierdzono występowanie niezwykle obfitych mitochondriów z wysokim poziomem enzymów utleniających, które mogą odpowiadać ziarnistościom obserwowanym w mikroskopie świetlnym. Nie wykazano jednak wykładników aktywności wydzielniczej (Chesky i wsp. 1951; Roth i wsp. 1962; Bloodworth 1968). Jądro, zwykle małe i pęcherzykowate, może być pyknotyczne, hiperchromatyczne lub dziwaczne (Horn 1954; Gardner 1955; Anderson, Kissane 1977). Kryterium rozpoznania gruczolaka typu Hürthlego opiera się na stwierdzeniu, że guz składa się wyłącznie z wyżej opisanych komórek. Gruczolaki tego typu są rzadkie (Willis 1953; Gardner 1955; Regato, Ackermann 1967), mają różne utkania (*adenoma folliculare, trabeculare, papillare, mixtum* — Chesky i wsp. 1961) i wyjątkowo ulegają przemianie złośliwej, dając przerzuty drogą krwi, czasem odległe, zwykle do węzłów i otaczających narządów, płuc i kości. Prze-

rzuty te są często pierwszym sygnałem bezobjawowego guzka tarczycy (Willis 1953).

Przedstawiamy interesujący przypadek licznych przerzutów raka Hürthlego tarczycy, z równoczesną wysoką eozynofilią w krwi obwodowej i w płynie mózgowo-rdzeniowym.

OPIS PRZYPADKU

Chory (64 lata), zegarmistrz, został przyjęty do Oddziału Neurologicznego Szpitala Grochowskiego z powodu zaburzeń świadomości, bólów i zawrotów głowy, bólów okolicy krzyżowo-lędźwiowej i stanów gorączkowych do 38°C. Na kilka miesięcy przedtem rodzina zauważyła zmianę w zachowaniu się chorego; stał się mało krytyczny, niebały, przejawiał nadmierne łaknienie i częste pobudzenie seksualne.

W szpitalu stwierdzono ślad objawów oponowych, ośrodkowy niedowład prawego nerwu twarzewego i ślad niedowładu połowiczego po stronie lewej. W dwu kolejnych nakłuciach lędźwiowych uzyskano płyn z poziomem białka 182 i 220 mg⁰/o oraz pleocytozą 123 i 126/mm³. W osadzie płynu przeważały limfocyty. W badaniu morfologicznym krwi stwierdzono leukocytozę 15 800/mm³, w obrazie Schillinga 13% granulocytów eozynofilnych. Chorego przekazano do Kliniki Neurochirurgicznej AM w Warszawie. Obustronna angiografia mózgu przez tętnicę szyjną i tomografia komputerowa głowy nie potwierdziły podejrzenia procesu ekspansyjnego. Chorego przekazano do dalszej obserwacji w I Klinice Neurologicznej Instytutu Psychoneurologicznego. Przy przyjęciu chory skarżył się na uczucie ogólnego osłabienia i podał, że w ostatnich tygodniach stracił na wadze około 10 kg. Stan internistyczny był prawidłowy, poza obecnością kilkunastu niewielkich guzków skórnych w różnych okolicach ciała. Neurologicznie stwierdzono dodatnie objawy oponowe, lekki otępienny zespół psychoorganiczny i obecność niektórych objawów deliberacyjnych. W badaniu krwi ujawniono leukocytozę 14 000/mm³ i eozynofilię dochodzącą do 30%. W płynie mózgowo-rdzeniowym poziom białka wynosił 348 mg⁰/o, pleocytoza — 173/mm³. Osad płynu zawierał 9% granulocytów kwasochłonnych, 60% limfocytów i 29% monocytów. W następnym badaniu odsetek granulocytów kwasochłonnych wzrósł do 41. W czasie obserwacji klinicznej wyłączone, jako przyczyny eozynofilii, dychawicę oskrzelową, chorobę posurowiczą, alergię, gruźlicę oraz białaczkę eozynofilną. Badania w kierunku chorób pasożytniczych — bąblowca, wągrycy, toksoplazmozy, motylicy wątrobowej, włośnicy i trychinozy — były ujemne. Negatywne były również wyniki badań w kierunku procesów nowotworowych, które mogą przebiegać z eozynofilią, takich jak: szpiczak, odoskrzelowy rak płuca i inne. Przeciwnie chorobom z grupy kolagenoz przemawiały: niskie OB, prawidłowy proteinogram krwi i nie wykrycie przeciwciał przeciwjądrowych. W tej

sytuacji prowadzono leczenie objawowe, przeciwzapalne i przeciwniebezpieczne Dexamethasonem i antybiotykami, uzyskując przejściową poprawę stanu ogólnego i cofanie się zmian neurologicznych. W kontrolnym nakłuciu lędźwiowym uzyskano płyn z poziomem białka 134 mg% i pleocytozą 27 komórek w mm³. Eozynofilia w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosiła 6%, we krwi 22%.

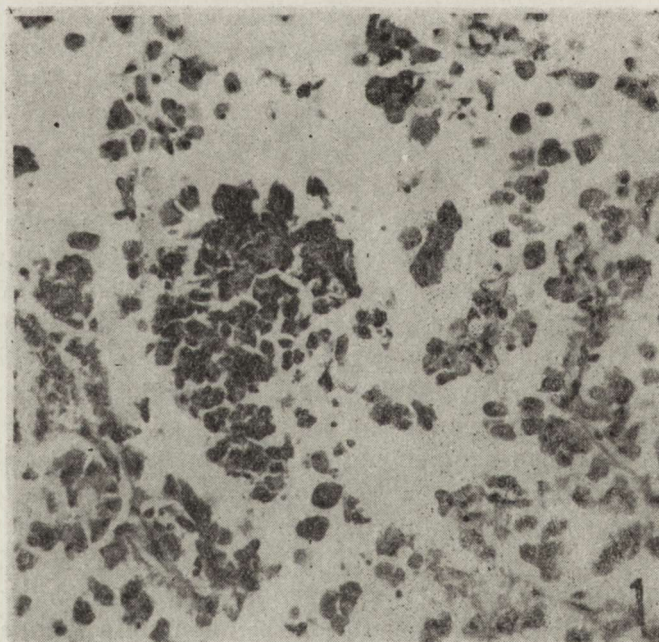
Po miesięcznej poprawie stan chorego zaczął się ponownie pogarszać, narósł niedowład kończyn dolnych z zaburzeniem zwieraczy i obniżeniem czucia powierzchniowego od wysokości Th-1 ku dołowi. Tomografia komputerowa jamy brzusznej wykazała torbielowatość nerek i ognisko rozrzedzenia w wątrobie. W związku z tym ostatnim odchyleniem przeprowadzono zwiadowczą laparatomię. Wycinki wątroby i sieci nie wykazały mikroskopowych zmian pozwalających na ustalenie rozpoznania. Wyniki histopatologicznego badania jednego z guzków skórnych sugerowały nietypową postać kolagenozy (Instytut Reumatologii). Chory zmarł po 5 miesiącach od chwili pierwszej hospitalizacji. Rozpoznanie kliniczne brzmiało: *Collagenosis (eosinophilica?) Meningoencephalomyelitis chronica*.

Badanie sekcyjne (skrót): Uogólniona miażdżyca, otłuszczenie i znaczny przerost serca z włóknieniem mięśnia, różnoczasowe ogniska zawału krwotocznego w płucach, zator obu gałęzi tętnicy płucnej; w nerkach torbiele i przewlekłe zapalenie odmiedniczkowe z kamcią, wybitne otłuszczenie nerek sięgające w głąb kory; przerost prostaty, obustronna hiperplazja kory nadnerczy, pojedyncze tłuszczaki w błonie śluzowej jelita cienkiego, wybitny przerost tkanki tłuszczowej w trzustce z zanikiem mięszu gruczołowego. W lewym płacie tarczycy ciemnoczerwony lity guzek, otorbiony, średnicy 15 mm.

Mikroskopowo, poza potwierdzeniem wyżej wymienionych zmian, stwierdzono liczne zakrzepy w tętnicach i żyłach płuc, jelita cienkiego i osłonek jądra. Światło jednej z żył płucnych częściowo zamknięte brodawczakowatymi masami luźnej tkanki łącznej, na obrzeżu której były obecne komórki z cechami atypii jąder i miejscami kwasochłonną cytoplazmą. W korze nerki wykryto guzek, wyraźnie odgraniczony zbitą tkanką łączną, o utkaniu *carcinoma papillare*, z niezwykle licznymi ciałkami piaszczakowymi i skupieniami dużych komórek o bladej, ziarnistej cytoplazmie. Silna kwasochłonność cytoplazmy występowała tylko w pojedynczych komórkach nowotworu. Obraz ten sugerował przerzut pierwotnego raka tarczycy, jednak badanie guzka tarczycy nie dało oczekiwanego rezultatu. Miał on utkanie *adenoma papillare*, wyłącznie z komórek typu Hürthlego, z wyraźnym otorbieniem zbitą tkanką włóknistą. W tkance tarczycy w otoczeniu guza znaleziono drobne skupienia komórek Hürthlego. Dopiero w badaniu seryjnie krojonych skrawków uzyskano dokumentację złośliwienia gruczolaka, w postaci komórek o cytoplazmie również silnie kwasochłonnej, ale mniejszych, polimorficz-

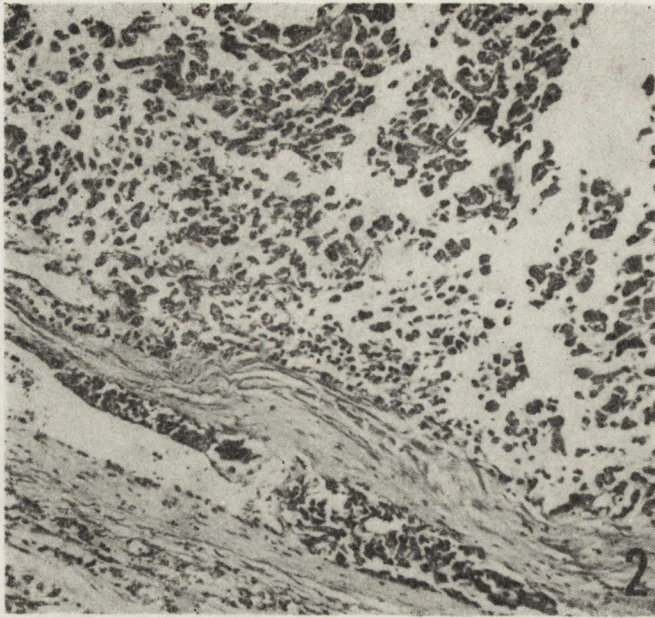
nych, z atypowymi, nadbarwliwymi, często dziwacznego kształtu jądrami (ryc. 1). Występowały one bądź na obwodzie wyrosły brodawczakowatych nawarstwiając się, bądź luźno, bez wyraźnego układu. Ostatecznym potwierdzeniem raka Hürthlego było wykrycie tych komórek w świetle naczyń torebki guza (ryc. 2). Drobnny przerzut stwierdzono w przednim płacie przysadki, z zatarciem jej struktury sinusoidalnej (ryc. 3), a ponadto znaleziono drobne skupienia komórek nowotworowych w około-przysadkowej tkance łącznej. Większość tych komórek miała cytoplazmę wyraźnie kwasochłonną.

Badanie neuropatologiczne (nr prot. sekc. 2666/79): Makroskopowo stwierdzono na podstawie mózgu pod oponą miękką liczne białawe guzki wielkości ziarna prosa. Na przekroju miały one kształt trójkątny i wierzchołkiem wnikały z przestrzeni oponowej do kory. Liczne guzki umiejscowione były w prawej półkuli w zakręcie potyliczno-skroniowym i parahipokampalnym na podstawie mózgu (ryc. 4) oraz symetrycznie obustronnie na powierzchni przyśrodkowej w okolicy ciemieniowo-potylicznej. W mózdzku podobne zmiany znaleziono po obu stronach dolinki (ryc. 5). W rdzeniu kręgowym, po przecięciu opony twardej, stwierdzono obecność białawych guzków wnikających w szelinę pośrodkową przed-



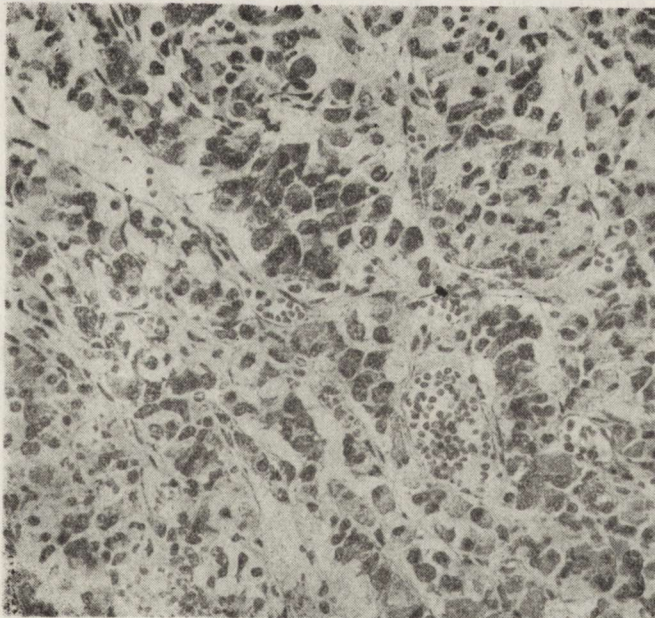
Ryc. 1. Rak złożony z komórek Hürthlego. Komórki nowotworowe w obrębie guza. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 1. Carcinoma originating of Hürthle's cells. Cellular pattern of tumor. H—E. × 100



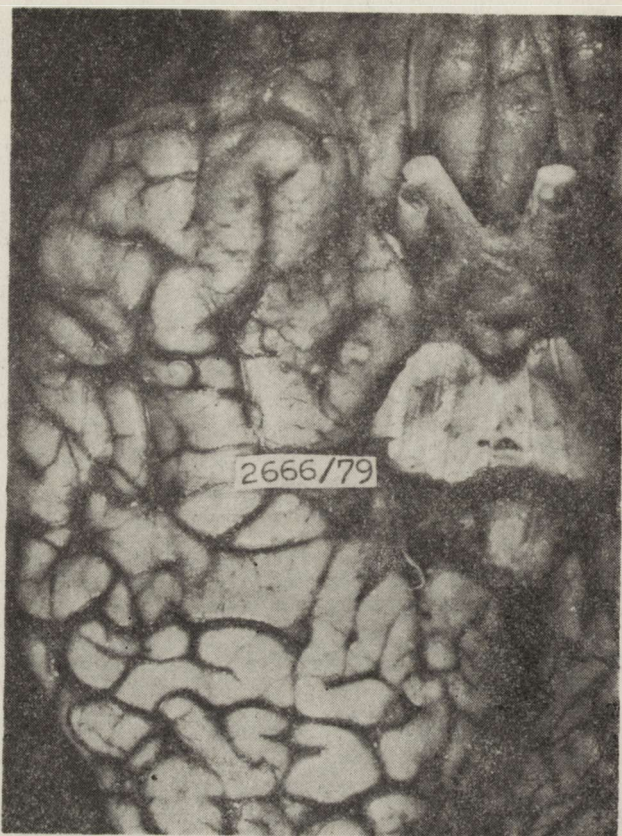
Ryc. 2. Hürthle-cell carcinoma tarczycy. Naciek nowotworowy w torebce i jej naczyniach. H—E. Pow. 60 ×

Fig. 2. Hürthle-cell carcinoma of the thyroid gland. Neoplastic infiltration of the gland capsule and vessels. H—E. × 60



Ryc. 3. Hürthle-cell carcinoma. Przerzut w przysadce. H—E. Pow. 100 ×

Fig. 3. Metastatic focus of Hürthle-cell carcinoma in adenohypophysis. H—E. × 100

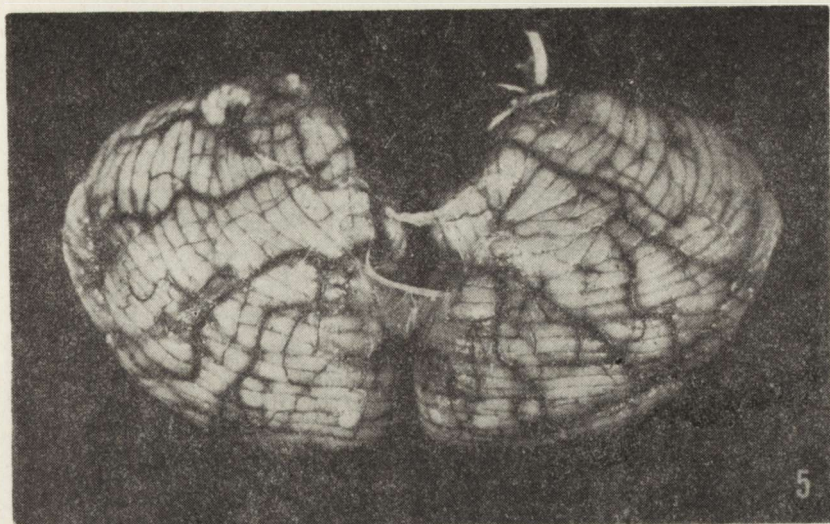


Ryc. 4. Liczne płaskie białawe guzki wielkości ziarna prosa w prawej półkuli mózgu na powierzchni podstawy mózgu w zakręcie potyliczno-skroniowym i parahippokampalnym

Fig. 4. Numerous small, whitish, plane nodules on the basal surface of the right cerebral hemisphere in the area of occipito-temporal and parahippocampal gyri

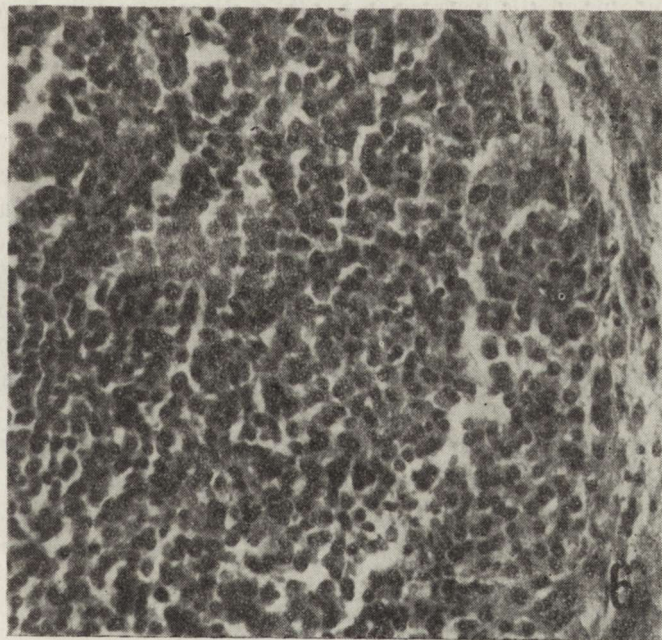
nią na poziomie dolnych segmentów piersiowych i zgrubienia lędźwiowego.

Mikroskopowo badano wycinki z lewego płata czołowego, prawego płata skroniowego ze środkowymi zwojami podstawy, obszaru środkowego z ciałkami suteczkowatymi, lewej półkuli mózdzku oraz rdzenia kręgowego na poziomie zgrubienia szyjnego, segmentów Th₄ i Th₁₂ oraz zgrubienia lędźwiowego. Skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną i eozyną, fioletem krezyłu oraz według metod van Giesona, Bielschowsky'ego i Spielmeyera. We wszystkich badanych okolicach ostro odgraniczone od otoczenia guzki były utworzone z komórek nowotworowych o nadbarwliwych, różnej wielkości jądrach i niekiedy silnie kwasochłonnej cytoplazmie (ryc. 6). Wśród utkania miejscami stwierdzano komórki olbrzymie, mitozy oraz poronne struktury pęcherzykowe (ryc. 7). W otoczeniu guzków obserwowano intensywny odczyn rozplemowy i przerostowy astro-



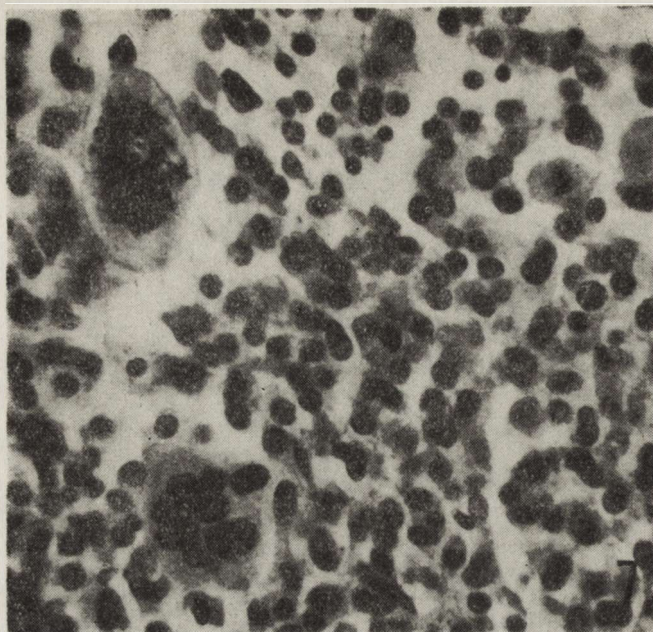
Ryc. 5. Mózdzek — powierzchnia górna. Dwa symetryczne guzki wokół dolinki w pobliżu tylnej krawędzi mózdzku

Fig. 5. Upper surface of cerebellum. Two well-defined nodules around the foveolar ridge, in the vicinity of the posterior cerebellar margin



Ryc. 6. Przerzut nowotworowy ostro odgraniczony od otoczenia. Kora zakrętu potyliczno-skroniowego. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 6. Metastatic focus, sharply delineated from the surrounding tissue in the cerebral cortex in the occipito-temporal gyrus. H—E. × 200



Ryc. 7. To samo ognisko co na ryc. 6. Komórki nowotworowe o kwasochłonnej cytoplazmie i ciemnych jądrach. Komórki wielojądrzaste. Mitozy. H—E. Pow. 400 ×

Fig. 7. The same neoplastic focus as on the fig. 6. Neoplastic cells show eosinophilic cytoplasm and dark nuclei. Multinuclear cells and mitoses are visible. H—E. × 400

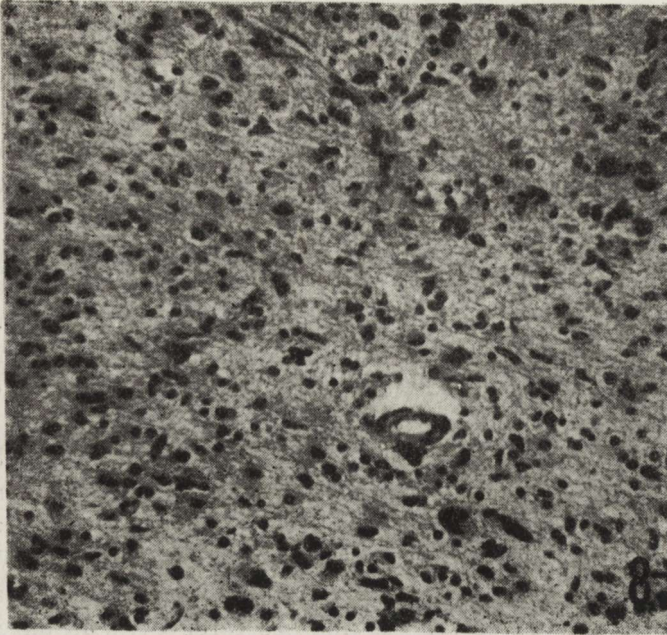
gleju i mikrogleju, tworzący wał otaczający tkankę nowotworową. W pewnym oddaleniu od ogniska nowotworowego zwłaszcza w korze zakrętów skroniowego górnego i wyspy, znajdowano rozsiane w tkance komórki nowotworowe, pojedyncze i w skupieniach oraz bardzo gwałtowny odczyn rozplemowy elementów glejowych o cechach blastomatycznych (ryc. 8).

W dolnym odcinku rdzenia piersiowego i okolicy zgrubienia łądźwiowego stwierdzono ogniska nowotworowe wyraźnie odgraniczone, o podobnym utkaniu, często z centralną martwicą i odczynem glejowym w otoczeniu (ryc. 9A, 9B).

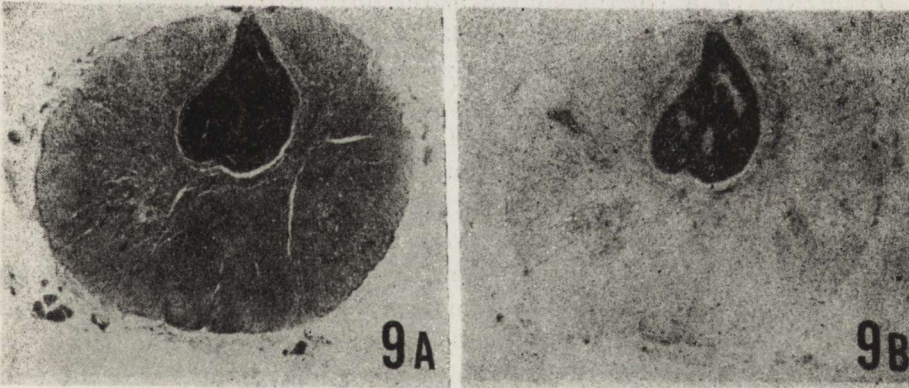
Na podstawie całości badań morfologicznych rozpoznano raka tarczycy wywodzącego się z komórek Hürthlego z naciekiem w naczyniach torebki i licznymi przerzutami do ośrodkowego układu nerwowego, przysadki i nerki. Stwierdzone zatary i zakrzepy zawierające komórki nowotworowe są dowodem szerzenia się raka drogą krwi.

OMÓWIENIE

Rozpoznanie raka Hürthlego w stopniowo złośliwiejącym gruczolaku Hürthlego może być bardzo trudne (Regato, Ackerman 1967). Kryteria oceny złośliwości są różne. Niektórzy autorzy sądzą, że wszystkie gruczol-



Ryc. 8. Kora zakrętu skroniowego górnego. Zatarcie rysunku kory. Bogaty odczyn przerostowy i rozplemowy gleju o cechach blastomatycznych. Skupienia komórek nowotworowych i komórki pojedyncze rozproszone w tkance. H—E. Pow. 100 ×
 Fig. 8. Obliterated cytoarchitectonics of the cerebral cortex in the superior temporal gyrus. Proliferation and hypertrophy of blastomatous glial cells. Neoplastic cells are grouped or dispersed within the abnormal tissue. H—E. × 100



Ryc. 9. A. Zgrubienie lędźwiowe rdzenia kręgowego. Ognisko nowotworowe w szczelinie pośrodkowej przedniej. H—E. Pow. lupowe. B. Ten sam przekrój. Pola martwicy w obrębie guza. Odczyn glejowy wokół guza i w sznurach bocznych. Ubytki neuronów w rogach przednich. Fiolet krezyłu. Pow. lupowe
 Fig. 9. A. Lumbar intumescence of the spinal cord. Neoplastic focus located within the anterior medial fissure. H—E. Magn. glass. B. The same neoplastic focus. Necrotic areas are visible within the tumor. Glial reaction around the focus and within the lateral spinal funiculi. Neuronal loss in anterior spinal horns. Cresyl violet. Magn. glass

laki Hürthlego są potencjalnymi rakami (Marrow — wg Chesky i wsp. 1951). Rozpoznanie opiera się jedynie na stwierdzeniu atypii komórek guza i inwazji torebki i naczyń (Horn 1954; Regato, Ackerman 1967; Bloodworth 1968). Należy pamiętać, że w przeciwieństwie do innych narządów, atypia jąder w nabłonku tarczycy tak często występuje w różnych jej schorzeniach („pseudoatypia”), że ma ograniczoną wartość diagnostyczną (Willis 1953; Regato, Ackermann 1967). Mitozy w rakach Hürthlego są skąpe (Chesky i wsp. 1951; Horn 1954; Bloodworth 1968). Ciałka piaszczakowe, których obecność w każdym *adenoma papillare* tarczycy niemal przesądza o rozpoznaniu raka (Regato, Ackermann 1967; Anderson, Kissane 1977) w gruczolakach Hürthlego i rakach Hürthlego nie były obserwowane (Gardner 1955). W naszym przypadku występowały jedynie w przerzucie do nerki.

Wielu autorów podkreśla duże znaczenie rozpoznawcze obecności — poza komórkami kwasochłonnymi — dużych bladych komórek o ziarnistej cytoplazmie, przypominających komórki przytarczyczek (Shaw 1951; Gardner 1955; Buffat 1976; Anderson, Kissane 1977). Występowanie ich skłoniło Langhansa do przypuszczenia, że są to zabłąkane komórki gruczołów przytarczycowych w mięszu tarczycy, stąd określenie „parastruma” (Shaw 1951; Anderson, Kissane 1977). Współistnienie tych komórek w nowotworach o strukturze brodawkowej może prowadzić do mylnego rozpoznania *carcinoma clarocellulare* nerki (Willis 1953), jak to miało miejsce w przypadku przerzutu raka Hürthlego do kości czaszki opisanym przez Shawa (1951). W naszym przypadku komórki te obserwowano w nerce.

Przerzuty raka Hürthlego wykazują dużą różnorodność utkania histologicznego (Shaw 1951; Willis 1953), a kwasochłonność cytoplazmy nie zawsze się ujawnia (Shaw 1951). Czasami występuje skłonność do różnicowania się w kierunku struktur pęcherzykowych (Shaw 1951) lub brodawkowych (Chesky i wsp. 1951; Horn 1954). Wydaje się, że morfologia przerzutu nie może być podstawą do ustalenia lokalizacji ogniska pierwotnego w tarczycy.

Wysoka eozynofilia w obserwowanym przypadku zarówno we krwi, jak i w płynie mózgowo-rdzeniowym, była przyczyną dużych trudności diagnostycznych dla klinicystów i konieczności różnicowania z wielu jednostkami chorobowymi, zwłaszcza kolagenozą eozynofilną (Herbenwal i wsp. 1966). Nie znalazła ona potwierdzenia mikroskopowego ani w badaniu przyżyciowym guzka skórniego, ani pośmiertnie w narządach. Trudno rozstrzygnąć, czy był to odczyn związany z istnieniem nowotworu (Buffat 1976; Defendini i wsp. 1981), czy jeden z przypadków eozynofilii o nieustalonej etiologii (Dugas i wsp. 1967), czy wreszcie miano odczynu uległo w badaniach podwyższeniu, wskutek równoczesnej obecności silnie kwasochłonnych komórek typu Hürthlego.

Ciekawym zagadnieniem jest możliwość występowania zaburzeń we-

wnątrzwydzielniczych (Bloodworth 1968; Anderson, Kissane 1977), będących następstwem przerzutu do przysadki, objawiających się nadmiernym łaknieniem i otyłością, a pośmiertnie odznaczającym się bardzo znacznym otłuszczeniem narządów. W przysadce opisywano zarówno obecność komórek typu Hürthlego (onkocyty — Gardner 1955), jak i występowanie gruczolaków *adenoma oncocyticum* (Anderson, Kissane 1977), ale choć przerzuty raka tarczycy do przysadki nie są rzadkością, nie było doniesień o przerzucie raka Hürthlego o tej lokalizacji.

Rak tarczycy wywodzący się z komórek Hürthlego może przebiegać bezobjawowo (Chesky i wsp. 1951). Opisywano guzki wielkości kilku milimetrów, dające odległe przerzuty, a będące pierwszym sygnałem choroby (Willis 1953). Według Bloodwortha (1968) z rakiem Hürthlego często współistnieje *phaeochromocytoma* nadnercza. W przypadkach przerzutów o całkowicie niejasnym punkcie wyjścia istotne znaczenie rozpoznawcze ma dokładne histologiczne badanie tarczycy (według niektórych autorów często konieczne jest wykonanie 8—12 bloczków parafinowych — Anderson 1977).

РАК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРОИСХОДЯЩИЙ ИЗ КЛЕТОК ГЮРТЛЯ С МЕТАСТАЗАМИ В ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

Резюме

Описан случай рака щитовидной железы происходящего из клеток Гюртля с метастазами в центральную нервную систему, в гипофиз и в почки. В клинической картине доминировали явления очаговых повреждений головного и спинного мозгов, а в лабораторных исследованиях на передний план выдвигался высокий процент ацидофильных клеток в крови и в спинномозговой жидкости. В дискуссии обращено внимание на очень редкое выступление метастазов рака Гюртля в центральную нервную систему и на эозинофилию, которая, может быть, была по крайней мере частично результатом наличия зернистых, ацидофильных, похожих на гранулоциты, новообразовательных клеток в крови и в спинномозговой жидкости.

HÜRTHLE-CELL CARCINOMA OF THE THYROID GLAND WITH METASTASES TO THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Summary

A case of Hürthle-cell carcinoma of the thyroid gland with metastases to the central nervous system, kidney and hypophysis is presented. The clinical picture of the case was dominated by cerebral and spinal cord symptomatology. Laboratory findings demonstrated high content of eosinophilic granulocytes both in the blood and cerebro-spinal fluid. In the discussion special attention was paid to the rarity of cerebral metastases of Hürthle-cell carcinomas and the high content of eosinophils in both blood and csf. It is hypothesized that eosinophilic cells found there may at least in part correspond to the eosinophilic tumor cells.

PIŚMIENNICTWO

1. Anderson W. A. D., Kissane J. M.: Pathology. Mosby, Saint Louis 1977, 1639—1641.
2. Bloodworth J. M. B.: Endocrine pathology. Williams, Wilkins, Baltimore 1968, 145, 158—162.
3. Buffat J. D.: Les cancers thyroïdiens. Étude sur une série des cas de 1947 à 1974. Praxis, 1976, 65, 646—651.
4. Chesky V. E., Dreese W. C., Hellwig C. A.: Hürthle-cell tumors of the thyroid gland. Clin. Endocrin., 1951, 11, 1535—1548.
5. Defendini R., Hunter S. B., Schlesinger E. B., Leifer E., Rowland L. P.: Eosinophilic meningitis in a case of disseminated glioblastoma. Arch. Neurol., 1981, 38, 52—53.
6. Gardner L. W.: Hürthle-cell tumors of the thyroid, Arch. Pat., 1955, 59, 372—381.
7. Grenet P., Chavelet F., Dugas M., Vilde J. L.: Les eosinophilie du liquide cephalo-rachidien. Presse Méd., 1967, 75, 1388 (éditorial).
8. Herbeuval R., Larcan A., Charles J. M., Lapierre H.: La grande eosinophilie maligne. Presse Méd., 1966, 74, 1537—1541.
9. Horn R. C.: Hürthle-cell tumors of the thyroid. Cancer, 1954, 17, 234—244.
10. Regato J. A., Ackerman L. V.: Nowotwory. PZWL, Warszawa 1967, 501—506.
11. Roth S. I., Olen E., Hansen L. S.: The eosinophilic cells of the parathyroid (oxyphil cells), salivary (oncocytes) and thyroid (Hürthle-cells) glands. Lab. Invest., 1962, 11, 933—941.
12. Shaw R. C.: Metastasizing goitre. „Hürthle-cell” tumour of the thyroid and skull. Brit. J. Surg., 1951, 39, 25—31.
13. Willis R. A.: Pathology of tumours. Butterworth, London 1953, 606—608.

Adres autorów: Klinika Diagnostyki i Terapii Chorób Układu Nerwowego, Instytut Psychoneurologiczny, Al. Sobieskiego 1/9, 02-957 Warszawa

ANDRZEJ SULIŃSKI, JANINA ROSTKOWSKA, WŁODZIMIERZ BICZ

ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN RAT BRAIN AFTER
EXPOSURE OF THE ANIMALS TO RAISED TEMPERATURE
OF THE ENVIRONMENT *

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

There are numerous data indicating that acetylcholine may exert a certain hypothermic effect (Spencer 1965; Rewerski 1972; Kozłowski 1972). Cholinergic drugs acting on the central nervous system have a similar effect (Fuhrman, Fuhrman 1967). An indirect confirmation of this may be found in investigations demonstrating the hypothermic action of cholinesterase inhibitors (Meeter, Wolthuis 1968). Acetylcholinesterase may play a role in the process of adaptation to raised temperature since it is responsible for removal of acetylcholine from the membranous environment.

Acetylcholinesterase as an enzyme structurally and functionally associated with biological membranes (Robaire, Kato 1973; Guerri 1982) may be exposed to the action of elevated environmental temperature modifying the chemical composition (Sinensky 1971) and the physicochemical state of these membranes (Love et al. 1970; James, Branton 1973).

In the light of the above mentioned data it was decided to determine the activity of acetylcholinesterase (E.C. 3.1.1.7. — acetylcholine hydrolyase) in the brain of rats exposed to the action of elevated environmental temperature.

MATERIAL AND METHODS

In all experiments white male rats weighing 200—240 g were used. They were fed a standard diet and received water *ad libitum*. Before the experiment the animals were adapted to the laboratory conditions

* Work was supported by Grant No 10.4.93.7. from the Polish Academy of Sciences.

for 2—3 days. During the experiments the rats were kept in a chamber with forced air flow, humidity within 35—65 per cent and regulated temperature. The control temperature was $21^{\circ} \pm 1.8^{\circ}\text{C}$. The animals were kept, in dependence on the experiment 3, 6, 12 or 24 hours in this chamber (single exposure) and 6 hours daily for six successive days (multiple exposure). The applied experimental temperatures were $28^{\circ} \pm 1.2^{\circ}\text{C}$ and $37^{\circ} \pm 1.8^{\circ}\text{C}$. The rectal temperature of the animals before the experiment oscillated between 37.1°C and 38.4°C . It did not change in the control rats, whereas in those subjected to a temperature of 37°C it rose to a mean of 39.7°C and 40.0°C after three and six hours of the experiment, respectively. The animals were sacrificed by decapitation within 1 hour after the end of a single exposure or on the next day after multiple exposure.

In the experimental model with the use of an organophosphorus inhibitor the rats were kept for 6 hours at 21°C or 37°C . Then the animals received within half an hour 1 per cent solution of DFP (diisopropyl-fluorophosphonate) in glycol diluted with physiological saline in the amount of 0.5 LD_{50} (LD_{50} is ca 6 mg/kg per os). The rats were sacrificed 30 min after receiving DFP.

Immediately after decapitation the cerebral hemispheres were excised and homogenized (Barzu et al. 1973), one in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 and the second in 10 per cent buffered sucrose solution, both in a 1:10 (w/v) ratio. A glass-teflon Potter homogeniser was used, adjusted to 20 movements of the piston at $1500 \times \text{RPM}$ at $0-4^{\circ}\text{C}$. The homogenates were centrifuged for 10 min at $900 \times g$ and the obtained supernatants were solubilised with 1 per cent sodium deoxycholate or diluted with isolation medium in a 1:1 ratio. Assays were carried out on the same day. AChE was determined spectrophotometrically (Ellman et al. 1961) with acetylthiocholine as substrate. The reaction mixture contained in the final volume of 2.0 ml: 0.4 μmoles of Ellman's reagent (DTNB), 2 μmoles of acetylthiocholine iodide and about 0.2—0.4 mg of protein. The reaction was run at 22°C and extinction read for 4 min at 412 nm. The enzymatic activity was expressed in nmoles of hydrolysed substrate per min per mg of protein or in μmoles per min per g of tissue.

In the *in vivo-in vitro* experiments serving for plotting Arrhenius curves the rats were kept for 6 hours in a chamber with temperature 21°C or 37°C . They were sacrificed and the homogenates were prepared as described above. AChE activity at various temperatures was determined by the modified method of Ellman (Gorun et al. 1978). After 20 min of incubation in temperatures of 12, 22, 30, 39 or 49°C the amount of thiocholine released was determined spectrophotometrically at 412 nm. Control samples did not contain any enzyme during incubation. Protein was determined by the biuret method. The results were statistically elaborated by Student's *t* and Dixon's *Q* tests.

RESULTS AND DISCUSSION

In the presented paper experimental systems were used extending the possibility of interpretation of the results. The use for homogenisation of both phosphate buffer and sucrose could on the one hand, supply an answer, whether the action of raised temperature facilitates enzyme release from the membrane during homogenate preparation (in phosphate buffer), and, on the other hand, it could ensure isotonic conditions of homogenisation (in sucrose) so that the eventual differences would not be the result of for instance damage to the enzyme during homogenisation. For both kinds of homogenates the determinations were done in nonsolubilized and solubilized fractions. Solubilization allowed to establish the state of the whole enzyme pool, whereas the determination without solubilization could be helpful in determining the degree of so-

Table 1. The activity of rat brain acetylcholinesterase following single exposure of the animals to increased environmental temperature
Tabela 1. Aktywność acetylocholinoesterazy mózgu szczura w następstwie jednorazowej ekspozycji zwierząt na podwyższoną temperaturę otoczenia

Period of exposition (hours) Czas ekspozycji (godz.)	Temperature (°C) Temperatura (°C)	Without solubilization Bez solubilizacji		After solubilization Po solubilizacji	
		nmole /min/ mg protein	μmole /min/ g tissue	nmole /min/ mg protein	μmole /min/ g tissue
		nmole /min/ mg białka	μmole /min/ g tkanki	nmole /min/ mg białka	μmole /min/ g tkanki
		$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$	$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$	$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$	$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$
3	21	69.9 ± 7.4 (6)	2.24 ± 0.16 (6)	65.2 ± 6.6 (6)	2.16 ± 0.28 (6)
	28	68.4 ± 4.4 (6)	2.20 ± 0.08 (6)	71.3 ± 6.2 (6)	2.24 ± 0.16 (6)
	37	64.8 ± 5.1 (6)	2.18 ± 0.06 (6)	68.4 ± 2.8 (6)	2.19 ± 0.14 (6)
6	21	73.1 ± 8.5 (6)	2.30 ± 0.19 (6)	66.0 ± 8.0 (6)	2.24 ± 0.82 (6)
	28	67.0 ± 5.0 (5)	2.29 ± 0.14 (6)	80.5 ± 8.0 (5)	2.65 ± 0.18 (6)
	37	62.9 ± 3.9 (5)	2.27 ± 0.06 (6)	67.1 ± 2.2 (5)	2.67 ± 0.17 (6)
12	21	68.8 ± 5.9 (6)	2.30 ± 0.12 (6)	64.2 ± 5.0 (6)	2.18 ± 0.24 (6)
	28	48.7 ± 2.3* (6)	2.22 ± 0.07 (6)	52.7 ± 3.2* (6)	2.52 ± 0.20 (6)
	37	49.3 ± 6.7* (6)	2.29 ± 0.25 (6)	54.1 ± 2.9* (6)	2.71 ± 0.20 (6)
24	21	69.6 ± 6.4 (6)	2.28 ± 0.23 (6)	60.8 ± 6.9 (6)	2.28 ± 0.33 (6)
	28	74.0 ± 3.2 (5)	1.92 ± 0.09 (6)	61.8 ± 4.7 (5)	1.81 ± 0.20 (6)
	37	64.2 ± 3.3 (5)	2.28 ± 0.16 (5)	54.5 ± 7.2 (5)	2.08 ± 0.22 (5)

* difference statistically significant — różnica statystycznie znamienna

lubilization after thermal exposure. Since various isolation media were used, enzyme activity was expressed in conversion to milligrams of protein and also to grams of tissue.

Activity of rat brain acetylcholinesterase as the consequence of a single exposure to elevated temperature is shown in table 1. It includes the results obtained for homogenates prepared in phosphate buffer. As

results from the data, keeping the animals for 3 hours under hyperthermic conditions did not cause significant differences as compared with the control group of rats kept at $21^{\circ} \pm 1.8^{\circ}\text{C}$. In the group of animals exposed for 6 hours to raised temperature no distinct changes in acetylcholinesterase activity were noted as compared with the control group. Only a certain increase of activity was noted in the solubilized homogenate fraction after exposure of the animals to 28°C . In view of the fact that the solubilized form of acetylcholinesterase is characterized by a depressed K_m value (Robaire, Kato 1973), this might be considered as an indication of an enhanced AChE release from the membranes in these experimental conditions. In the 12 hours experiment a statistically significant depression of acetylcholinesterase activity is noted. In the case of 24 hours exposure to raised temperature the differences in activity are slight. The picture of this experimental system, however, is not full since it does not take into account the animals which died during the experiment.

The results obtained with the use of homogenates prepared in a sucrose medium give a similar picture of acetylcholinesterase activity as that for homogenates prepared in phosphate buffer. The activity expressed per gram of tissue is, when sucrose is used, distinctly higher as compared with that in homogenate prepared with phosphate buffer, this justifying homogenization in two different isolation media and the different ways of presenting the result (per 1 mg protein or 1 g of tissue). These differences may result from the fact that brain cholinesterase is a membrane "external" ("peripheral") protein and as such may occur in various amounts in membrane preparations obtained by different methods (Coleman 1973).

Table 2. The activity of rat brain acetylcholinesterase following manifold exposures of the animals to increased environmental temperature

Tabela 2. Aktywność acetylocholinoesterazy mózgu szczura w następstwie wielokrotnej ekspozycji zwierząt na podwyższoną temperaturę otoczenia

Isolation medium	Temperature (°C)	Without solubilization		After solubilization	
		Bez solubilizacji		Po solubilizacji	
Medium izolacyjne	Temperatura (°C)	nmoles /min/ mg protein	μ moles /min/ g tissue	nmoles /min/ mg protein	μ moles /min/ g tissue
		białka	tkanki	białka	tkanki
		$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$	$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$	$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$	$\bar{X} \pm \text{S.E.M. (n)}$
Phosphate buffer Bufor fosforanowy	21°C	70.2 ± 5.8 (6)	2.20 ± 0.18 (6)	63.4 ± 5.0 (6)	2.08 ± 0.25 (6)
	37°C	65.0 ± 8.3 (5)	2.05 ± 0.17 (5)	68.8 ± 8.9 (5)	2.12 ± 0.22 (5)
Sucrose buffer Bufor sacharozowy	21°C	72.1 ± 6.5 (6)	7.08 ± 0.45 (6)	60.8 ± 3.6 (6)	5.84 ± 0.67 (6)
	37°C	84.6 ± 7.4 (5)	6.55 ± 0.22 (5)	69.6 ± 5.4 (5)	5.28 ± 0.19 (5)

Brain AChE activity resulting from repeated exposure of the rats to elevated environmental temperature is shown in table 2. Neither were statistically significant differences found in this experimental model between enzyme activity in rats of the control group and of the group subjected for six successive days to raised temperature.

The results of the experiment consisting in intoxication of rats with DFP, previously subjected to a single exposure to elevated temperature, are shown in table 3. In this case a double control system was used: the first group consisted of rats not exposed to raised temperature and not receiving the inhibitor, the second included rats not subjected to elevated temperature but treated with DFP. As seen from the data presented, in rats previously exposed to raised temperature acetylcholinesterase is "sensitized" to the action of the inhibitor administered subsequently. Of course in this case certain changes in acetylcholinesterase activity resulting probably from differences in the toxicokinetic parameters of the applied inhibitor, dependent on the temperature at which the animals were kept before intoxication cannot be ruled out. The results of this experiment might be indicative of the possibility of exerting an influence through raised temperature which would not be manifested directly in changes of enzyme activity. This influence could for instance consist in a change of the microenvironment of the membrane enzymes (Lin 1976).

Table 3. The activity of rat brain acetylcholinesterase following exposure to increased environmental temperature and intoxication by organophosphate inhibitor (DFP)

Tabela 3. Aktywność acetylocholinoesterazy mózgu szczura w następstwie ekspozycji na podwyższoną temperaturę otoczenia i działania inhibitora fosforoorganicznego (DFP)

Experimental conditions Warunki doświadczenia	Phosphate buffer Bufor fosforanowy		Sucrose buffer Bufor sacharozowy	
	Without solubilisation Bez solubilizacji	After solubilisation Po solubilizacji	Without solubilisation Bez solubilizacji	After solubilisation Po solubilizacji
	nmoles/min/mg protein nmole/min/mg białka		nmoles/min/mg protein nmole/min/mg białka	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ n	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ n
21°C × 6h	73.0 ± 8.5 (6)	67.1 ± 8.0 (6)	69.0 ± 5.8 (6)	68.6 ± 6.2 (6)
37°C × 6h	68.8 ± 4.9 (5)	68.6 ± 6.3 (5)	70.1 ± 7.2 (5)	68.8 ± 6.4 (5)
21°C × 6h + DFP	49.5 ± 6.3 (5)	53.8 ± 4.8 (5)	49.6 ± 5.1 (5)	48.6 ± 5.0 (5)
37°C × 6h + DFP	40.7 ± 5.2 (5)	40.0 ± 4.1 (5)	43.5 ± 4.9 (5)	45.1 ± 4.4 (5)

Modification of the physical state of the membranes may change their function by changing the conformation of proteins or the lipid-lipid and lipid-protein interactions. These changes can be detected by examining the course of the Arrhenius plots for enzyme activity (Lenaz

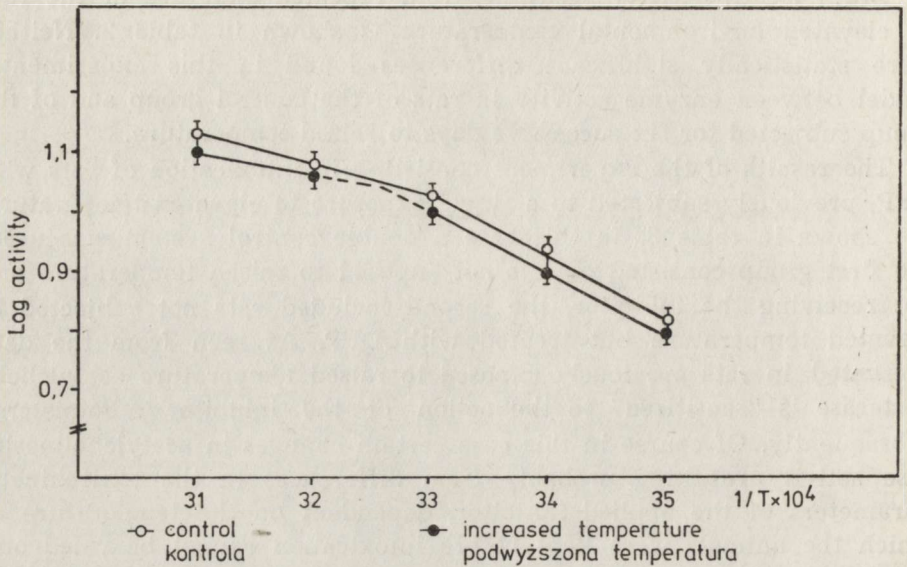


Fig. 1. Arrhenius plots of acetylcholinesterase activity of brain from control and exposed to increased temperature rats. Each point represents the mean value of 4–5 experiments \pm S. D

Ryc. 1. Wykresy Arrheniusa dla aktywności acetylocholinoesterazy mózgu szczurów kontrolnych i poddawanych działaniu podwyższonej temperatury. Każdy punkt reprezentuje wartość średnią z 4–5 doświadczeń, \pm odchylenie standardowe

et al. 1975). Therefore, the last step in the present work was to examine the course of these curves for enzymatic preparations from control rats and those kept for 6 hours at a temperature of 37°C. Such graphs for homogenates prepared in phosphate buffer are shown as example (Fig. 1). The course of the curve is essentially similar for control rats and those subjected to excessive heat. For enzyme preparations from control rats this course is discontinuous at a temperature of about 30°C, when for the enzyme preparation derived from rats exposed to the action of raised temperature this discontinuity shifted somewhat towards lower temperatures. A similar observation was made for homogenates prepared in sucrose.

When discussing these results it should be borne in mind that the determined acetylcholinesterase activity may be influenced in the systems applied by side factors. A serious problem may be for instance the differences in the amount of enzyme released and subsequently bound with the subcellular membranes during preparation, depending on the lipid-protein interaction (Koeppen et al. 1969). Acetylcholinesterase activity may also depend on the degree of aggregation of the enzyme (Silver 1974). The influence of the detergent of acetylcholinesterase activity is also controversial (Sihotang 1974; Tritton et al. 1977).

The results obtained in the present study indicate the lack of signi-

ficant influence of increased temperature (up to 37°C) of the environment on acetylcholinesterase activity in the applied experimental models. However, it may be suggested that the influence of elevated temperature on AChE activity would not be manifested directly in changes of activity but also by latent changes in the membrane microenvironment of the enzyme.

AKTYWNOŚĆ ACETYLOCHOLINOESTERAZY MÓZGU SZCZURA W NASTĘPSTWIE EKSPOZYCJI ZWIERZĄT NA PODWYŻSZONĄ TEMPERATURĘ OTOCZENIA

Streszczenie

Podwyższona temperatura środowiska może zmieniać strukturę i funkcję błon biologicznych, modyfikując ich skład chemiczny oraz stan fizyko-chemiczny. Acetylocholinoesteraza jako enzym związany z błonami biologicznymi może być narażona na działanie podwyższonej temperatury środowiska.

W pracy zbadano aktywności acetylocholinoesterazy mózgu szczurów poddawanych działaniu podwyższonej temperatury otoczenia. Zwierzęta umieszczano w komorze z wymuszonym przepływem powietrza, kontrolowaną wilgotnością (35–65% w.w.) oraz regulowaną temperaturą. Stosowane temperatury wynosiły 21°C (kontrola) oraz 28°C i 37°C. Szczury poddawano działaniu temperatury przez 3, 6, 12 lub 24 godziny (ekspozycja jednorazowa) oraz po 6 godzin dziennie przez 6 kolejnych dni (ekspozycja wielokrotna). Przeprowadzono również doświadczenie polegające na intoksykacji fosforoorganicznym inhibitorem cholinoesteraz (DFP) szczurów poddanych uprzednio działaniu podwyższonej temperatury. Zbadano też przebieg wykresów Arrheniusa dla aktywności acetylocholinoesterazy mózgu szczurów kontrolnych i eksponowanych na podwyższoną temperaturę.

Otrzymane wyniki wskazują na brak istotnego bezpośredniego wpływu stosowanych warunków termicznych na aktywności acetylocholinoesterazy mózgu szczurów. Ujawnione niewielkie zmiany aktywności zależą od stosowanej temperatury i czasu ekspozycji. Jedynie w przypadku eksperymentu z zastosowaniem DFP uzyskane wyniki są bardziej jednoznaczne i mogą sugerować możliwość wpływu podwyższonej temperatury nie bezpośredniego, ale związanego ze zmianami w błonowym mikrośrodku enzymu, co znalazło wyraz w zwiększonej wrażliwości na działanie inhibitora szczurów uprzednio eksponowanych na podwyższoną temperaturę.

REFERENCES

1. Barzu T., Cuparencu B., Hantz A.: Action of organophosphorus compounds on cell organelles. Effect of tetraethyl dithiopyrophosphate in lysosomal hydrolases. *Biochem. Pharmacol.*, 1973, 22, 185–194.
2. Coleman R.: Membrane bound enzymes and membrane ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 300, 1–30.
3. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V. Jr., Featherstone A. M.: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7, 88–95.

4. Fuhrman G. J., Fuhrman F. A.: Effects of temperature on the action of drugs. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 1967, 1, 65—78.
5. Gorun V., Proinov I., Baltescu V., Balaban G., Barzu O.: Modified Ellman procedure for assay of cholinesterases in crude enzymatic preparations. *Anal. Biochem.*, 1978, 86, 324—326.
6. Guerri C.: Effect of lithium on synoptosomal brain enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, 1982, 31, 449—453.
7. James R., Branton D.: Lipid and temperature-dependent structural changes in *Acholeplasma laidlavii* cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 323, 378—390.
8. Koeppen A. H., Barron K. D., Bernsohn J.: Redistribution of rat brain esterases during subcellular fractionation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 183, 253—264.
9. Kozłowski S.: Fizjologia termoregulacji. In: *Termoregulacja*. Eds. W. Rewerski, S. Kozłowski, Z. Korolkiewicz, T. E. Wróblewski. PZWL, Warszawa 1972, 7—65.
10. Lenaz G., Masotti L., Curatola G.: Perturbation on membrane fluidity. *J. Bioenerg.*, 1975, 7, 223—299.
11. Lin D. C.: Effect of ethanol on kinetic parameter of brain (Na^+ , K^+) activated adenosine triphosphatase. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1976, 273, 331—337.
12. Livne A., Kuiper P. J. C., Meyerstein N.: Differential effects of lipids on the osmotic fragility of hamster erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 255, 744—750.
13. Love R., Soriano R. Z., Walsh R. J.: Effect of hyperthermia on normal and neoplastic cells *in vitro*. *Cancer Res.*, 1970, 30, 1525—1533.
14. Meeter E., Wolthuis O. L.: The effects of cholinesterase inhibitors on the body temperature of the rat. *Europ. J. Pharmacol.*, 1968, 4, 18—24.
15. Rewerski W.: Farmakologiczne aspekty termoregulacji. In: *Termoregulacja*. Eds. W. Rewerski, S. Kozłowski, Z. Korolkiewicz, T. E. Wróblewski. PZWL, Warszawa 1972, 89—124.
16. Robaire R., Kato G.: Some differences between soluble and membrane bound acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus*. *FEBS Lett.*, 1973, 38, 83—86.
17. Sihotang K.: A simple method for purification of acetylcholinesterase from human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 370, 468—476.
18. Silver A.: The biology of cholinesterases. North Holland, Amsterdam 1974, 19.
19. Sinensky M.: Temperature control of phospholipid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1971, 106, 449—455.
20. Spencer P. S. J.: Activity of centrally acting and other drugs against tremor and hypothermia induced in mice. *Br. J. Pharmacol.*, 1965, 25, 442—455.
21. Tritton T. R., Murphree S. A., Sartorelli A. C.: Characterization of drug — membrane interaction using the liposome system. *Biochem. Pharmacol.*, 1977, 26, 2319—2323.

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

LUBOMIRA DYDYK, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

ULTRASTRUCTURAL ALTERATIONS OF THE GREY MATTER
STRUCTURES OF THE BRAIN DUE TO EXPERIMENTAL
MANGANESE INTOXICATION

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

Pathomorphological observations concerning experimental manganese encephalopathy vary to a great extent from no abnormalities whatsoever to severe tissue impairment. The latter, as a rule, appears after prolonged intoxication, lasting for numerous weeks and months (Makarczenko 1956; Pentschew et al. 1963; Chandra, Srivastava 1970; Jonderko 1970; Chandra 1972; Singh et al. 1974). The most common for all descriptions is damage of the grey cerebral structures, either generalized, prevailing in the cerebral and cerebellar cortex or selectively limited to the subcortical structures including globus pallidus, striatum, thalamus, subthalamic nuclei, substantia innominata and substantia nigra. It consists in neuronal degeneration and/or loss with secondary glial reaction and good preservation of the white matter. All the above mentioned observations were carried out at the light microscopic level.

In a series of our own observations (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski et al. 1982, 1983) white matter alteration, consisting in tissue spongiosis and severe damage to the axonal mitochondria, dominated the pathomorphology of the experimental manganese encephalopathy. The grey matter abnormalities, as seen in the light microscope, were slight and not significant. They took the form of nonspecific degeneration of individual or grouped neurons of the cerebral or cerebellar cortex. The only finding consistent with the other observations was the severe neuronal damage and loss in the substantia nigra, appearing in animals surviving 4 weeks after the end of intoxication. This inclined us to study systematically the nature and evolution of the ultrastructural abnormalities in the brain grey structures at various stages of the postintoxication period.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on 6-week-old male albino rats (weighing ± 150 g at the beginning of experiment), which were given, in the course of 4 weeks, seven subsequent intravenous injections of manganese chloride, dissolved in physiological salt solution. Two initial injections, each containing a dose of 20 mg/kg of Mn^{++} were given every third day, the following 3 injections with a dose of 40 mg/kg body weight of Mn^{++} each, were administered in the course of one week at two day intervals. The last 2 injections containing the same doses of metal were applied at one week intervals. The intravenous way of manganese administration was chosen to avoid poor intestinal metal absorption and its dependence on alimentary factors (Aston 1980). Control animals were given intravenously physiological salt solution according to the same scheme.

The experimental animals were divided into three groups: group I — consisted of animals killed one day after the last injection, group II — comprised those sacrificed one week after the last injection, while those of group III were permitted to survive for the next four weeks, for allowing metal excretion from the body organs (Hietanen et al. 1981). The mortality rate in all experimental groups amounted to 43%. The animals died either at the time of injection or immediately after it. The survivors, during the whole time of observation, showed no neurological symptoms. However, their motor activity was obviously reduced. They lost their appetite and their hair was lusterless.

Both experimental and control animals were sacrificed by intracardiac perfusion with 2 percent solution of glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.4. The brains after removal from the skull were kept overnight in the same fixative at the temperature of 4°C and then sliced coronally. Tissue blocks, 1 mm³ in size were taken from the neocortex, Ammon's horn, striatum, substantia nigra and upper medulla. They were processed in a routine way up to embedding in Epon 812.

Ultrathin sections were counterstained on grids with uranyl acetate and lead citrate and examined under a JEM A7 electron microscope.

RESULTS

The general pattern of ultrastructural tissue abnormalities was similar in all the examined areas of the central nervous system, although their intensity was greatest in the substantia nigra and striatum. As documented by studies carried out on subsequent experimental groups these changes evolved significantly in time.

In experimental group I all the examined areas of the brain contained neurons with focally rarefied cytoplasm, impoverished in sub-

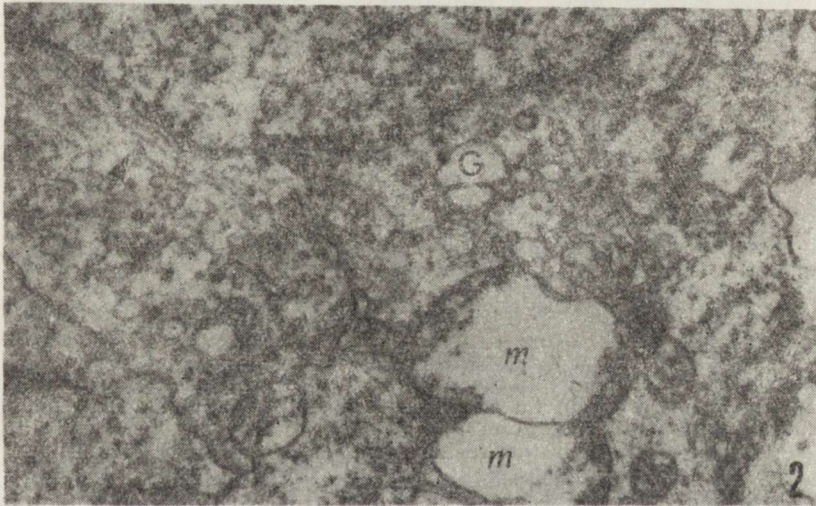
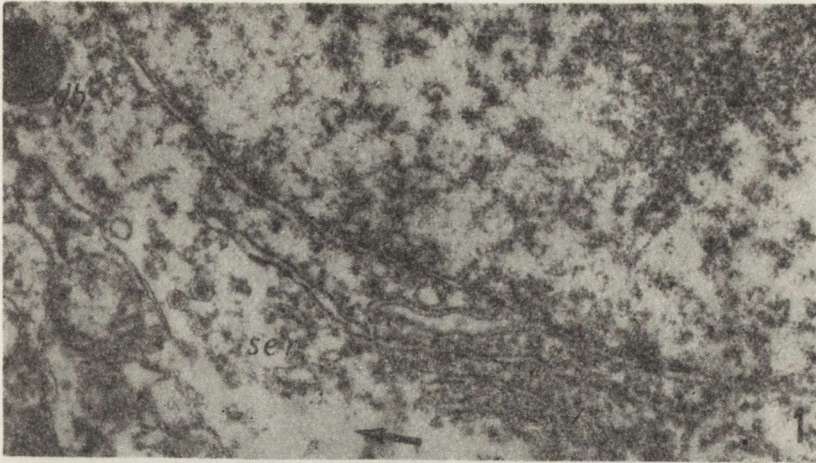


Fig. 1. Group I. Fragment of the motor cortex. Neuron showing a focal decrease of electron density of cytoplasm (arrow) with wide cisternae of smooth endoplasmic reticulum (ser) and a dense body (db). $\times 15\ 500$

Ryc. 1. Grupa I. Fragment kory ruchowej. Komórka nerwowa z ogniskowym rozrzedzeniem cytoplazmy (strzałka), szerokimi zbiornikami gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser) i ciałem gęstym (db). Pow. $15\ 500 \times$

Fig. 2. Group I. Fragment of striatum. In the cytoplasm of nerve cell, swollen mitochondria (m), large cisternae of Golgi apparatus (G) and abundant neurotubules (arrow) are visible. $\times 15\ 500$

Ryc. 2. Grupa I. Fragment prążkowia. W cytoplazmie komórki nerwowej widoczne obrzmiałe mitochondria (m), szerokie zbiorniki układu Golgiego (G) i liczne neurotubule (strzałka). Pow. $15\ 500 \times$

cellular organelles (Fig. 1). Numerous cisternae of smooth endoplasmic reticulum, some of them greatly distended, widened channels and cisterns of the Golgi system and swollen mitochondria with light matrix, peripherally displaced, shortened or broken down cristae were the most typical features of these neuronal abnormalities (Fig. 2). In numerous neurons, alongside with severely affected mitochondria normal ones

were present. In some nerve cells there was an increase of cytoplasmic tubular structures. Nerve cell nuclei were unchanged. Much less frequently neurons with condensed hyaloplasm, widened channels of rough endoplasmic reticulum and swollen mitochondria were seen. Axons contained electron light cytoplasm with a reduced number of subcellular organelles and with enlarged cisternae of smooth endoplasmic reticulum. Their mitochondria were affected in the same manner as those in the neuronal perikarya (Fig. 3). Mitochondrial abnormalities were present in some nerve endings. In the latter, in addition, abnormalities in distribution of synaptic vesicles were observed, mostly in the form of irregular aggregations.

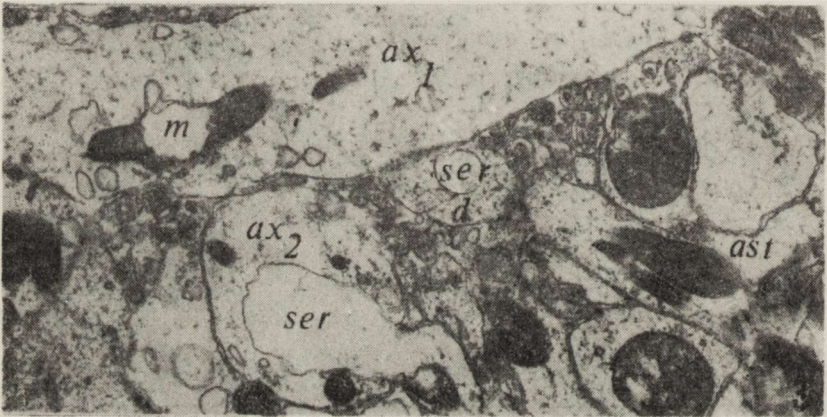


Fig. 3. Group I. Fragment of hippocampus. Swollen mitochondrion (m) with finger-like membrane protrusion in an axon (ax₁), vacuolization of smooth endoplasmic reticulum (ser) in another axon (ax₂) and dendrite (d) and mitochondrion with condensed configuration in an astrocytic process (ast). $\times 9000$

Ryc. 3. Grupa I. Fragment hipokampa. Obrzmiałe mitochondrium z palczastym wypukleniem błony (m) w aksonie (ax₁), wakuolizacja zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser) w aksonie (ax₂) i w dendrycie (d), mitochondrium o konfiguracji skondensowanej w wypustce astrogleju (ast). Pow. 9 000 \times

The cytoplasm of astrocytic perikarya and processes was abundant poor in subcellular structures and contained enlarged cisterns of Golgi apparatus and of both rough and smooth endoplasmic reticulum as well as greatly swollen mitochondria with either light or granular matrix and peripherally displaced cristae (Fig. 4). The cytoplasm of some astrocytic cells was almost totally devoid of subcellular organelles, except some enlarged profiles of endoplasmic reticulum. This type of abnormalities concerned mostly perineuronal astrocytes accompanying neurons with greatly condensed cytoplasm (Fig. 5). The electron lucent cytoplasm of oligodendrocytes contained a great number of distended cisternae and channels of Golgi apparatus and rough and smooth endoplasmic reticulum (Fig. 6). Oligodendroglial mitochondria revealed the same abnormalities as those of neurons and astrocytes. Most of the capillaries and

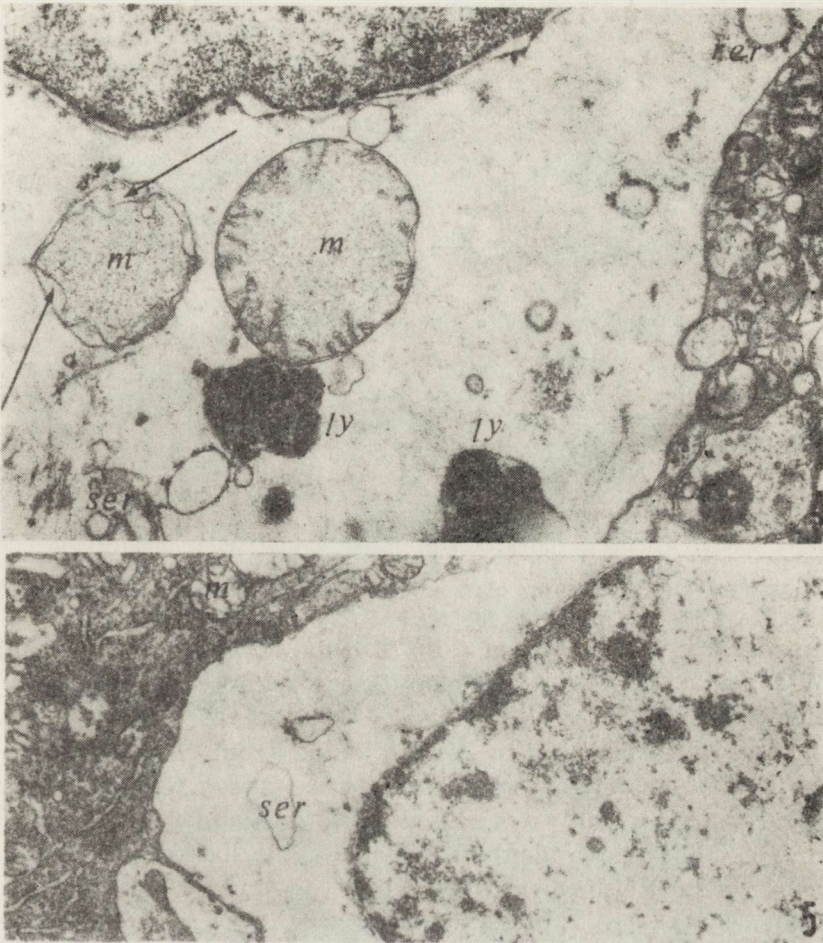


Fig. 4. Group I. Fragment of compact zone of substantia nigra. Astrocyte with greatly rarefied cytoplasm containing large mitochondria (m) with granular matrix and folded inner membrane (arrows), dense bodies (ly) and widened cisternae of smooth (ser) and rough (rer) endoplasmic reticulum. $\times 12\ 500$

Ryc. 4. Grupa I. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej. Komórka astrogleju z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej, w której widoczne są mitochondria z drobnoziarnistą macierzą (m) i sfałdowaną błoną wewnętrzną (strzałki), ciała gęste (ly), oraz szerokie zbiorniki szorstkiej (rer) i gładkiej (ser) siateczki śródplazmatycznej. Pow. $12\ 500 \times$

Fig. 5. Group I. Fragment of motor cortex. Perineuronal satellite astrocyte with light cytoplasm containing wide cisterna of smooth endoplasmic reticulum (ser). Fragment of neuron with electron dense cytoplasm and swollen mitochondria. (m) $\times 7\ 500$

Ryc. 5. Grupa I. Fragment kory ruchowej. Okołoneuronalny astrocyt satelitalny z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej i z pojedynczym szerokim zbiornikiem gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser). Fragment komórki nerwowej z cytoplazmą o dużej gęstości elektronowej i obrzmiałymi mitochondriami (m). Pow. $7\ 500 \times$

precapillaries had small, narrowed lumina. The capillary walls were ultrastructurally normal. In some of them there was a slight increase of pinocytotic vesicles. In some precapillaries thickening of the

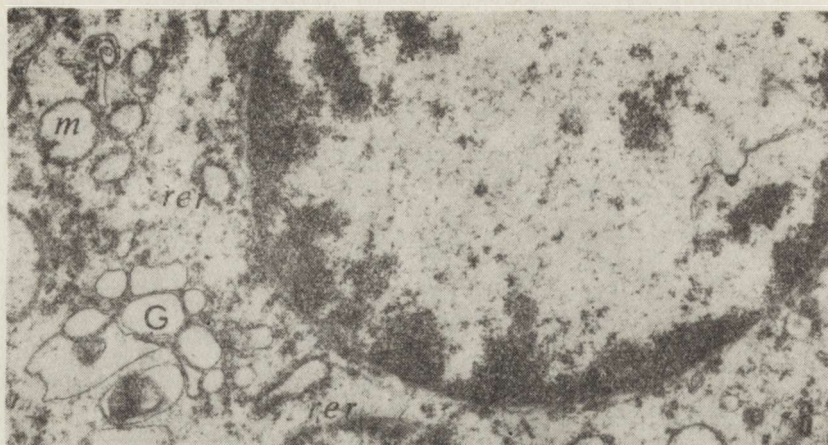


Fig. 6. Group I. Fragment of upper medulla. In the cytoplasm of oligodendrocyte distended cisternae of Golgi apparatus (G) and rough endoplasmic reticulum (rer) and swollen mitochondria (m) are visible. $\times 7500$

Ryc. 6. Grupa I. Fragment opuszki górnej. W cytoplazmie komórki oligodendrogleju widoczne szerokie zbiorniki układu Golgiego (G) i szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (rer) oraz obrzmiałe mitochondria (m). Pow. $7500 \times$

basal membrane was observed (Fig. 7). Slight swelling of pericapillary astrocytic processes was a common feature. Intercellular spaces were unchanged.

Neuronal abnormalities in experimental group II were more intensive. Three types of nerve cell lesions were present. The most common were neurons with highly condensed cytoplasm and narrowed channels of rough endoplasmic reticulum. Against this background numerous groups of widened cisternae of Golgi apparatus and smooth endoplasmic reticulum were present. Mitochondria with light matrix and peripherally

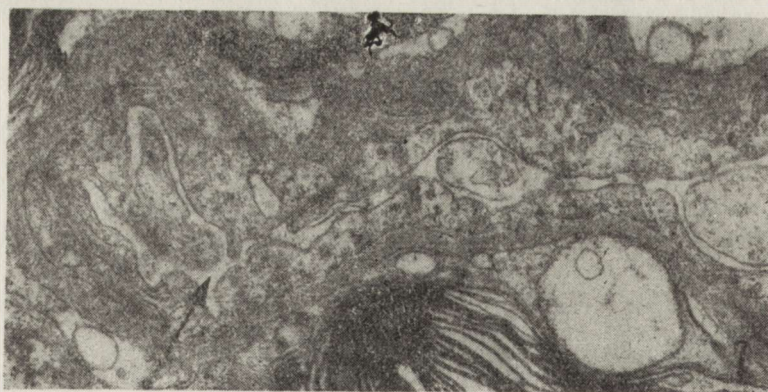


Fig. 7. Group I. Fragment of upper medulla. Precapillary vessel with narrowed lumen (long arrow) and thickened basement membrane (short arrow). $\times 13000$

Ryc. 7. Grupa I. Fragment górnej opuszki. Naczynie przedwłosowate z wąskim światłem (długa strzałka) i pogrubiałą błoną podstawną (krótka strzałka). Pow. $13000 \times$

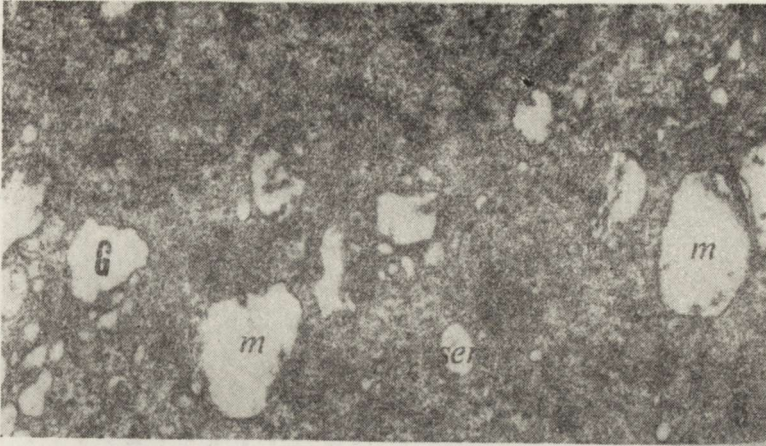


Fig. 8. Group II. Fragment of substantia nigra. In greatly condensed cytoplasm of nerve cell numerous swollen mitochondria (m), large cisternae of Golgi apparatus (G) and smooth endoplasmic reticulum (ser) are visible. Some narrow channels of rough endoplasmic reticulum (rer) are present. $\times 7500$

Ryc. 8. Grupa II. Fragment istoty czarnej. W cytoplazmie komórki nerwowej o dużej gęstości elektronowej widoczne obrzmiałe mitochondria (m), szerokie zbiorniki układu Golgiego (G) i gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser) i pojedyncze wąskie zbiorniki szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (rer). Pow. 7 500 \times



Fig. 9. Group II. Fragment of nerve cell from compact zone of substantia nigra. Vacuolization of smooth endoplasmic reticulum channels (ser), focal extension of rough endoplasmic reticulum channels (arrows) and swollen mitochondrion (m) are visible. $\times 15500$

Ryc. 9. Grupa II. Fragment komórki nerwowej zbitej warstwy istoty czarnej. Wakuolizacja zbiorników gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser), miejscowe poszerzenia zbiorników szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (strzałki) i obrzmiałe mitochondrium (m.) Pow. 15 500 \times

displaced cristae were also enlarged (Fig. 8). Neurons with "dark" condensed cytoplasm and enlarged channels of rough endoplasmic reticulum were less common. The other neuronal abnormality consisted in a great

distension of the abundant cisternae of smooth endoplasmic reticulum, some of them forming large, irregular vacuolar structures, containing a small amount of light, floccular material (Fig. 9). Severe widening of channels of the rough endoplasmic reticulum was also a feature in these abnormal nerve cells (Fig. 10). A great number of axons, mostly those in substantia nigra and striatum were swollen and impoverished

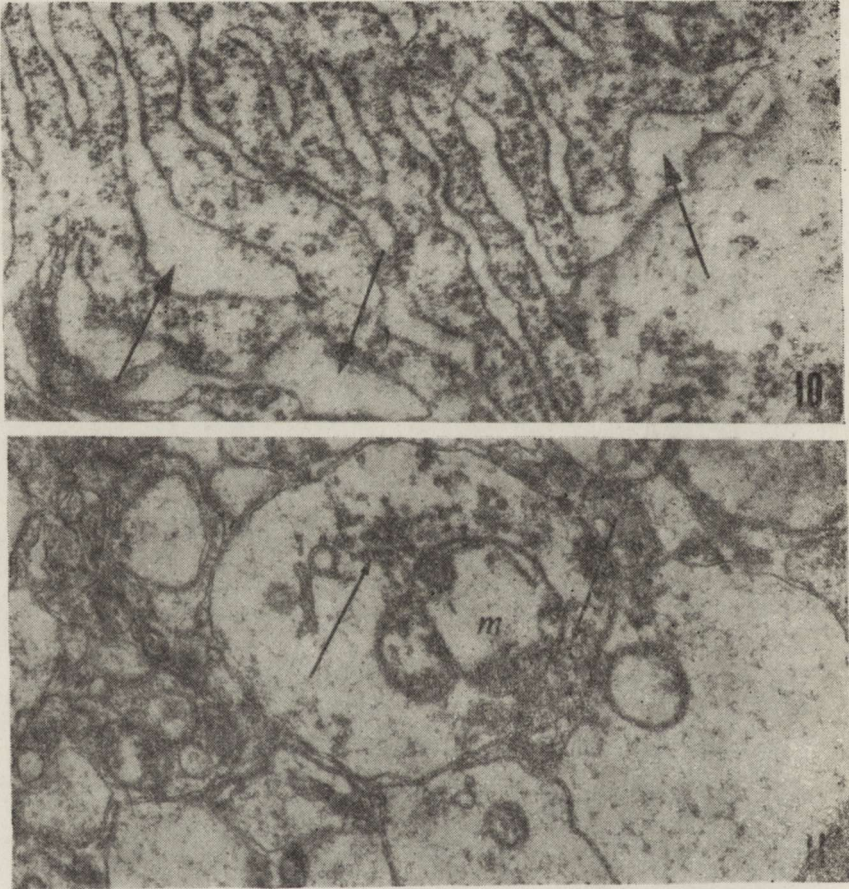


Fig. 10. Group II. Fragment of nerve cell from compact zone of substantia nigra. Wide, focally extended channels and cisternae of rough endoplasmic reticulum (arrows). $\times 15\ 000$

Ryc. 10. Grupa II. Fragment cytoplazmy komórki nerwowej zbitej warstwy istoty czarnej. Szerokie, miejscami rozdęte zbiorniki szorstkiej siateczki śródplazmatycznej (strzałki). Pow. $15\ 000 \times$

Fig. 11. Group II. Fragment of compact zone of substantia nigra. Axon terminal with light cytoplasm, containing aggregates of the synaptic vesicles (arrow) and swollen mitochondrion (m). Neighbouring dendrites with light swollen cytoplasm. $\times 15\ 000$

Ryc. 11. Grupa II. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej. Akson końcowy z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej, z agregacją pęcherzyków synaptycznych (strzałki) i z obrzmiałym mitochondrium (m). Sąsiednie dendryty z jasną obrzmiałą cytoplazmą. Pow. $15\ 000 \times$

in cytoplasmic organelles (Fig. 11). So were nerve endings, showing in addition an irregular distribution of synaptic vesicles and their abnormal aggregates (Fig. 11). Oligodendroglial alterations were of the same nature as in the previous group, although less intense. A great



Fig. 12. Group II. Fragment of upper medulla. Astrocytic processes with swollen mitochondria (m), distended cisternae of smooth endoplasmic reticulum (ser) and abundant gliofilaments. $\times 7000$

Ryc. 12. Grupa II. Fragment górnej opuszki. Wypustki astrocytarne z obrzniętymi mitochondriami (m), poszerzonymi zbiornikami gładkiej siateczki śródplazmatycznej (ser) i obfitymi gliofilamentami. Pow. 7000 \times

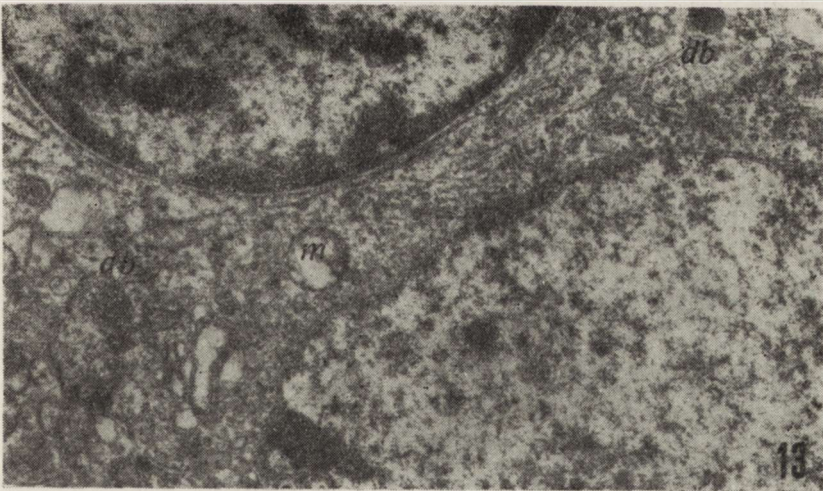


Fig. 13. Group III. Fragment of striatum. Neuron with some swollen mitochondria (m) and dense bodies (db). Unchanged satellite oligodendroglial cell. $\times 7500$

Ryc. 13. Grupa III. Fragment prążkowania. Komórka nerwowa z obrzniętymi mitochondriami (m) i ciałami gęstymi (db) w cytoplazmie i niezmienną komórką satelitarną oligodendrogleju. Pow. 7500 \times



Fig. 14. Group III. Fragment of striatum. In the perivascular area terminal axon with light cytoplasm, containing an aggregate of the synaptic vesicles (arrow) is visible. Unchanged neuropil elements and capillary wall. cl — capillary lumen, ax — myelinated axon, d — dendrite. $\times 13\ 000$

Ryc. 14. Grupa III. Fragment prążkowiec. Fragment naczynia włosowatego z szerokim światłem (cl). W okolicy przynaczyniowej widoczne zakończenie aksonalne z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej i agregacją pęcherzyków synaptycznych (strzałka). Niezmienione aksony (ax) i dendryty (d). Pow. 13 000 \times

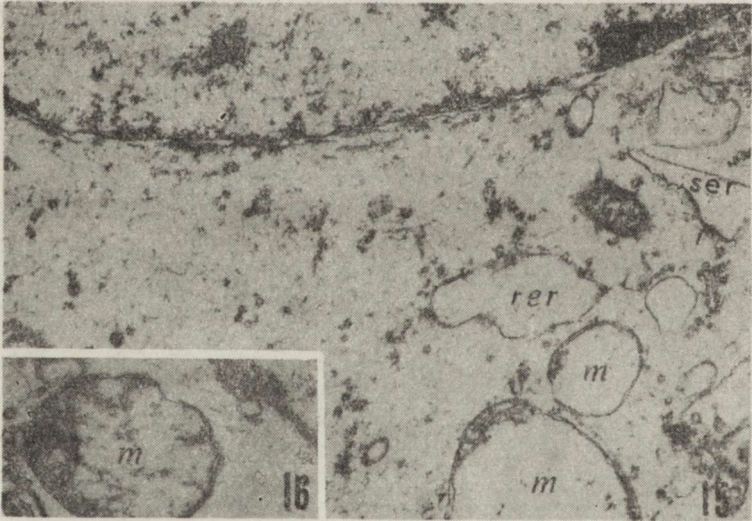


Fig. 15. Group III. Fragment of hippocampus. Astrocyte with light cytoplasm containing swollen mitochondria (m) and extended cisternae of rough (rer) and smooth (ser) endoplasmic reticulum. $\times 8\ 500$

Ryc. 15. Grupa III. Fragment hipokampa. Komórka astrogleju z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej, z szerokimi zbiornikami szorstkiej (rer) i gładkiej (ser) siateczki śródplazmatycznej i z obrzmiałymi mitochondriami (m). Pow. 8 500 \times

Fig. 16. Group III. Fragment of hippocampus. Swollen mitochondrion (m) from an astrocytic process with the cytoplasm of low electron density. $\times 11\ 000$

Ryc. 16. Grupa III. Fragment hipokampa. Obrzmiałe mitochondrium (m) w wypustce astrogleju o małej gęstości elektronowej. Pow. 11 000 \times

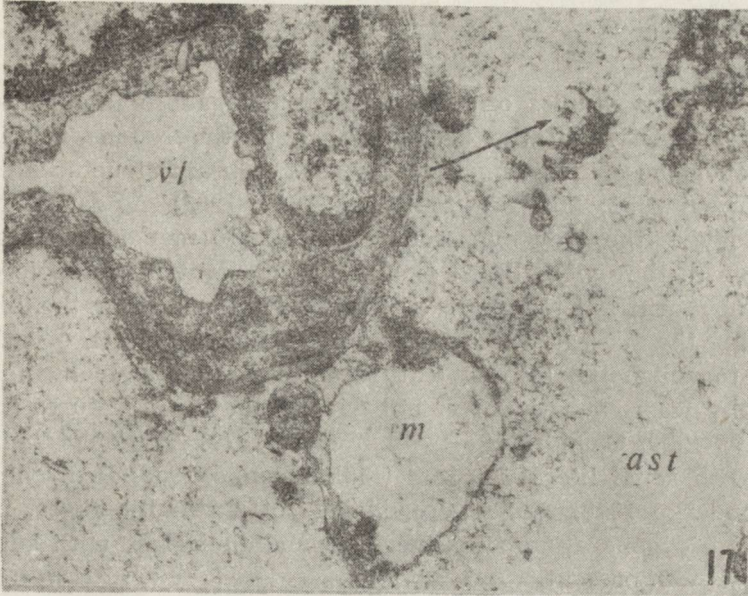


Fig. 17. Group III. Fragment of compact zone of the substantia nigra. Precapillary vessel with a large lumen (vl). Perivascular astrocytic process (ast) with cytoplasm of low electron density, containing swollen mitochondrion (m) and remnants of a disintegrated mitochondrion (arrow). $\times 13\ 000$

Ryc. 17. Grupa III. Fragment zbitej warstwy istoty czarnej. Naczynie przedwłosowe z szerokim światłem (vl). Przynacyniowa wypustka astrogleju (ast) z cytoplazmą o małej gęstości elektronowej, z obrzmiałym mitochondrium (m) i z resztkami rozpadłego mitochondrium (strzałka). Pow. $13\ 000 \times$

number of astrocytes showed remarkable swelling of cytoplasm. In some of their processes an increased amount of fibrils was present (Fig. 12).

In experimental group III the neuronal and oligodendroglial lesions were least advanced. In the majority of them both nuclei and cytoplasm were ultrastructurally normal (Fig. 13). The only persistent ultrastructural abnormality was mitochondrial swelling. However, in both substantia nigra and striatum numerous nerve endings with abnormally light cytoplasm and aggregation of synaptic vesicles were still present (Fig. 14). Astrocytic abnormalities dominated the electron microscopic picture of the grey structures examined. They consisted in cytoplasmic swelling, poor content of subcellular cytoplasmic structures, irregular, vacuolar distension of smooth and rough endoplasmic reticulum and abnormal mitochondria (Figs 15, 16). In the substantia nigra a great number of astrocytes contained an excess of gliofilaments. Perivascular astrocytic processes were either normal (Fig. 14) or greatly distended (Fig. 17). The structural components of capillary walls showed no abnormalities (Figs 14, 17).

DISCUSSION

Our previous studies on experimental manganese intoxication were strongly suggestive of the predominance of the lesions in the white matter over those involving the grey matter brain structures (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski et al. 1982; 1983). As far as the neuropathology of the grey matter damages due to manganese intoxication is concerned, they were based exclusively on light microscopic observations. They contradicted most of the data known from the literature, concerning the subject, based also on light microscopic observations, according to which the leading feature of experimental manganese encephalopathy was severe involvement of grey matter structures (Chandra, Srivastava 1970; Chandra 1971; Singh et al. 1974). The only finding consistent with some literature data (Makarczenko 1956; Pentschew et al. 1963; Jonderko 1970) was severe damage of substantia nigra, in which progressive degeneration of nerve cells and their loss with subsequent fibrogliosis was present.

The present studies, concerning ultrastructural abnormalities of the grey brain structures induced by manganese intoxication confirmed in general our previous observations, although the grey matter lesions were more generalized and severe than seen in light microscopy.

The pathological process involved all cellular elements of the grey matter: neurons with their processes and endings, oligodendrocytes and astroglia. Brain capillaries were least changed. The general pattern of electron microscopic alterations was similar in all the examined structures and in all experimental groups. However, there existed also some essential differences between them which permitted to speculate both on the topographic selectivity of lesions and on the dynamics of the pathological process and its time sequences.

Despite of the above mentioned similarity of pathological changes there were two structures of the brain in which the tissue alterations were more severe, generalized and persistent. These were substantia nigra and striatum. In the former both neuronal, synaptic and glial abnormalities were most generalized and severe and they evolved to neuronal disintegration with their subsequent replacement by astrocytes with a distinct increase of gliofilaments content. This could be considered as electron microscopic equivalent of neuronal loss and fibrogliosis seen in light microscopy (Śmiałek, Mossakowski 1981). The most noticeable and persistent ultrastructural abnormalities in the striatum consisted in degeneration of nerve endings, with less obvious neuronal damage. This selective involvement of nigral neurons and their synaptic system corresponded well with observations concerning the noxious effects of manganese on the dopaminergic system (Neff et al. 1969; Mustafa, Chandra 1971; Chandra, Shukla 1981; Hietanen et al. 1981).

In other brain structures, most tissue abnormalities seemed to be reversible, as indicated by the fact that neuronal and oligodendroglial changes, being most advanced and generalized in the second experimental group, i.e. in animals surviving one week after the end of intoxication, almost completely disappeared in the last experimental group. It has to be proven to what extent this reversibility of changes (if real) may be connected with the reduction of the tissue content of the toxic agent after exposure to it has been ceased, as postulated by Hietanen et al. (1981). Two factors may be involved in the normalization of the electron microscopic picture of most grey structures, observed in the last experimental group. The first is a real reversibility of cellular changes. Such a situation has been noticed in many other lesions to nerve and glial cells under experimental conditions. The second one is total disintegration and disappearance of irreversibly damaged cells. This is usually accompanied by either the presence of cellular residua or appearance of glial replacement with gliofilaments proliferation. Both these factors can also operate together. This seems more probable, as some of the observed neuronal changes have been proven to be irreversible (Brierley et al. 1973; Garcia et al. 1978).

The astrocytic abnormalities were most persistent. They were still present in the last experimental group, while at that time neuronal and oligodendroglial alterations were practically absent in most of the brain areas, except substantia nigra. However, a distinct evolution of astrocytic changes was seen. In the two earlier experimental groups they consisted in remarkable cytoplasmic swelling of perikarya and processes, while in the latest group this was replaced in most instances by gliofilaments proliferation. The same time sequences were noticed in the white matter under identical experimental conditions (Mossakowski et al. 1982; 1983).

The most striking abnormality in all cellular compartments of the grey matter consisted in severe damage to mitochondria. The high affinity of the metal to these cytoplasmic organelles is very well known (Cotzias 1958; Autissier 1974). Ultrastructural mitochondrial lesions were consistent with biochemical and histochemical data, indicating severe impairment of the activity of mitochondrial enzymes in experimental manganese encephalopathy (Chandra 1972; Seth, Husain 1974; Singh et al. 1974; Sitaramaya et al. 1974; Hietanen et al. 1981). The question of the molecular mechanism of mitochondrial damage remains open. Perhaps it is connected with the membrane stabilizing function of manganese (Aston 1980) or its role as enzymatic cofactor (Leach, Lilburn 1978). The damaging effect of the metal on mitochondrial calcium transport has also to be taken into consideration (Leach, Lilburn 1978). Unanswered is also the problem of the greater sensitivity to its damaging action of astrocytic and axonal mitochondria as compared with that of mitochon-

dria in the neuronal perikarya and oligodendrocytes (Mossakowski et al. 1982; 1983). Nevertheless it seems plausible to consider that primary mitochondrial structural lesions with their metabolic consequences may be responsible for the changes involving other subcellular elements, observed in our material.

Basing on our present and previous observations (Śmiałek, Mossakowski 1981; Mossakowski et al. 1982; 1983) it is justified to state that subchronic intoxication with manganese chloride, applied intravenously, can result in toxic encephalopathy, dominated by involvement of the white matter, revealing characteristic light- and electron-microscopic alterations with a relatively slight, reversible and mostly selective damage to the grey matter structures. The discrepancy of our observations with other descriptions, stressing predominance of grey matter damage remains unanswered. Perhaps it may be connected with the kind of manganese compound used, its dosage, duration of intoxication and species-dependent animal differences. Comparison of the electron-microscopic alterations is also necessary. To our knowledge all morphological studies on experimental manganese encephalopathy have been carried out hitherto at the light-microscopic level.

USZKODZENIA ULTRASTRUKTURALNE ISTOTY SZAREJ MÓZGU W DOŚWIADCZALNYM ZATRUCIU MANGANEM

Streszczenie

Przedstawiono wyniki mikroskopowo-elektronowych badań istoty szarej mózgu w doświadczalnym zatruciu chlorkiem manganowym. Zwierzęta doświadczalne otrzymywały dożylnie roztwór chlorku manganowego w łącznej dawce 240 mg Mn^{++}/kg masy ciała, rozdzielonej na 7 porcji podanych w okresie 4 tygodni. Zwierzęta zabiłano w grupach po upływie 24 godz., 7 i 28 dni po zakończeniu zatrucia.

Stwierdzono, że w badanych strukturach ośrodkowego układu nerwowego występowały umiarkowane uszkodzenia wszystkich elementów komórkowych tkanki. Uszkodzenia komórek nerwowych najsilniejsze po upływie 7 dni od zakończenia zatrucia, cofały się w dalszym okresie obserwacji (z wyjątkiem istoty czarnej i prążkowiec, w których wykazywały dalszą progresję). Podobnie zachowywały się nieprawidłowości oligodendrogleju, dotyczące głównie okołoneuronalnych komórek satelitarnych. Uszkodzenia astrocytów utrzymywały się we wszystkich grupach doświadczalnych, w ostatniej wyrażały się one postępującą hiperplazją elementów filamentarnych. We wszystkich strukturach przeważały nieprawidłowości mitochondrialne.

Autorzy podkreślają, że w przeciwieństwie do większości danych z piśmiennictwa, w zastosowanym modelu doświadczalnej encefalopatii manganowej, przeważają uszkodzenia istoty białej. Zmiany w istocie szarej są mniej nasilone i mają charakter w większości odwracalny. Wybiórcze uszkodzenia istoty czarnej i prążkowiec stanowią morfologiczny wykładnik upośledzenia układu dopaminergicznego przez mangan. Wiodące uszkodzenia mitochondriów wiążą się z powinowactwem manganu do tych właśnie struktur subkomórkowych, występującym zarówno w warunkach prawidłowych, jak i w stanach chorobowych.

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СЕРОГО ВЕЩЕСТВА ГОЛОВНОГО МОЗГА
В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОТРАВЛЕНИИ МАРГАНЦОМ

Резюме

Представлены результаты электронно-микроскопических исследований серого вещества головного мозга в экспериментальном отравлении хлористым марганцем. Экспериментальные животные получали внутренне раствор хлористого марганца в общей дозе 240 мг Mn^{++} /кг массы тела, разделенной на 7 порций вводимых в течение 4 недель. Животных убивали в группах по истечении 24 часов, 7 и 28 дней после окончания отравления.

Констатировано, что в исследуемых строениях центральной нервной системы выступали умеренные повреждения всех клеточных элементов ткани. Повреждения нервных клеток, самые сильные по истечении 7 дней от окончания отравления, отступали в дальнейшем периоде наблюдения, за исключением черного вещества и стриатума, в которых они проявляли дальнейшую прогрессию. Подобным образом вели себя неправильности олигодендроглии, относящиеся главным образом к околонейрональным сателлитарным клеткам. Повреждения астроцитов удерживались во всех экспериментальных группах, в последней они выражались в прогрессирующей гиперплазии филаментарных элементов. Во всех строениях преобладали митохондриальные неправильности.

Авторы подчеркивают, что в противоположность большинству данных из литературы в примененной экспериментальной модели марганцевой энцефалопатии преобладают повреждения белого вещества. Изменения в сером веществе менее интенсивны и имеют в большинстве обратимый характер. Селективные повреждения черного вещества и стриатума составляют морфологический показатель ослабления дофаминэргической системы марганцем. Ведущие повреждения митохондрий авторы связывают со сродством марганца к тем именно субклеточным строениям, выступающим как в нормальных условиях, так и в патологических состояниях.

REFERENCES

1. Aston B.: Manganese and man. *J. Orthonol. Psychiat.*, 1980, 9, 237—249.
2. Autissier N.: Caption de Mn^{++} par les mitochondres après perfusion du foie de rat normal et thyreodectomisé. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 1974, 168, 509—513.
3. Brierley J. B., Meldrum B. S., Brown A. W.: The threshold and neuropathology of cerebral anoxic-ischemic cell changes. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 367—373.
4. Chandra S. V.: Histochemical changes in experimental manganese encephalopathy in rabbits. *Arch. Toxicol.*, 1972, 29, 29—38.
5. Chandra S. V., Shukla S. G.: Effect of manganese on synthesis of brain catecholamines in growing rat. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1981, 48, 449—454.
6. 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.
7. Cotzias G. C.: Manganese in health and disease. *Physiol. Rev.*, 1958, 38, 503—506.
8. Garcia J. H., Lossinsky A. S., Kaufman F. C., Conger K. A.: Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry. *Acta neuropath. (Berl.)*, 1978, 43, 85—95.
9. Hietanen E., Kilpio J., Savolainen H.: Neurochemical and biotransformational enzyme responses to manganese exposure in rats. *Acta Environm. Contam. Toxicol.*, 1981, 10, 339—345.
10. Jonderko G.: Badania mechanizmów patogenetycznych przewlekłego zatrucia manganem. *Śląska Akademia Medyczna. Katowice* 1970.

11. Leach R. M., Lilburn M. S.: Manganese metabolism and its function. *Wld. Rev. Nutr. Diet.* (Basel), 1978, 32, 123—134.
12. Makarczenko A. F.: *Izmienienija nierwnoj sistiemy pri intoksikacji margancem.* AN USRR, Kijów, 1956, 211—272.
13. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Selective white matter damage due to manganese intoxication. IX. Intern. Congr. Neuropath., Vienna, September 5—10, 1982. Abstracts 78.
14. Mossakowski M. J., Dydyk L., Śmiałek M.: Wczesne uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego w doświadczalnym zatruciu związkami manganu. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 455—468.
15. 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.
16. Neff N. H., Barret R. E., Costa E.: Selective depletion of caudate nuclei dopamine and serotonin during chronic manganese administration in squirrel monkeys. *Experientia* 1969, 25, 1140—1141.
17. Pentschew A., Ebner F. F., Kovatch R. M.: Experimental manganese encephalopathy. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1963, 22, 488—496.
18. 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.
19. 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.
20. Sitaramaya A., Nagar N., Chandra S. V.: Effect of manganese on enzymes in rat brain. *Acta Pharm. Toxicol.*, 1974, 35, 185—190.
21. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: *Obraz neuropatologiczny mózgu szczura w zatruciu solami manganu.* *Neuropat. Pol.*, 1981, 19, 377—387.

Authors' address: Department of Neuropathology, Medical Research Centre, Pol. Acad. Sci., 00-784 Warszawa, 3 Dworkowa Str

ANNA ZARĘBA-KOWALSKA, BARBARA GAJKOWSKA
MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI

THE EFFECT OF MANGANESE ON THE ULTRASTRUCTURE OF PITUITARY CELLS *IN VITRO*

Department of Neuropathology and Laboratory of Electron Microscopy, Medical
Research Centre, Warszawa

Manganese (Mn) is widely distributed in nature but occurs only in trace amounts in biological material, particularly in animal tissues. A deficiency of this essential trace element results in a wide variety of structural and physiological defects which reflect altered biochemical functions (Underwood 1977). It is known that Mn plays an important role in the maintenance of normal function of central nervous system (CNS). It seems likely that the metal fulfils this role in conjunction with enzymes acting as their dissociable cofactor (Utter 1976). In excess Mn is toxic. Manganese toxicity induces disorders in the function of the CNS in experimental animals and humans with symptoms similar to those of Parkinson's disease (Cotzias 1958; Chandra 1970; Śmiałek, Mossakowski 1981). It was recently reported by Rehnberg et al. (1980) that chronic Mn exposure of the young rats results in its high brain and pituitary concentrations. As it was revealed, the relative levels of Mn in cerebrum, hypothalamus and pituitary were 16—30 times higher than those in control tissues for the same age. It is also supposed that an unusual accumulation of manganese may be controlled by genetically conditioned processes (Ulmer 1973). Manganese produces a dose-dependent depression of proliferation, inhibition of the colony forming ability and DNA synthesis in mammalian cell lines *in vitro* (Fisher, Škreb 1980). It also stimulates the misincorporation of both ribo- and desoxyribonucleotides in various *in vitro* systems (Murray, Flessel 1976), and reduces phagocytosis in alveolar macrophages (Graham et al. 1975). Manganese is not considered a carcinogenic metal (Sunderman 1978).

The site and the mode of action of manganese at the cellular level are yet little known. The aim of present study was to determine on a ultrastructural basis the susceptibility of neurohypophyseal glial cells

—pituicytes—to manganese toxicity. Using the technique of organotypic culture of 14 day hypophyseal neural lobes derived from newborn rats, the direct effects of manganese on the morphological structure of neurohypophyseal glial cells, were investigated.

MATERIAL AND METHODS

Organotypic cultures were prepared from newborn Wistar rat neural lobes. The neural lobes were separated from the pars intermedia and pars distalis of the hypophysis. After removal of the capsular connective tissue, neural lobes were explanted on collagen-coated coverslips and maintained in Carrel flasks. The nutrient medium, renewed twice weekly, consisted of 50% human serum, 40% Earle's solution (pH 7.2), and 10% 9-day-old chicken embryo saline extract. It was supplemented with glucose to a final concentration of 600 mg/100 ml and penicillin of 100 units/ml. The pH of the medium ranged from 7.0 to 7.3.

Selected 14 day cultures were subjected to manganese chloride for three days. Manganese chloride was added to the incubating medium in two doses: 6 and 12 mg%.

For electron microscopy the cultures were briefly rinsed in Locke's solution. The fixation was carried out in 1.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2, for 30 min at 4°C. The tissues were then rinsed in the same buffer for 1 h, and postfixed for 1 h in 1.5% osmium tetroxide in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.2. The cultures were embedded in Epon 812, and ultrathin sections counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a JEM 7 A electron microscope.

RESULTS

Group I

Fourteen day cultured pituicytes of newborn rats, exposed for three days to manganese chloride in a dose of 6 mg% in culture medium, revealed ultrastructural abnormalities in comparison to control cultures of the same age. The general morphological features of cultured pituicytes have been described previously (Zaręba-Kowalska et al. 1983; Gajkowska, Zaręba-Kowalska 1983), so they will not be repeated in the present report.

Two categories of pituicytes could be distinguished in experimental cultures. The majority of pituicytes belonged to the first category. In these cells a significant increase in smooth endoplasmic reticulum (SER) was observed in contrast to relative scarcity of RER profiles. The SER formed a three-dimensional network of channels, frequently dilated and filled with an amorphous substance of moderate electron-density. Also

observed was a profusion of smooth-surfaced vesicles in close association with the SER system (Fig. 1). Striking changes affected the mitochondria. Most of them were swollen and exhibited an electron lucid matrix and a reduced number of cristae often placed in peripheral position. In some pituicytes with swollen mitochondria numerous glycogen particles as well as lipid droplets were observed (Figs 2, 3). The cellular nuclei of some pituicytes belonging to this cell population showed changed nucleoli. Observed changes resembled segregation of nucleolar material on granular and fibrillar parts.

Less numerous pituicytes belonging to the second category had normally developed RER and SER but in some of them an increased number of lipid droplets appeared. The majority of mitochondria in these cells were normal and only some of them contained osmophilic inclusions. The nuclei and nucleoli of these cells did not reveal any abnormalities (Fig. 4).

It is worth noting that some pituicytes in this experimental group contained numerous filaments scattered between cytoplasmic organelles (Fig. 5).

Group II

Fourteen day cultured pituicytes exposed for three days to manganese chloride in a dose of 12 mg⁰/₀ revealed more marked changes in ultrastructure. Nearly all pituicytes possessed altered nucleoli, showing segregation of its material while in their damaged, electron-lucent cytoplasm inclusion bodies containing osmophilic material were observed. Also observed was the decrease in the number of ribosomes and polyribosomes (Fig. 6).

In some pituicytes with less damaged cytoplasm, apart from normal mitochondria there were also abnormal mitochondria, mostly swollen with shortened and aggregated cristae or devoid of cristae (Fig. 7).

In some cells large lipid droplets were visible in the cytoplasm (Fig. 8).

DISCUSSION

In the present experimental conditions dose-related cellular effects of manganese intoxication could be demonstrated in neurohypophyseal glial cells, i.e., pituicytes. Our studies revealed ultrastructural alterations both in the cytoplasm of pituicytes as well as in their nuclei. The most striking changes concerned mitochondria. It was possible to follow the subsequent stages of these changes: swelling, accumulation of osmophilic bodies and final transformation into inclusion bodies. Our results confirm previous observations that manganese enters mitochondria where it causes morphological alterations (Cotzias 1958; Autissier 1974;

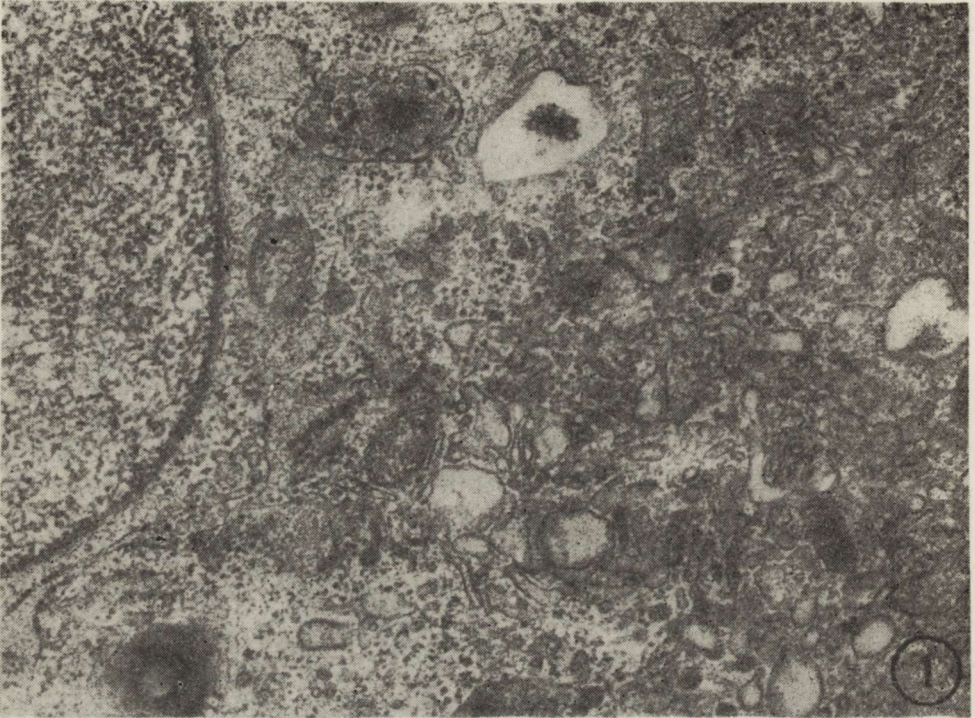


Fig. 1. Group I. Pituicyte treated with manganese chloride showing extensively developed SER. $\times 13\ 350$

Ryc. 1. Grupa I. Pituicyt poddany działaniu chlorku manganawego. Silnie rozwinięta SER. Pow. $13\ 350 \times$

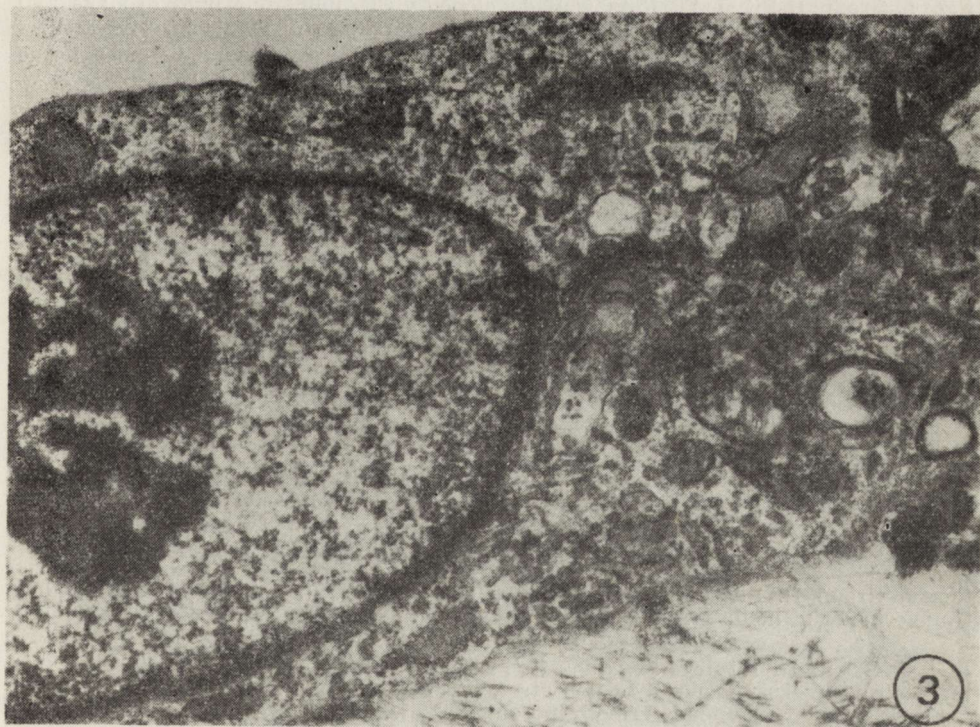
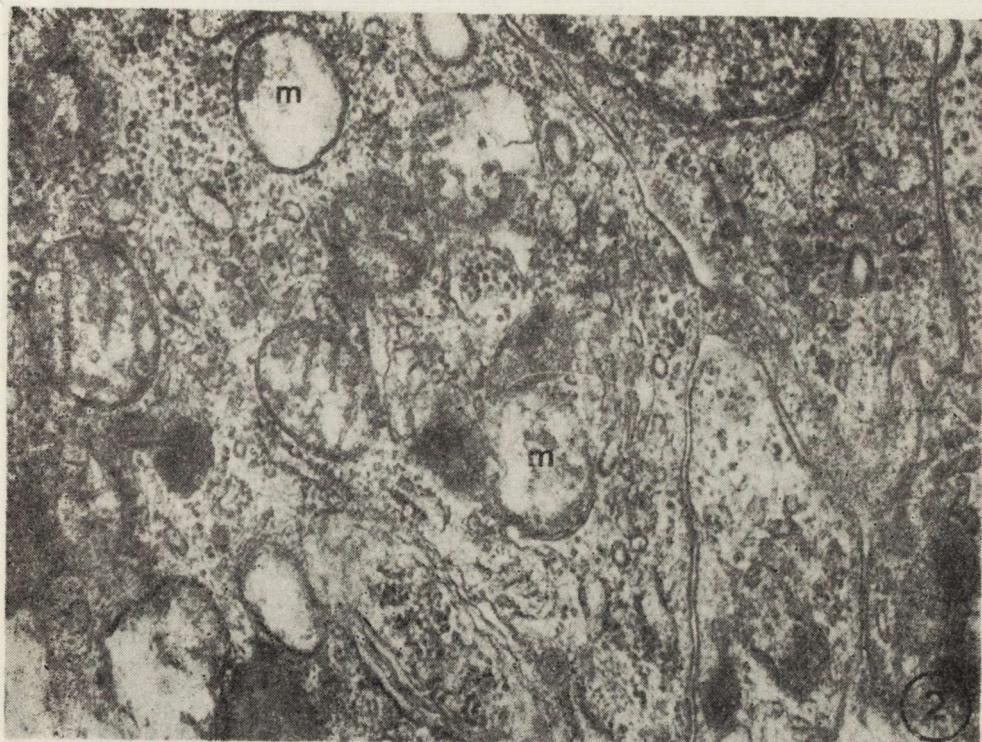
Gajkowska et al. 1983). These mitochondrial abnormalities are a result of manganese accumulation leading to their functional disorder and reflect an especially important relationship between manganese and mitochondria. It is also worth noting that within untreated, normal cells mitochondria are organelles, which are richest in Mn content and have served as starting material for the isolation of several manganese-containing metalloproteins (Leach, Lilburn 1978). Our attention was also drawn to the appearance of excessive amounts of glycogen and/or lipids associated with mitochondrial abnormalities in some manganese treated pituicytes. Similar observations were previously made in astrocytes in manganese treated cultures of rat striatum by Gajkowska et al.

Fig. 2. Group I. Pituicytes exhibiting swollen mitochondria devoid of cristae (m) and numerous glycogen particles in cytoplasm. $\times 13\ 350$

Ryc. 2. Grupa I. W cytoplazmie pituicytów obrzęknięte mitochondria pozbawione grzebieni (m) i liczne ziarna glikogenu. Pow. $13\ 350 \times$

Fig. 3. Group I. Pituicyte with altered nucleolus and well developed SER is visible. $\times 11\ 500$

Ryc. 3. Grupa I. Pituicyt ze zmienionym jąderkiem i dobrze rozwiniętą SER. Pow. $11\ 500 \times$



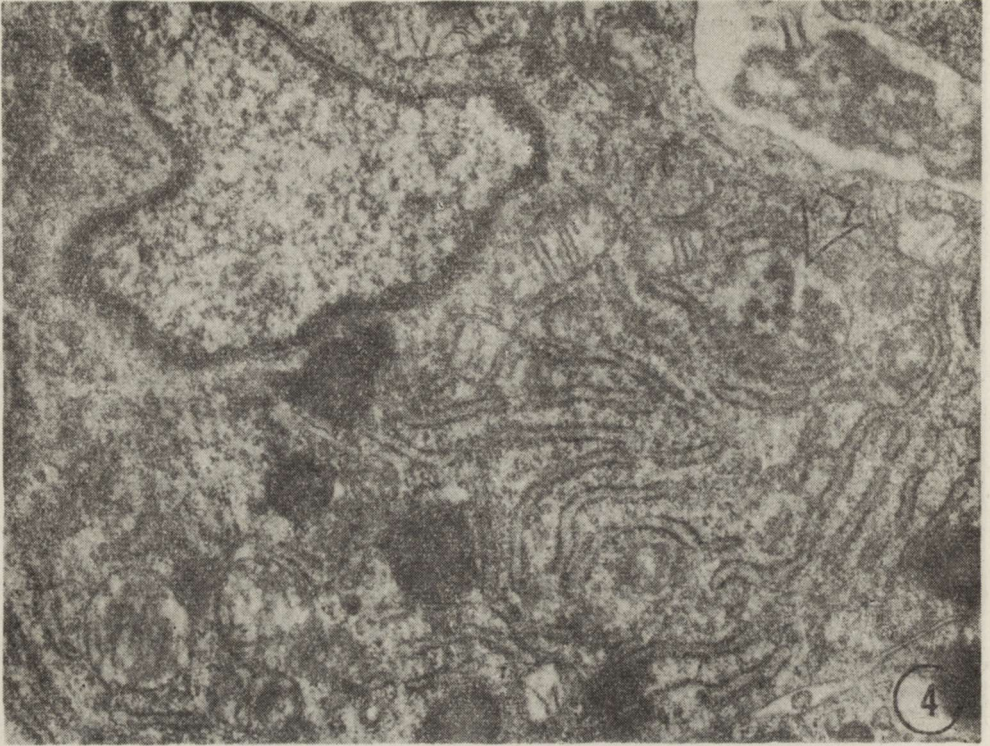


Fig. 4. Group I. Pituicyte. Note well developed RER, numerous lipid droplets and mitochondrion containing osmophilic bodies (arrow) in cytoplasm. $\times 13\ 350$

Ryc. 4. Grupa I. Pituicyt. W cytoplazmie widoczna dobrze rozwinięta RER, liczne krople lipidowe i mitochondrium zawierające ciała osmofilne (strzałka). Pow. $13\ 350 \times$

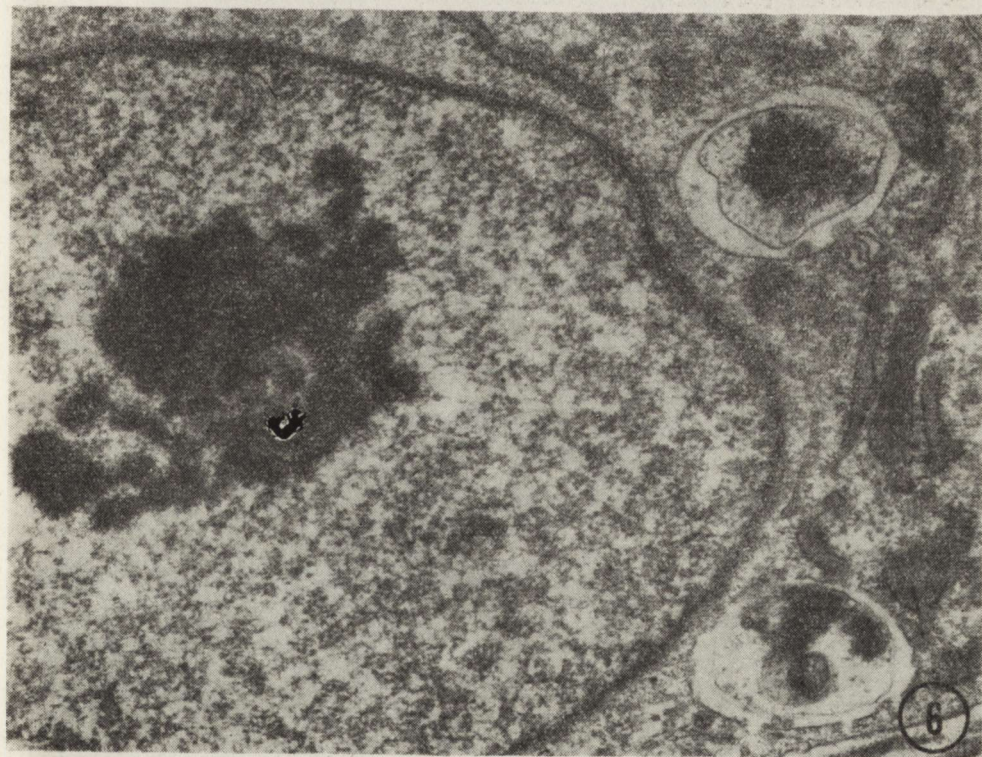
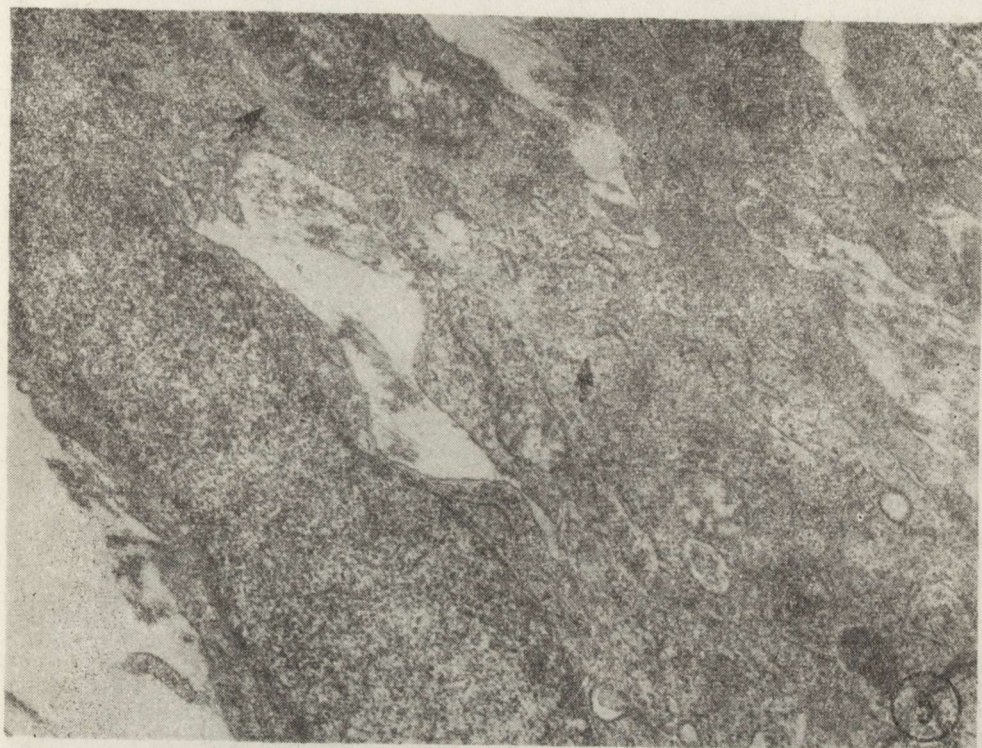
(1983). Following the hypothesis of Tassin and Brucher (1982) concerning the pathogenesis and etiological classification of mitochondrial disorders, these morphological pictures may be interpreted as a result of an enzyme deficiency within the Krebs cycle or in the respiratory chain. When there is an enzyme deficiency, carbohydrates, lipid metabolites and their precursors accumulate above the normal level. The findings of Fisher and Škreb (1980) that lactic acid production is stimulated in manganese

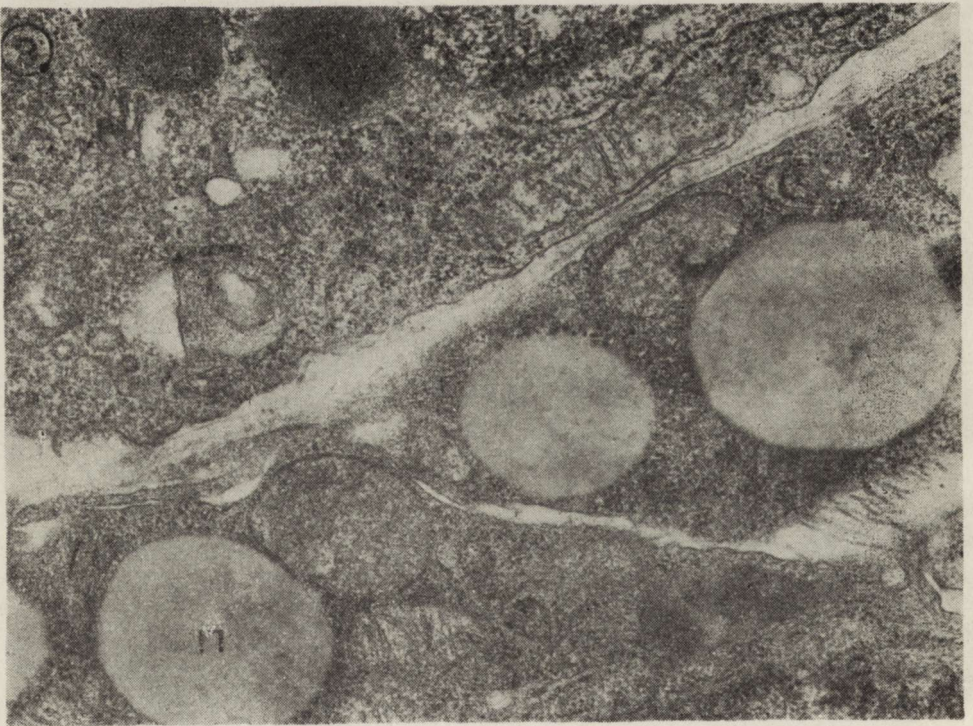
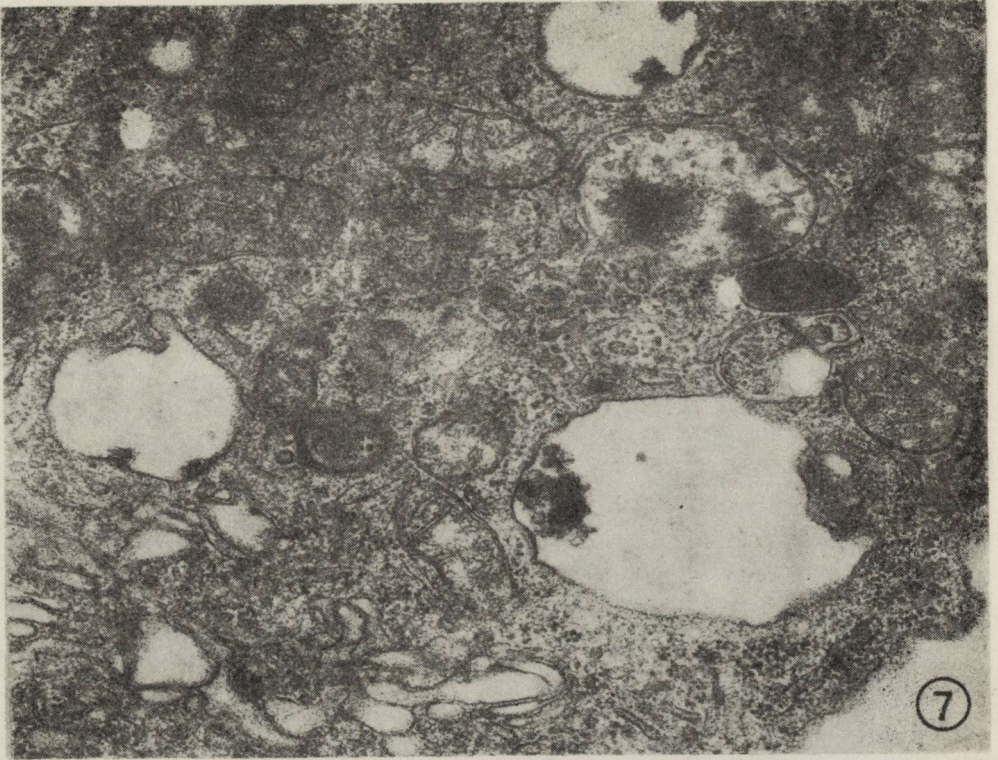
Fig. 5. Group I. Pituicytes. Swollen mitochondria and numerous filaments (arrows) are visible in cytoplasm. $\times 9\ 000$

Ryc. 5. Grupa I. Pituicyty. W cytoplazmie obrzęknięte mitochondria i liczne filamenty (strzałki). Pow. $9\ 000 \times$

Fig. 6. Group II. Pituicyte showing changed nucleolus. In cytoplasm mitochondria transformed in inclusion bodies, decreased number of free ribosomes and polyribosomes are visible. $\times 13\ 500$

Ryc. 6. Grupa II. Pituicyt ze zmienionym jąderkiem. W cytoplazmie widoczne mitochondria przekształcone w ciała wtrętowe, zmniejszona liczba wolnych rybosomów i polirybosomów. Pow. $13\ 500 \times$





treated cells *in vitro* may be explained as a compensatory mechanism following impairment of oxydative respiration. The same authors reported the inhibitory effects of manganese chloride on proliferation, colony formation and DNA synthesis in several mammalian cell lines. The depression of ^3H thymidine incorporation the authors explained by the direct effects of manganese on DNA or its influence on other cellular targets. Our morphological findings: alterations in cellular nuclei and decrease in the number of free ribosomes, polyribosomes and of RER profiles may suggest the inhibition of protein synthesis in treated pituicytes.

The appearance of filaments in large amounts in some pituicytes subjected to the influence of manganese chloride may be associated with unexpected change of the cytoskeleton organization. The possibility cannot be excluded, nevertheless, that this phenomenon may be related to adaptation of cells to specific culture conditions, which was previously reported (Weinstein, Kornblith 1971).

We do not know what quantities of manganese ions were taken up by the cells, during their exposure to metal action, but it can be supposed that considerable amounts of Mn must bind to the cells in a time and concentration-dependent manner. The ultrastructural abnormalities observed in the cells treated can be interpreted as a morphological expression of disturbances in cell metabolism caused by the toxic action of manganese. Ultrastructural alterations in cultured pituicytes were the sum of the effects resulting from numerous intracellular processes and membrane events. The rapidity and importance of mitochondrial reaction, however, must be stressed.

WPLYW MANGANU NA ULTRASTRUKTURĘ PITUICYTÓW *IN VITRO*

Streszczenie

Badano wpływ jonów manganu na obraz morfologiczny komórek glejowych (pituicytów) płata nerwowego przysadki szczura *in vitro*. Mangan wywołuje zaburzenia metabolizmu komórkowego które objawiają się charakterystycznymi zmianami morfologicznymi: uszkodzeniem mitochondriów, pojawianiem się nadmiernej ilości glikogenu, ciał lipidowych oraz filamentów. Stopień nasilenia zmian jest wprost proporcjonalny do stężenia jonów manganu w medium hodowlanym.

Fig. 7. Group II. Fragment of pituicyte cytoplasm with vacuoles containing osmophilic material is visible. $\times 13\ 350$

Ryc. 7. Grupa II. Fragment cytoplazmy pituicytu z wakuolą zawierającą materiał osmofilny. Pow. $13\ 350 \times$

Fig. 8. Group II. Pituicyte containing large lipid bodies in cytoplasm (Li). $\times 13\ 350$

Ryc. 8. Grupa II. Pituicyt. W cytoplazmie obecne duże ciała lipidowe (Li). Pow. $13\ 350 \times$

WLIANIE MARGANCA NA ULTRASTRUKTURĘ PITUIOCYTOW *IN VITRO*

Резюме

Исследовано влияние ионов марганца на морфологическую картину глиальных клеток (цитуйцитов) нервной доли гипофиза крысы *in vitro*. Марганец вызывает расстройства клеточного метаболизма, которые проявляются в характерных морфологических изменениях: повреждениях митохондрий, в появлении чрезмерного количества гликогена, липидных тел а также филаментов. Степень интенсивности изменений прямо пропорциональна к концентрации ионов марганца в культурной среде.

REFERENCES

1. Autissier N.: Captation de Mn^{2+} par les mitochondries apres perfusion du foie de rat normal et thyroïdectomisé. C. R. Soc. Biol. (Paris), 1974, 168, 509—513.
2. Chandra S. V., Srivastova S. P.: Experimental production of early brain lesions in rats by parenteral administration of manganese chloride. Acta Pharmacol. (Kbh), 1970, 28, 177—183.
3. Cotzias G. C.: Manganese in health and disease. Physiol. Rev., 1958, 38, 503—532.
4. Fisher A. B., Škreb Y.: Cytotoxicity of manganese for mammalian cells in vitro—comparison with lead, mercury and cadmium. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 1980, 171, 523—537.
5. Gajkowska B., Kraśnicka Z., Śmiałek M.: Wpływ jonów manganowych (Mn^{++}) na obraz morfologiczny hodowanej tkanki nerwowej. Neuropat. Pol., 1983, 21, 203—220.
6. Gajkowska B., Zaręba-Kowalska A.: Endoplasmic reticulum reaction in cultured pituicytes in response to hypophysial stalk transection. Neuroendocrinol. Lett., 1983, 5, 87—92.
7. Graham J. A., Donald E., Waters M. D., Coffin D. L.: Effect of trace metals on phagocytosis by alveolar macrophages. Infect. Immun. 1975, 11, 1278—1283.
8. Leach R. M., Lilburn M. S.: Manganese metabolism and its function. World Rev. Nutr. Diet., (Basel), 1978, 32, 123—134.
9. Murray M. J., Flessel C. P.: Metal-polynucleotide interactions. A comparison of carcinogen and noncarcinogenic metals *in vitro*. Biochim. Biophys. Acta, 1976, 425, 256—261.
10. Rehnberg G. L., Hein J. F., Carter S. D., Laskey J. W.: Chronic manganese oxide administration to preweanling rats: Manganese accumulation and distribution. J. Toxicol. Environ. Health, 1980, 6, 217—226.
11. Sunderman F. W.: Carcinogenic effects of metals. Fed. Proc. 1978, 37, 40—46.
12. Śmiałek M., Mossakowski M. J.: Patomorfologia ośrodkowego układu nerwowego szczurów w zatruciu związkami manganu. Neuropat. Pol., 1981, 19, 377—387.
13. Tassin S., Brucher J. M.: The mitochondrial disorders: Pathogenesis and etiological classification. Neuropath. appl. Neurobiol., 1981, 8, 251—263.
14. Ulmer D. D.: Metals—from privation to pollution. Fed. Proc., 1973, 32, 1758—1762.
15. Underwood E. J.: Trace elements in human and animal nutrition. 4th ed., Academic Press, New York 1977, 170—195.

16. Utter M. F.: The biochemistry of manganese. *Med. Clin. North Am.*, 1976, 60, 713—727.
17. Weinstein R. S., Kornblith P. L.: Ultrastructure of a cloned astrocytoma in tissue culture. *Cancer*, 1971, 27, 1174—1181.
18. Zaręba-Kowalska A., Renkawek K., Gajkowska B.: Ultrastructural study of the hypophysial neural lobe of newborn rats in tissue culture. *Cell Tiss. Res.*, 1983, 230, 463—468.

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

DZIAŁ KRONIKI I INFORMACJI

W 1983 r. na comiesięcznych posiedzeniach Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich przedstawiono następujące doniesienia:
22 stycznia 1983 r.

— P. P. Liberski (Klinika Neurologii AM Łódź) — „Komórki tuczne w klastrowym bólu głowy”.

— J. Szymaś, W. Liebert (Zakład Anatomii Patologicznej AM, Poznań) — „Glejak wieloogniskowy”.

19 lutego 1983 r.

— L. Iwanowski (Pracownia Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN, Warszawa) — „Niektóre aspekty badań nad mechanizmem powstawania złogów amyloidu w doświadczalnej scrapie i na materiale sekcyjnym”.

— P. P. Liberski (Klinika Neurologii AM, Łódź) — „Eksperymentalna scrapie u chomików”.

18 marca 1983 r.

— J. Kulczycki, H. Kroh (Instytut Psychoneurologiczny i CMDiK PAN, Warszawa) — „Ciałka wstrząsowe w naczyniach mózgu”.

— M. Półtorak, A. Członkowska, K. Nowicka (Instytut Psychoneurologiczny, Warszawa) — „Przypadek przewlekłej białaczki limfatycznej ze zmianami w płynie mózgowo-rdzeniowym — analiza immunologiczna”.

22 kwietnia 1983 r.

— D. Maślińska (Pracownia Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN, Warszawa) — „Metabolizm serotoniny (5-HT) w mózgu po podaniu związku fosforoorganicznego — dichlorfosu”.

— A. Kędzia (Zakład Anatomii Prawidłowej AM, Wrocław) — „Obraz żył mostkowych w różnych okresach życia człowieka i ich rola w patogenezie krwinków podtwardówkowych”.

20 maja 1983 r.

— A. Jędrzejewska (Pracownia Neuropatologii Zakładu Diagnostyki Patomorfologicznej CMKP, Warszawa) — „Obraz neuropatologiczny śródściennego układu wegetatywnego przewodu pokarmowego szczura, świnki morskiej i człowieka”.

— J. Kałuża, D. Adamek (Pracownia Neuropatologii Instytutu Neurologii AM, Kraków) — „*Ependymoma globocellulare*”.

21 października 1983 r.

— D. Maślińska (Pracownia Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN, Warszawa) — „Wpływ cyklofosfamidę na elementy strukturalne mózgu królika w okresie rozwoju”.

— M. Dąmbska (Pracownia Neuropatologii Rozwojowej CMDiK PAN, Warszawa) — „Mielinizacja mózgu królika pod wpływem działania cyklofosfamidę”.

18 listopada 1983 r.

— P. P. Liberski, W. Papierz, J. Alwasiak (Klinika Neurologii AM, Zakład Anatomii Patologicznej AM, Zakład Onkologii AM, Łódź) — „Przypadek przekazy-

walnej encefalopatii gąbczastej z nietypowym obrazem neuropatologicznym. Badania w mikroskopie świetlnym i elektronowym”.

— P. P. Liberski (Klinika Neurologii AM, Łódź) — „Przekazywanie atypowej encefalopatii gąbczastej na chomiki”.

16 grudnia 1983 r.

— A. Wajgt (Klinika Neurologii AM, Poznań) — „Badania nad izolacją i immunogennością MAG (myelin associated glycoprotein)”.

— J. Szymaś, A. Wajgt (Zakład Anatomii Patologicznej Instytutu Biostruktury AM, Klinika Neurologii AM, Poznań) — „Identyfikacja morfologiczna MAG w glęzajkach mózgu”.

*

11 VI 1983 r. odbyło się w Gdańsku Walne Zebranie Sprawozdawczo-Wyborcze Sekcji Neurologii Rozwojowej Polskiego Towarzystwa Neurologicznego.

Przewodniczącą Sekcji wybrana została kol. Jagna Czochońska, w skład Zarządu weszły kol. Katarzyna Szelożyńska i Krystyna Matheisel.

*

12 stycznia 1984 r. odbyło się w Instytucie Psychoneurologicznym w Warszawie posiedzenie Krajowego Zespołu Specjalistycznego w dziedzinie neurologii. Posiedzeniu przewodniczył prof. dr hab. Ignacy Wald. Podsumowano roczną działalność Zespołu, przyjęto sprawozdanie oraz przedstawiono plan działania na 1984 r.

Dalszą część posiedzenia poświęcona była omówieniu bieżącej sytuacji i perspektyw rozwoju neurologicznej opieki zdrowotnej. Zwrócono przede wszystkim uwagę na brak średniego i niższego personelu w wielu oddziałach neurologicznych, jak również na zbyt małą liczbę neurologów, neuropatologów i patomorfologów, co utrudnia znacznie weryfikację rozpoznań klinicznych. Mówiono także o potrzebie podyplomowego szkolenia lekarzy neurologów, wskazując na trudności w zorganizowaniu systematycznego dokształcania lekarzy specjalistów I i II stopnia oraz na potrzebę prowadzenia kursów z zakresu neuropatologii w innych ośrodkach, poza Instytutem Psychoneurologicznym. Instytut ten w ramach dwóch kursów rocznie nie jest w stanie przeszkolić w zakresie neuropatologii wszystkich neurologów, przygotowujących się do egzaminu II stopnia. Ostatnio sytuacja w tym zakresie poprawiła się dzięki temu, że ośrodek krakowski (prof. J. Kałuża) i łódzki (dr med. W. Papierz) podjęli inicjatywę szkolenia na kursach neurologów ze swojego rejonu. Ponadto uznano, że należałoby dla neurologów — specjalistów I i II stopnia — wprowadzić obowiązkowe szkolenia, poświęcone postępom w dziedzinie diagnostyki i terapii podstawowych chorób neurologicznych, podobne do tych, jakie są organizowane dla ordynatorów oddziałów neurologicznych.

Na zakończenie posiedzenia ustalono treść memoriału Krajowego Zespołu Specjalistycznego dla Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej, w sprawach wymagających pilnego rozwiązania.

*

14 stycznia 1984 r. w Sali Lustrzanej Pałacu Staszica w Warszawie odbyła się uroczysta Sesja Naukowa dla uczczenia XX rocznicy śmierci Prof. Adama Opalskiego. Sesję zorganizowały Zarządy Główne Polskiego Towarzystwa Neurologicznego oraz Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich.

Z okazji Sesji zorganizowana została wystawa prac naukowych, pamiątek i dokumentów, związanych z działalnością Prof. Opalskiego.

Jerzy Dymecki

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

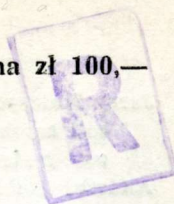
Jednostki gospodarki uspołecznionej, instytucje, organizacje i wszelkiego rodzaju zakłady pracy zamawiają prenumeratę w miejscowych Oddziałach RSW „Prasa-Książka-Ruch”, w miejscowościach, w których nie ma Oddziałów RSW — w urzędach pocztowych. Czytelnicy indywidualni opłacają prenumeratę wyłącznie w 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 za granicę jest droższa od prenumeraty krajowej o 50% dla zlecniodawców indywidualnych i o 100% dla zlecających instytucji i zakładów pracy.

Jerzy Kulczycki, Maria Koziak, Lucyna Szemis, Danuta Wierzbicka: Hürthle-cell carcinoma of the thyroid gland with metastases to the central nervous system	245
Andrzej Suliński, Janina Rostkowska, Włodzimierz Bicz: Acetylcholinesterase activity in rat brain after exposure of the animals to raised temperature of the environment	257
Lubomira Dydyk, Mirosław J. Mossakowski: Ultrastructural alterations of the grey matter structures of the brain due to experimental manganese intoxication	265
Anna Zareba-Kowalska, Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski: The effect of manganese on the ultrastructure of pituicytes <i>in vitro</i>	281
Chronicle and information (Jerzy Dymecki)	293

СОДЕРЖАНИЕ

Мирослав Я. Моссаковский, Халина Вейнраудер: Иммуноморфология печеночной глиопатии <i>in vitro</i>	161
Войцех Хильгер, Ян Альбрехт: Уровень аммиака и его метаболитов в экспериментальной печеночной энцефалопатии во время продленного действия тиаоацетамида и в периоде полного восстановления	179
Мирослав Я. Моссаковский, Ежи В. Борович, Войцех Хильгер: Электронно-микроскопная картина печеночной энцефалопатии у крыс отравленных тиаоацетамидом	185
Уршуля Вымык-Цыбуля: Исследование метаболизма γ -аминомасляной кислоты (GABA) в головном мозгу крысы в экспериментальной печеночной энцефалопатии вызванной четыреххлористым углеродом	197
Ирмина Б. Зельман, Анна Тарашевска: Патология миелина у кролика <i>pt.</i>	205
Лех Ивановски: Картина головногомозгового миелина старых крыс (предварительное сообщение).	219
Дариуш Адамак, Юзеф Калужа, Витольд Межиньски, Талеуш Малэк: Злокачественные шванномы у детей. Патоморфология и клинический эпикриз	225
Ежи Кульчицки, Мария Козик, Люцына Шемис, Данута Вежбицка: Рак щитовидной железы происходящей из клеток Гюртля с метастазами в центральную нервную систему	245
Анджей Сулиньски, Янина Ростковска, Влодзимеж Бич: Активность ацетилхолинэстеразы головного мозга крысы вследствие экспозиции животных на повышенную температуру окружающей среды	257
Любомира Дыдык, Мирослав Я. Моссаковский: Ультраструктурные повреждения серого вещества головного мозга в экспериментальном отравлении марганцем	265
Анна Заремба-Ковальска, Барбара Гайковска, Мирослав Я. Моссаковский: Влияние марганца на ультраструктуру питуицитов	281
Хроника и информация (Эжи Дымсцки)	293



SPIS TREŚCI

Mirosław J. Mossakowski, Halina Weinrauder: Immunomorfologia gliopatii wątrobowej <i>in vitro</i>	161
Wojciech Hilgier, Jan Albrecht: Poziom amoniaku oraz jego metabolitów w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej podczas przedłużonego działania tioacetamidu i w okresie powrotu do normy	179
Mirosław J. Mossakowski, Jerzy W. Borowicz, Wojciech Hilgier: Mikroskopowo-elektronowy obraz encefalopatii wątrobowej u szczurów w zatruciu tioacetamidem	185
Urszula Wysmyk-Cybula: Badania metabolizmu kwasu γ -aminomasłowego (GABA) w mózgu szczura w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej wywołanej czterochlorkiem węgla	197
Irmina B. Zelman, Anna Taraszewska: Patologia mieliny u królika pt	205
Lech Iwanowski: Obraz mieliny mózgowej starych szczurów. Doniesienie wstępne	219
Dariusz Adamek, Józef Kałuża, Witold Mieżyński, Tadeusz Małek: Oślioniaki złośliwe (<i>schwannoma malignum</i>) u dzieci. Patomorfologia i epikryza kliniczna	225
Jerzy Kulczycki, Maria Koziak, Lucyna Szemis, Danuta Wierzbicka: Rak tarczycy wywodzący się z komórek Hürthlego z przerzutami do ośrodkowego układu nerwowego	245
Andrzej Suliński, Janina Rostkowska, Włodzimierz Bicz: Aktywność acetylocholinoesterazy mózgu szczura w następstwie ekspozycji zwierząt na podwyższoną temperaturę otoczenia	257
Lubomira Dydyk, Mirosław J. Mossakowski: Uszkodzenia ultrastrukturalne istoty szarej mózgu w doświadczalnym zatruciu manganem	265
Anna Zaręba-Kowalska, Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski: Wpływ manganu na ultrastrukturę pituicytów <i>in vitro</i>	281
Dział kroniki i informacji (Jerzy Dymecki)	293

CONTENT

Mirosław J. Mossakowski, Halina Weinrauder: Immunomorphology of Wilsonian and hepatic gliopathy <i>in vitro</i>	161
Wojciech Hilgier, Jan Albrecht: The level of ammonia and its metabolites in experimental hepatogenic encephalopathy induced by prolonged administration of thioacetamide and during recovery	179
Mirosław J. Mossakowski, Jerzy W. Borowicz, Wojciech Hilgier: Electron microscopy of hepatogenic encephalopathy in rats induced by thioacetamide intoxication	185
Urszula Wysmyk-Cybula: The level of γ -aminobutyric acid (GABA) and the activity of GABA metabolizing enzymes in the rat brain in hepatic encephalopathy induced by administration of carbon tetrachloride	197
Irmina B. Zelman, Anna Taraszewska: Pathology of myelin in pt rabbit	205
Lech Iwanowski: Myelin in the senile rat brain. Preliminary report	219
Dariusz Adamek, Józef Kałuża, Witold Mieżyński, Tadeusz Małek: Malignant schwannoma in children. Pathomorphology and clinical epicrisis	225