

2p
ep 2
PL ISSN 0028-3894

STOWARZYSZENIE
NEUROPATOLOGÓW POLSKICH

NEUROPATOLOGIA POLSKA

A-23

TOM 22

1984

ZESZYT 3

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

<http://rcin.org.pl>

NEUROPATHOLOGIA POLSKA

KWARTALNIK

TOM 22

1984

ZESZYT 3

KOMITET REDAKCYJNY

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

PRZY WSPÓŁPRACY

Ludo van Bogaret (Antwerpia), Werner Jänisch (Halle), Igor Klatzo (Bethesda),
Istvan Környey (Pécs), 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. 11, ark. druk. 10, ark.
A₁-13. Papier druk. sat. kl. III, 80 g, 70 × 100. Oddano do skła-
dania 26 IV 1984. Podpisano do druku 19 IX 1984. Druk ukończono
w październiku 1984. Wrocławska Drukarnia Naukowa. Zam. 216/84.
Z-6. Cena zł 100.—



MIROŚLAW BERNARD KOZIK
1928—1983

12 lipca 1983 r. zmarł po ciężkiej, wyniszczającej chorobie prof. dr hab. nauk medycznych Mirosław B. Kozik, Kierownik Kliniki Neurologicznej i Zakładu Neuropatologii Wydziału Pielęgniarskiego Akademii Medycznej w Poznaniu, współtwórca współczesnej neuropatologii w Polsce, znakomity organizator i inspirator życia naukowego, oddany nauczyciel i wychowawca.

Mirosław B. Kozik urodził się w 1928 r. w Kościanie. Jako kilkunastoletni chłopiec podzielił wojenne losy Polaków zamieszkujących tereny Wielkopolski włączone do Rzeszy. Wysiedlony z miejsca zamieszkania, w krótkim czasie zamienił klasę szkolną na warsztat fabryczny w wytwórni samolotów w Mielcu. Do nauki powrócił dopiero po zakończeniu wojny. Po ukończeniu Gimnazjum Ogólnokształcącego w Skwierzynie na Ziemiach Zachodnich, w 1948 r. podjął studia lekarskie na

Uniwersytecie Poznańskim, kontynuowane następnie w Akademii Medycznej w Poznaniu. Dyplom lekarza uzyskał w 1953 r. Stopień naukowy doktora medycyny nadała mu Rada Wydziału Lekarskiego macierzystej uczelni w 1963 r. na podstawie pracy: „Badania cytochemiczne i cytofotometryczne neuronu w krwotoku mózgowym”, wykonanej pod kierunkiem prof. A. Dowženki. Ta sama Rada Wydziału w 1969 r. nadała mu stopień doktora habilitowanego nauk medycznych na podstawie rozprawy: „Zmiany zwyrodnieniowe neuronu w świetle badań doświadczalnych”. Profesorem nadzwyczajnym został w 1978 r. Na miesiąc przed Jego śmiercią Rada Wydziału Pielęgniarskiego Akademii Medycznej w Poznaniu podjęła uchwałę zatwierdzoną następnie przez Senat uczelni, o wystąpieniu z wnioskiem o nadanie Mu tytułu profesora zwyczajnego.

Jako student II roku Wydziału Lekarskiego podjął pracę w Zakładzie Histologii i Embriologii macierzystej uczelni, rozpoczynając swoją ponad trzydziestoletnią karierę badacza. Tu kształtowały się Jego podstawowe zainteresowania neuromorfologa, które tak konsekwentnie i owocnie rozwijał w późniejszej działalności naukowej, stąd wyrastały korzenie Jego bogatego, stale rozwijanego i wzbogacanego warsztatu metodycznego. Te właśnie doświadczenia i wynikające z nich idee sprawiły, że w dojrzałym życiu zawodowym Mirosława Kozika przeplatały się i uzupełniały dwa nurty: klinicysty-neurologa i badacza-neuropatologa.

Po ukończeniu studiów związał się z Poznańską Kliniką Neurologiczną. W niej uzyskał pełne wykształcenie w zakresie neurologii i neuropatologii, uzupełniane w ciągu kolejnych lat na licznych stażach naukowych, z których najbardziej znaczący i owocny okazał się półroczny pobyt w Instytucie Neurologicznym im. Obersteinerera na Uniwersytecie w Wiedniu. W Klinice Neurologicznej w Poznaniu przeszedł kolejne szczeble kariery młodego nauczyciela akademickiego od asystenta do docenta. Tu z inspiracji prof. A. Dowženki podejmuje trud stworzenia pracowni histopatologii układu nerwowego, jednej z pierwszych w powojennej Polsce. Wykorzystując swoje umiejętności wyniesione z Zakładu Histologii i Embriologii wzbogaca ją wkrótce o laboratorium histochemiczne, autoradiograficzne i mikroskopii elektronowej. W 1970 r. dotychczasowa pracownia przykliniczna zostaje przekształcona w Samodzielną Pracownię Patologii Układu Nerwowego i Narządów Zmysłów Akademii Medycznej w Poznaniu, a jej kierownictwo obejmuje Mirosław Kozik. Uzyskanie samodzielnego statusu wyzwala Jego nowe inicjatywy, rodzi nowe koncepcje i zamierzenia. Rozbudowuje placówkę lokalowo. Powstają w niej nowe pracownie — badań laserowych i komputerowej analizy obrazów mikroskopowych. Rasowy badacz-eksperymentator, niezwykle wielką wagę przywiązuje do jakości i wszechstronności metodycznego warsztatu badawczego, stawiając w tym względzie najwyższe wymagania, sobie i innym. Tu tkwi właśnie źródło stałego dążenia do doskonalenia i unowocześniania warsztatu oraz organizowa-

nia wielospecjalnościowego i wielometodycznego zespołu, jako warunku wszechstronnej analizy podejmowanych problemów i zadań. Gromadzi wokół siebie zespół młodych pracowników, którym bliska jest tematyka biologii i patologii układu nerwowego, kształci ich, specjalizuje, doktoryzuje, stawiając coraz wyższe cele i coraz wyższe wymagania.

Zakład Neuropatologii, w który w 1978 r. zostaje przekształcona dotychczasowa Pracownia, stanowiący Jego podstawowy warsztat badawczy, produkt Jego koncepcji, wysiłków i zabiegów, staje się jednym z przodujących ośrodków neuropatologicznych w kraju i liczącym się ogniwem europejskich nauk neurobiologicznych. W 1982 r. powraca raz jeszcze do pracy klinicznej podejmując się łącznego prowadzenia Kliniki Neurologicznej i Zakładu Neuropatologii Wydziału Pielęgniarskiego Akademii. Związanych z tym planów i zamierzeń nie zdążył już w pełni zrealizować.

W dorobku naukowym prof. Mirosława Kozika, zamykającym się liczbą 186 publikacji i 159 komunikatów zjazdowych i konferencyjnych przewijają się dwa zasadnicze nurty wzajemnie się przenikające i uzupełniające. Kierunek pierwszy, chronologicznie wcześniejszy to zagadnienia diagnostyki i terapii chorób układu nerwowego, drugi zaś obejmuje badania z zakresu klinicznej i doświadczalnej neuropatologii oraz neuromorfologii. Podział ten, acz ułatwiający próbę podsumowania dokonania badawczych prof. Kozika, nie jest ani do końca prawdziwy, ani w pełni słuszny. Cele i ukierunkowania kliniczne określały bowiem i dominowały również i drugi obszar jego zainteresowań. Mirosław Kozik nigdy nie przestał być klinicystą-neurologiem. Był nim jako asystent Kliniki Neurologicznej i jako Kierownik Zakładu Neuropatologii, w równej mierze przy łóżku chorego i za stołem laboratoryjnym. W swoich poszukiwaniach naukowych nie sięgał po tematy efektowne, łatwo wprowadzające na karty podręczników. Podejmował zagadnienia trudne, praco- i czasochłonne, służące jednak najlepiej wyjaśnianiu problemów patologii mózgu, zawsze związane z kliniczną codziennością i potrzebami chorego.

Nurt kliniczny w publikowanym dorobku Profesora Kozika, związany przede wszystkim z wczesnym okresem działalności w Poznańskiej Klinice Neurologicznej, reprezentują zróżnicowane tematycznie prace, poświęcone wielu aspektom diagnostyki i patogenetyki chorób neurologicznych. Na specjalną uwagę zasługują opracowania dotyczące odległych następstw urazów czaszkowo-mózgowych. Autor wykazał w nich występowanie zaburzeń mechanizmów neuroregulacyjnych, uwarunkowanych uszkodzeniem podwzgórzowo-przysadkowego układu wewnątrzwydzielniczego, a zaproponowane przez Niego testy kliniczne mają istotną wartość diagnostyczną w poszukiwaniu obiektywnych wykładników subiektywnych dolegliwości zgłaszanych przez chorych po przebytych zamkniętym urazie czaszki. Należy tu również odnotować badania z za-

kresu diagnostyki różnicowej udarów mózgu o odmiennej etiopatogenezie, których wyniki prowadziły do rewizji dotychczasowych, utrwalonych poglądów klinicznych i do zmiany postępowania lekarskiego. Obok zbiorczych opracowań analitycznych w grupie tej znajduje się niemało opisów kazuistycznych, poświęconych rzadkim zespołom klinicznym lub nietypowemu przebiegowi i klinicznej manifestacji procesu chorobowego. Opracowania te wystawiają chlubne świadectwo wnikliwości lekarskiej Autora i niewątpliwie wzbogacają zasób wiedzy z zakresu neurologii klinicznej. Spora część prac tej grupy dotyczy zwyrodnieniowych chorób układu nerwowego. Jest to ta dziedzina neurologii, w której, wobec nieznamości czynników etiologicznych, mechanizmów patogenetycznych, a nierzadko i pełnej, fenotypowo zmiennej symptomatologii klinicznej, każde wnikliwe, analityczne opracowanie może mieć znaczącą wartość poznawczą. Taki właśnie charakter ma większość publikacji Mirosława Kozika w tym zakresie, wśród których chciałbym wymienić prace poświęcone postępującemu połowiczemu zanikowi ciała, zespołowi nawracającej senności Kleinego—Levina i patogenezie *arthrogryposis multiplex*. Wprawdzie jak wspomniałem poprzednio, opracowania kazuistyczne pochodzą przede wszystkim z wczesnego okresu działalności Mirosława Kozika, powracał do nich jednak i później. Nie omijał żadnej okazji, aby podzielić się z czytelnikami swoimi nowymi spostrzeżeniami i wynikami dociekań, opartych o wzbogacony warsztat metodyczny badań. Reprezentują je między innymi unikalne opracowania histochemiczne przypadków *cardiac arrest* i podostrego stwardniającego zapalenia mózgu.

Głównym nurtem zainteresowań naukowych prof. Mirosława Kozika były doświadczalne badania neuromorfologiczne i neuropatologiczne, prowadzone przy zastosowaniu technik histochemicznych, autoradiograficznych, mikroskopowo-elektronowych i analizy laserowej. Przewija się w nich kilka zasadniczych grup tematycznych, realizowanych w istocie przez całe życie zawodowe Autora, różnie tylko akcentowanych i eksponowanych w poszczególnych jego okresach.

Wiele miejsca wśród nich zajmują badania nad neurosekrecją, zapoczątkowane i prowadzone przez szereg lat w ścisłej współpracy z Zakładem Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Poznaniu. Przyniosły one wnikliwy i systematyczny opis struktur układu podwzgórzowo-przysadkowego oraz histochemiczną analizę procesu neurosekrecyjnego u zwierząt doświadczalnych i ludzi. Szczególną uwagę zwrócono przy tym na udział poszczególnych struktur komórkowych w produkcji neurosekretu, jego transporcie i wydzielaniu, a także na przemiany chemiczne zachodzące w czasie transportu. W kolejnej serii prac oceniono wpływ różnorodnych czynników doświadczalnych, takich jak: dieta gnilcorodna, wstrząsy elektryczne, napady drgawkowe, niedocukrzenie, podawanie środków moczopędnych, ACTH, wyciągów z przysadki, witaminy E i in.,

na morfologiczny i histochemiczny obraz struktur neurosekrecyjnych oraz na proces neurosekrecji. W ostatnich latach cykl ten znalazł swoje cenne uzupełnienie w badaniach nad działaniem toksycznych związków cynku i rtęci, stanowiących czynne komponenty pestycydów i insektycydów oraz substancji o działaniu cytostatycznym. Wszystkie prace z tej grupy, nawet te najdawniejsze, pochodzące z wczesnego okresu działalności, znamionuje oryginalność, nowatorstwo i charakterystyczne dla Mirosława Kozika kliniczne motywacje i ukierunkowania, a także poszukiwanie odniesień do sytuacji chorego człowieka. Do dziś stanowią one cenny morfologiczny wkład do doświadczalnej neuroendokrynologii.

Specjalną pozycję w dorobku Mirosława Kozika zajmują prowadzone wspólnie z Mieczysławem Wenderem badania nad biologicznymi właściwościami neurogleju. Zapoczątkowały je prace histologiczne i histochemiczne, uzupełnione następnie analizą mikroskopowo-elektronową i autoradiograficzną, a także ilościowymi metodami histochemicznymi, dotyczące przemian astrocytów i oligodendrocytów w procesie osobniczego dojrzewania. Pozwoliły one na ustalenie i zrozumienie sekwencji rozwoju komórki gwiaździstej i skąpowypustkowej oraz wykazanie jego zależności od faz dojrzewania poszczególnych strukturalno-czynnościowych układów mózgu i ich metabolizmu. Stanowiły one również punkt wyjścia do oceny przemian gleju w okresie mielinizacji ośrodkowego układu nerwowego. Cechą znamionową, wyróżniającą je wśród innych opracowań w tym zakresie, jest fakt, iż obejmują one nie tylko okresy czynnej mielinizacji i fazę bezpośrednio premielinizacyjną, lecz również stadia poprzedzające mielinogenezę z jednej strony i etap zakończonej mielinizacji z drugiej. Stwarzało to warunki do prześledzenia dynamiki histochemicznych przeobrażeń gleju, stanowiących wykładniki metabolicznych transformacji związanych z procesem mielinogenezy i udowodnienia odrębności zjawisk metabolicznych w astrocytach i oligodendrocytach. Prowadzenie badań na porównawczym materiale zwierzęcym i ludzkim pozwalało z kolei prześledzić odmienności histochemiczne oraz histoenzymatyczne występujące u ludzi w porównaniu z różnymi gatunkami zwierząt doświadczalnych. Rozszerzenie cyklu o badania dojrzewającego nerwu wzrokowego, ze względu na jego morfologiczną odrębność i tkankową jednorodność, wzbogaciło wiedzę o poznanie zależności zróżnicowania przemian glejowych od charakteru różnych strukturalno-czynnościowych układów mózgowia. Zajęcie się problematyką aktywności histoenzymatycznej gleju w procesach demielinizacyjnych stanowiło już tylko logiczną konsekwencję i kontynuację badań poprzednich.

Różnorodność doświadczalnych modeli demielinizacji, w tym doświadczalnego alergicznego zapalenia mózgu i rdzenia, zatrucia cyjanami i organicznymi związkami cyny, wtórnej demielinizacji typu wallerowskiego, z ich uzupełnieniem unikalnymi w piśmiennictwie neuropatologicznym histochemicznymi opisami podostrej postaci stwardnienia roz-

sianego i podostrego stwardniającego zapalenia mózgu, a także metodyczne wzbogacenie badań o techniki mikroskopii elektronowej, stworzyły szeroką skalę analizy porównawczej. Pozwoliły równocześnie na udowodnienie zróżnicowanej reakcji astro- i oligodendrogleju w różnych rodzajach i typach demielinizacji oraz jej precyzyjną charakterystykę. Szczególnie cenne i oryginalne są w tym zakresie spostrzeżenia dotyczące przemian histoenzymatycznych oligodendrogleju w fazie poprzedzającej rozpad osłonek mielinowych oraz ich dynamiki w różnych fazach demielinizacji. Ich efektem jest wprowadzenie pojęcia metabolicznej reaktywności komórki skąpowypustkowej. Nie można tu również pominąć obserwacji dotyczących metabolicznego zróżnicowania morfologicznie jednorodnych populacji glejowych, opartych o analizę wbudowywania piętnowanych prekursorów białek i kwasów nukleinowych. Ważnym rozszerzeniem cyklu są pochodzące z ostatniego okresu działalności Profesora Kozika badania neurotoksycznego działania związków cynku i rtęci oraz substancji cytostatycznych. Wykazano w nich bowiem nie tylko, że odczyn glejowy, zróżnicowany w poszczególnych typach i odmianach, stanowi pierwotny składnik reakcji tkankowej na działanie związków toksycznych, lecz także i to, że ma on zasadniczo odmienny charakter i topografię w zależności od stopnia dojrzałości tkankowej i postaci chemicznej czynnika uszkodzającego.

Ten właśnie cykl „glejowy”, przewijający się przez wszystkie etapy działalności Mirosława Kozika, stopniowo uzupełniany i wzbogacany, charakteryzujący się wielokrotnymi zmianami i modyfikacjami ogólnej koncepcji, bodaj najlepiej ilustruje konsekwencję jego poszukiwań i metodę pracy badawczej. Stanowi również jego niepodważalny wkład w poznawanie funkcji tej najmniej rozszyfrowanej tkanki żywego organizmu.

Nie uszły uwadze Profesora Kozika również problemy patologii podstawowego składnika tkanki nerwowej — neuronu. W tym obszarze skoncentrował się On na patomechanizmie tzw. nieswoistych zwyrodnień komórek nerwowych. I znów zgodnie z przyjętym ogólnym metodycznym założeniem, przeprowadza rozległe cykle badań na zróżnicowanym spektrum modeli doświadczalnych, nie pomijając dostępnego materiału klinicznego i wykorzystuje wszystkie, będące w jego zasięgu techniki i metody morfologiczne. Wykazuje jednoznacznie, że w zależności od właściwości podłoża tkankowego, uwarunkowanych odrębnościami metabolicznymi i stopniem dojrzałości, działanie tego samego czynnika może leżeć u podłoża różnego typu zwyrodnień neuronalnych, i na odwrót, że różne czynniki mogą wywoływać ten sam typ uszkodzeń neuronu. Profesor Kozik scharakteryzował dynamikę zaburzeń histochemicznych towarzyszących różnym rodzajom zwyrodnień komórkowych, udowadniając, że mogą one stanowić kolejne stadia tego samego procesu oraz określając cechy i granice odwracalności nieswoistych zwyrodnień neuronalnych. Waga spostrzeżeń Mirosława Kozika leży przede wszystkim w tym, że

nieswoiste zwyrodnienia komórkowe stanowią do dziś przedmiot głębokich kontrowersji wśród neurocytopatologów. Nierzadko przy tym wypowiedzany jest pogląd, że są one bądź technicznymi artefaktami, bądź też efektem pośmiertnej autolizy. Ich uzyskanie w warunkach poprawnie przeprowadzonego doświadczenia oraz scharakteryzowanie zróżnicowanego metabolicznego podłoża zmian, stanowi przekonujący argument na rzecz ich przyżyciowego pochodzenia. Zastosowanie technik morfometrycznych pozwoliło ponadto na ujawnienie nieprawidłowości strukturalnych neuronu, nieuchwytnych w rutynowym badaniu histopatologicznym, podobnie jak wykorzystanie specjalnych srebrnych technik impregnacyjnych umożliwiło dostrzeżenie patologii protoplazmatycznych wypustek komórki nerwowej, stale niedocenianej w kliniczno-morfologicznych interpretacjach.

Poszukiwanie podłoża procesów zwyrodnieniowych w mózgu oraz dążenie do wyjaśnienia zróżnicowanej, a nierzadko wybiórczej wrażliwości poszczególnych struktur ośrodkowego układu nerwowego na działanie różnych czynników uszkodzających, ukierunkowało zainteresowania Miroslawa Kozika na problematykę topochemicznej organizacji oun. Badania w tej dziedzinie, prowadzone znów wspólnie z Wenderem, dotyczyły początkowo rogu Amona i jąder podstawy, a następnie objęły i inne struktury mózgu, w tym przede wszystkim jądra ciała migdałowatego. Oparły się one na analizie odmiennej aktywności histoenzymatycznej poszczególnych ugrupowań komórkowych i zróżnicowanego wbudowywania znakowanych aminokwasów oraz prekursorów kwasów nukleinowych. Istotnym czynnikiem było przy tym, jak zresztą w większości opracowań autora, uwzględnienie dynamicznych aspektów rozwojowych. Jeśli obserwacje te nie wyjaśniły całkowicie pojęcia patoklizy, wprowadzonego do piśmiennictwa neuropatologicznego przez C. i O. Vogtów, a ze względu na ograniczenia metodyczne spełnić tej roli nie mogły, to z całą pewnością przybliżyły jego zrozumienie i powiązały je ze współczesnymi poglądami neurochemicznymi. Wykorzystanie w późniejszym okresie mikroanalizy laserowej umożliwiło ilościową analizę rozmieszczenia metali w ośrodkowym układzie nerwowym w warunkach prawidłowych i patologicznych, takich między innymi jak: encefalopatia wątrobowa, egzogenne zatrucia czy choroba Fahra, zarówno u ludzi, jak i u wolno żyjących zwierząt.

W dorobku naukowym badacza przywiązującego niezwykle wielką uwagę do wiarygodności warsztatu doświadczalnego nie mogło zabraknąć prac poświęconych zagadnieniom metodycznym. W znacznej mierze, choć nie wyłącznie, wiązały się one z wykorzystaniem mikroanalizy laserowej do badań materiału biologicznego. Opracowane przez Miroslawa Kozika techniki pozwalały nie tylko na charakterystykę rozmieszczenia metali w mózgu, lecz również i przede wszystkim na ilościową analizę aktywności histoenzymatycznej. Szerokie zastosowanie znalazła między

innymi metoda ilościowego oznaczania aktywności kwaśnej fosfatazy. Wprowadzone przez Niego techniki i metody badawcze stanowiły istotny krok w histoenzymologii morfologicznej, wzbogacając ją w podstawowe elementy ilościowe. Wyrazem tego samego dążenia do doskonalenia metodycznego warsztatu badań były kolejne prace poświęcone możliwości analiz histoenzymatycznych na materiale zatapianym w formalinie i eponie oraz zależności odczynów histochemicznych od pośmiertnych procesów autolitycznych.

W krótkim wspomnieniu nie sposób przeprowadzić pobieżnej choćby analizy dorobku naukowego uczonego o tak rozległych i wielokierunkowych zainteresowaniach, i tak oddanego pracy badawczej jakim był Profesor Mirosław Kozik. Można tylko zarysować jego główne nurty i kierunki.

Oryginalnego dorobku badawczego Mirosława Kozika nie wyczerpuje lista jego publikacji. Mieszczą się na niej również opracowania monograficzne i podręcznikowe, między innymi zawarte w pierwszym polskim podręczniku neuropatologii, wydanym w 1981 r. pod tytułem „Podstawy Neuropatologii”, prace z zakresu historii medycyny, poświęcone nauczaniu i wychowaniu studentów, wspomnienia, sprawozdania i oceny.

Drugim kierunkiem działalności Profesora Mirosława Kozika, uprawianym przez całe życie zawodowe była praca dydaktyczna. Uczył od wczesnych lat studenckich, najpierw w Katedrze Histologii w Klinice Neurologicznej, w Zakładzie Neuropatologii, a potem znów w Klinice Chorób Układu Nerwowego Wydziału Pielęgniarskiego. Zmieniały się formy, zakres i przedmiot nauczania, zmieniali się ludzie, którym przekazywał wiedzę i umiejętności, nie zmieniał się natomiast jego stosunek do obowiązków nauczyciela akademickiego i nie zmieniał się jego głębokie przekonanie, że uczyć w szkole wyższej znaczy równocześnie wychowywać, przekazywać wiedzę i kształtować osobowość. Lubił i potrafił uczyć. Czynił to zawsze tak, aby możliwie najlepiej uczestniczyć w spełnianiu zasadniczego zadania szkoły medycznej, którym, w jego przeświadczeniu, było uzbrojenie młodego adepta medycyny w możliwie największy zasób nowoczesnej wiedzy i umiejętności zawodowych, przygotowanie do korzystania z nich w praktycznym działaniu i ukształtowanie osobowości lekarza łączącego cechy biologa oraz społecznika.

Zdumiewa ogrom zadań organizacyjnych, sprawnie realizowanych we wszystkich fazach Jego życia zawodowego. Był zaangażowany w dziesiątkach Komisji i zespołów uczelnianych zarówno doradczych, jak i wykonawczych. Rozpoczynając od małej usługowej pracowni klinicznej, w krótkim czasie stworzył tętniący życiem, znaczący ośrodek badań neuromorfologicznych. Nie bacząc na piętrzące się trudności i przeciwności, do końca życia budował dosłownie i w przenośni Klinikę Neurologiczną Wydziału Pielęgniarskiego. Jego działania naukowo-organizacyjne, społeczne i polityczne daleko przekraczały mury uczelni. Był czynnym członkiem

szeregu krajowych i międzynarodowych towarzystw naukowych. W Zarządzie Głównym Polskiego Towarzystwa Neurologicznego prowadził Komisję Historii Neurologii, był członkiem Zarządu Głównego Stowarzyszenia Neuropatologów Polskich, wiceprezesem Polskiego Towarzystwa Histochemicznego i Cytochemicznego, kierując w nim ponadto, stworzoną przez siebie, Sekcją Technik Histochemicznych. Organizował liczne zjazdy, sympozja i konferencje naukowe. Uczestniczył w dziesiątkach z nich, przedstawiając zawsze wyniki swoich oryginalnych badań i dociekań. Pracował w Komisjach Naukowych Wydziału Nauk Medycznych Polskiej Akademii Nauk, w zespołach koordynacyjnych i oceniających, w kolegiach redakcyjnych. Brał czynny udział w życiu politycznym uczelni, i poza uczelnią, jako członek Polskiej Zjednoczonej Partii Robotniczej i Patriotycznego Ruchu Ocalenia Narodowego. Wszędzie z jednakowym poczuciem odpowiedzialności, sumiennością, zaangażowaniem i ofiarnością.

Przedwczesna śmierć, w okresie dojrzałych doświadczeń, szerokich planów i zamierzeń oraz zasłużonego uznania, przerwała bogate, niepow-szednie życie, wypełnione trudem lekarza, badacza, nauczyciela i organizatora oraz rozległymi, konsekwentnie i z pasją realizowanymi zainteresowaniami pozazawodowymi. Drogi tego niełatwego, spełnionego życia kształtowała wielka praca, niespożyta energia, pasja i radość tworzenia, i ciekawość poznawania tego co nowe i jeszcze nieodkryte.

Odszedł człowiek wielkiego talentu, ambicji i możliwości. Skromny, prawy i wyjątkowo jednoznaczny. Odszedł kolega i przyjaciel, życzliwy, ciepły i sedeczny. To co zostawił za sobą świadczy jak wiele jeszcze mogło być przed nim.

Odszedł człowiek, któremu dane było zostawić ślad na ziemi. I taki z nami pozostanie.

Miroslaw J. Mossakowski

OFFICIAL JOURNAL OF THE FULTON SOCIETY
EDITORIAL OFFICE
Calle Buenos Aires 363
MONTEVIDEO, URUGUAY

ANNOUNCEMENT

The XIIth International Symposium of the "FULTON SOCIETY" on "BRAIN MECHANISMS OF EMOTIONS" will be held on September 4, 1985, in Hamburg Federal Republic of Germany, along with the XIIIth WORLD CONGRESS OF NEUROLOGY.

In this Symposium will participate outstanding personalities from Europa America and Asia — All the papers will be printed in an extraordinary Volume of the INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROLOGY. Official Journal of the Fulton Society.

For further information please address to: Prof. Dr. Victor Soriano, Calle Buenos Aires 363, Montevideo — Uruguay

IRENA HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, ANNA M. KAMIŃSKA

DIAGNOSTIC YIELD OF QUANTITATIVE ELECTROMYOGRAPHY
AND MUSCLE BIOPSY IN MYOPATHIC DISEASES
(REPORT OF 464 CASES) *

Department of Neurology, Medical School, Warszawa

The aim of this study was to evaluate the contribution of quantitative electromyography (EMG) and the morphological examination, including histochemistry, to the correct clinical diagnosis of myopathic processes. In particular, the diagnostic concordance of these two methods was assessed. Finally, an attempt has been made to explain the causes of some discrepancies between the diagnostic conclusions reached from the morphological and electrophysiological evaluations. To avoid queries around the distinction between neurogenic and myogenic features, this paper concentrates on well defined diseases or syndromes, classically considered as being myopathic.

The diagnosis was based on the clinical symptoms, genetic criteria and the results of several tests. Due to the fact that the possibility of simultaneous examination of many muscles with EMG is not matched by very restricted amount of specimen available for morphological examination, the correlation between the EMG and morphological evaluation was strictly limited to recordings from the muscles contralateral to the biopsy side at the same time. This approach recently applied by Buchthal and Kamieniecka (1982), differs from numerous earlier studies (Humphrey, Shy 1962; Brusa et al. 1963; Schwartz et al. 1966; Hausmanowa-Petrusewicz, Jędrzejowska 1971; Black et al. 1974; Hausmanowa-Petrusewicz 1978; Micaglio et al. 1980).

Quantified EMG parameters of the myogenic record were based on Buchthal's criteria (Buchthal 1957; 1962; 1977; Buchthal, Kamieniecka 1982). Histological and histochemical abnormalities were analyzed using classical criteria (Dubowitz, Brooke 1973; Dubowitz 1981).

* This work was partly supported by grant from the Polish Academy of Sciences No 10.4.05.4.1.

Biopsy findings were not quantified, since it is known from the literature (Buchthal 1977; Buchthal, Kamieniecka 1982) that no single EMG parameter can be related to a single histopathological abnormality, except the long polyphasic potentials with increasing signs of regeneration in patients with Duchenne muscular dystrophy, myotonic dystrophy and polymyositis.

MATERIAL AND METHODS

Material

EMG and biopsy data of 464 patients diagnosed as having myogenic diseases were selected from 1077 cases of neuromuscular diseases observed in the Department of Neurology, School of Medicine, Warsaw, in the years 1970—1980. The earlier material was not taken because the techniques used then are now considered inadequate. The reduction of the material to more recent cases has led to its more uniform evaluation. For purposes of classification the patients were grouped into 4 major categories (Tab. 1).

The classification of the diseases was based on the personal and family history, clinical examination and the results of several laboratory tests. Certain disease entities are underrepresented either because the muscle biopsies were not taken in clinically obvious cases, e.g. myasthenia while other are overrepresented as a subject of special research interest, e.g. dystrophy.

Methods

Electromyography. The EMG was done with Adrian-Bronk concentric electrodes having an external diameter of 0.65 mm and an active surface of 0.07 mm². They were connected to a 3-channel Disa electromyograph. In the smaller muscles and in children, needle electrodes of 0.45 mm in diameter and 0.045 mm² in active area were used.

An analysis of the EMG record included a type of maximal effort pattern, the mean value of parameters of at least 30 single action potentials recorded from different parts of the muscle during slight effort — duration, amplitude, shape (number of phases). In the case of the spontaneous resting activity, the following parameters were identified: insertion potentials, fibrillations positive sharp wave potentials, fasciculations and different types of spontaneous discharge bursts. All calculated mean values of parameters of single potentials were compared with the norms for the age and muscle (Buchthal 1957; Hausmanowa-Petrusewicz et al. 1967). A significant increase of amplitude was taken into account only when voltage exceeded 6 mV; potentials were considered to be polyphasic when they showed more than 4 phases and polyphasia was regarded as increased when the records showed more than 20% of polyphasic potentials. The mean duration of potentials was considered to be significantly shorter if the mean duration was shorter by 25%, than

Table 1. Clinical material
Tabela 1. Materiał kliniczny

Group Grupa	Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	Number of cases Liczba przypadków
	Muscular dystrophies Dystrofie mięśniowe	
I	Duchenne type Postać Duchenne'a	169
	Becker type Postać Beckera	7
	Limb-girdle Postać obręczowo-kończynowa	64
	Facioscapulohumeral Postać twarzowo-łopatkowo-ramienna	29
	Congenital Postać wrodzona	11
	Myotonic disorders Zespoły miotoniczne	
II	Myotonic dystrophy Dystrofia miotoniczna	13
	Myotonia congenita Miotonia wrodzona	7
	Myopathies Miopatie	
III	Congenital myopathies with characteristic structural changes Wrodzone miopatie strukturalnie swoiste	25
	Undetermined myopathies Miopatie niezidentyfikowane	
	Congenital forms Postacie wrodzone	47
	Adult forms Postacie dorosłych	19
	Metabolic myopathies Miopatie metaboliczne	27
	Endocrine myopathies Miopatie w przebiegu zaburzeń hormonalnych	3
	Others Inne	9
	Inflammatory myopathies Miopatie zapalne	
IV	Childhood type Postać dziecięca	14
	Adult type Postać występująca u dorosłych	20
Total Razem		464

in normal muscles of the age-matched control. The maximal effort pattern was classified, according to Buchthal (1957), into an interference pattern, intermediate rich, intermediate poor and single oscillations.

The criteria of the myogenic record were based on Buchthal's criteria (Buchthal 1957; 1962; 1977; Buchthal, Kamieniecka 1982), which are: 1) a shortening of motor unit (m.u.) potentials; 2) an increased incidence of polyphasic potentials; 3) a low amplitude of single m.u. potentials; 4) an interference EMG pattern at full effort — the record is usually unproportionally rich in comparison to the weak contraction and its amplitude is lower than in normal subjects.

If only one parameter of single m.u. potentials changes, it was considered insufficient to distinguish myopathy from neurogenic involvement and/or from control.

Muscle biopsy. Biopsies were obtained by means of a standard technique, according to Dubowitz and Brooke (1973), from quadriceps, biceps and deltoid muscle, from the side contralateral to EMG examination, to avoid needle myopathy (Engel 1967; Paakari, Mumenthaler 1974). Very weak and wasted muscles were avoided.

Tissue was routinely frozen and cross-sectioned at 10 μm thickness in a cryostat. Standard staining and histochemical methods (Dubowitz 1981) were used. There was not a "blind" study. A routine assessment of morphological changes was made on all biopsies. For the purpose of analyzing the pathological changes, classic criteria were adopted (Dubowitz, Brooke 1973; Dubowitz 1981). Excessive fiber degeneration (hyaline, granular and vacuolar changes, phagocytosis) and regeneration (basophilia, vesicular nuclei) as well as copious endomysial fibrosis were considered to be indicative of myopathy.

The presence of typical features of congenital myopathies such as abundant central cores, minicores, rod bodies, as well as centronucleated fibers and quantitative fiber type disproportion, in the absence of type grouping were considered to be myopathic. Infiltrations of lymphocytes, plasma cells and histiocytes, mostly around the blood vessels were considered to be inflammatory changes.

Random variation in muscle fibers size, fiber splitting, occasional internal nuclei, moth-eaten fibers and ring fibers were not considered to be characteristic. Group fiber atrophy, Histochemical type grouping of both type I and II fibers and target fibers were considered to indicate neurogenic impairment.

The muscle investigated electromyographically was contralateral to that from which biopsy specimens were taken. The results of the examination of all other muscles in the same patients were only used if the record from this one muscle was dubious.

RESULTS

Electrophysiologic and muscle biopsy results are reported in Table 2. EMG abnormalities were noted in 441 patients (95.0%) and histopathological abnormalities in 448 patients (96.5%). EMG itself contributed to

Table 2. Electrophysiologic and biopsy results
Tabela 2. Wyniki EMG i biopsji mięśniowych

Group Grupa	Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	1*	2	3	4
	Muscular dystrophies — Dystrofie mięśniowe				
	Duchenne type Postać Duchenne'a	169			
I	Becker type Postać Beckera	6	1		
	Limb-girdle Postać obręczowo-kończynowa	63	1		
	Facioscapulohumeral Postać twarzowo-łopatkowo-ramienna	22	1		6
	Congenital Postać wrodzona	11			
	Myotonic disorders — Zespoły miotoniczne				
II	Myotonic dystrophy Dystrofia miotoniczna	8	4		1
	Myotonia congenita Miotonia wrodzona	2	5		
	Myopathies — Miopatie				
	Congenital myopathies with characteristic structural changes Wrodzone miopatie strukturalnie swoiste	21	1	3	
	Undetermined myopathies Miopatie nietypowe				
III	Congenital forms Postacie wrodzone	34	10	3	
	Adult forms Postacie dorosłych	16	2	1	
	Metabolic myopathies Miopatie metaboliczne	20	3	3	1
	Endocrine myopathies Miopatie w przebiegu zaburzeń hormonalnych	1		2	
	Others Inne	7		2	
	Inflammatory myopathies — Miopatie zapalne				
IV	Childhood type Postać dziecięca	13	1		
	Adult type Postać występująca u dorosłych	16	4		
Total — Razem		409	33	14	8

- 1.* Myogenic EMG — Myopathic biopsy
Miogenny zapis EMG — Miopatyczne zmiany w biopsji mięśniowej
2. Myogenic EMG — Normal, nondiagnostic, neuropathic, myopathic-neuropathic biopsy
Miogenny zapis EMG — Obraz biopsyjny: prawidłowy, bez wartości diagnostycznej, zmiany neurogenne, zmiany miopatyczno-neurogenne
3. Normal EMG — Myopathic biopsy
Prawidłowy zapis EMG — Miopatyczne zmiany w biopsji mięśniowej
4. Normal EMG — Normal biopsy
Prawidłowy zapis EMG — Prawidłowa biopsja mięśniowa

Table 3. Discordant clinical, EMG and biopsy data
 Tabela 3. Niezgodność danych klinicznych, EMG i obrazu biopsyjnego

No Nr	Initials Inicjały	Age in years Wiek w latach	Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	EMG*	Muscle biopsy** Biopsja mięśnia
1	I.S.	20	Becker dystrophy Dystrofia Beckera	Myo	Myo-neuro
2	A.J.	15	Limb-girdle dystrophy Dystrofia typu obęzcowo-kończynowego	Myo	Myo-neuro
3	A.S.	5	Facioscapulohumeral dystrophy Dystrofia typu twarzowo-łopatkowo-ramiennego	N	N
4	Z.S.	5		N	N
5	D.Ł.	6		N	N
6	A.Ł.	19		N	N
7	T.S.	38		N	N
8	D.P.	15		N	N
9	P.G.	38		Myo	Myo-neuro
10	M.D.	7	Myotonic dystrophy Dystrofia miotoniczna	N	N
11	L.D.	42		Myo	Myo-neuro
12	J.P.	61		Myo	Myo-neuro
13	H.Z.	46		Myo	Myo-neuro
14	W.O.	29		Myo	Non diagn.
15	R.S.	12	Myotonia congenita Miotonia wrodzona	Myo	Neuro
16	R.K.	7		Myo	Non diagn.
17	M.A.	7		Myo	Non diagn.
18	J.P.	10		Myo	N
19	R.M.	31		Myo	N
20	T.O.	3	Rod myopathy Miopatia nitkowata	N	Myo
21	J.K.	6	Congenital fiber type disproportion Wrodzona dysproporcja typów włókien	N	Myo
22	R.G.	20		N	Myo
23	M.P.	20	Central core disease Miopatia typu central core	Myo	Myo-neuro
24	M.O.	16	Undetermined congenital myopathy Niezdefiniowana miopatia wrodzona	N	Myo
25	K.S.	7		N	Myo
26	T.F.	20		N	Myo
27	H.B.	47	Undetermined adult myopathy Niezdefiniowana miopatia dorosłych	N	Myo
28	D.G.	6	Congenital undetermined myopathy Niezdefiniowana miopatia wrodzona	Myo	Myo-neuro
29	K.F.	5		Myo	Myo-neuro
30	S.B.	8		Myo	Myo-neuro
31	K.K.	10		Myo	Myo-neuro
32	K.S.	3		Myo	Myo-neuro
33	J.W.	29		Myo	N
34	R.S.	9		Myo	N

c. d. Tabeli 3

No Nr	Initials Inicjały	Age in years Wiek w latach	Clinical diagnosis Rozpoznanie kliniczne	EMG*	Muscle biopsy** Biopsja mięśnia
35	A.S.	4		Myo	N
36	M.P.	10		Myo	N
37	U.G.	4		Myo	N
38	E.J.	53	Undetermined adult myopathy Niezdefiniowana miopatia dorosłych	Myo	N
39	P.D.	25	Periodic paralysis Porażenie okresowe	N	Myo
40	E.Ż.	30		N	N
41	J.S.	27	Lipid myopathy Miopatia lipidowa	N	Myo
42	A.B.	46		N	Myo
43	Z.Ż.	17	Periodic paralysis Porażenie okresowe	Myo	Non diagn.
44	M.R.	25	Glycogenosis Glikogenoza	Myo	Non diagn.
45	J.M.	6	Lipid myopathy Miopatia lipidowa	Myo	Myo-neuro
46	A.D.	64	Endocrine myopathy (hypothyreosis) Miopatia z zaburzeniami hormonalnymi (niedoczynność tarczycy)	N	Myo
47	C.M.	29	Endocrine myopathy (thyreotoxicosis) Miopatia z zaburzeniami hormonalnymi (nadczynność tarczycy)	N	Myo
48	G.W.	23	Ocular myopathy Miopatia oczna	N	Myo
49	M.C.	44		N	Myo
50	F.B.	70	Sarcoid myopathy Miopatia sarkoidowa	Myo	Myo-neuro
51	L.M.	6	Inflammatory myopathy Miopatia zapalna	Myo	Myo-neuro
52	A.M.	53		Myo	Myo-neuro
53	J.W.	54		Myo	Myo-neuro
54	J.P.	38		Myo	Myo-neuro
55	J.F.	44		Myo	Myo-neuro

* Myo — Myogenic type
Typ miogenny

N — Normal
Prawidłowy

** Myo-neuro — Mixed changes (myo
and neuropathic)
Zmiany mieszane (mio-
i neuropatyczne)

Non-diagn. — Non diagnostic
Bez wartości diagnostycz-
nej

Neuro — Neuropathic changes
Zmiany neuropatyczne

N — Normal
Prawidłowy

the diagnosis of myogenic lesion in 441 cases (95%) and muscle biopsy in 423 (91.2%). Both EMG and biopsy were concordant with the diagnosis in 409 cases (88.2%). Eight patients (1.7%) with clinically typical syndromes had a normal EMG and biopsy and in 47 cases (10.1%) EMG and biopsy data were discordant.

Table 3 illustrates the EMG and biopsy findings in 55 patients in whom the one or both tests were at variance with the clinical classification. All numbered cases mentioned in the text are referred to this table.

Group I — Muscular dystrophies

Duchenne dystrophy

EMG. In all cases of Duchenne dystrophy the electromyographic record had the characteristics of very pronounced myogenic involvement, i.e. the mean of the potential's duration was decreased, the amplitude was low, and in a high percentage the potentials were polyphasic. The changes in the parameters of individual action potentials corresponded to the stage of the disease, as did also, the maximal effort pattern, which usually showed a pathologic interference. In very advanced stages, the maximal effort pattern was, in some cases, reduced. It is also worth stressing that in 12% of the muscles, spontaneous activity was found, mainly in the form of fibrillations. In 4.1% of the muscles, in long standing cases (over 8 years of duration), pseudomyotonic volleys were noted (in 20.4% of hypertrophic muscles).

Muscle biopsy. The muscle biopsies in all 169 cases showed typical myopathic changes, with marked features of degeneration and regeneration, as well as proliferation of endomysial and perimysial connective tissue (Fig. 1). The severity of changes corresponded to the stage of the disease. No evidence of denervation was seen.

Comparison of EMG and muscle biopsy. All Duchenne patients had both a myopathic EMG and biopsy.

Becker dystrophy

EMG. In all 7 cases of Becker dystrophy, there was a typical myogenic record, i.e. shortening of potential duration and a decrease in amplitude, somewhat less pronounced than in Duchenne dystrophy. No spontaneous activity was observed except of pseudomyotonic volleys in few very longstanding cases.

Muscle biopsy. Of the 7 patients, 6 showed myopathic changes in biopsy: fibers undergoing necrosis and phagocytosis, hyaline fibers, basophilic fibers with vesicular nuclei. Marked variation in fibers size with many hypertrophic and atrophic fibers, fiber splitting, endomysial fibrosis and variability in oxydative enzyme reaction pattern were seen in all biopsies. Additionally, in one biopsy, (case No 1), fiber type grouping and group fiber atrophy were seen (Fig. 2). No target or targetoid fibers were observed.

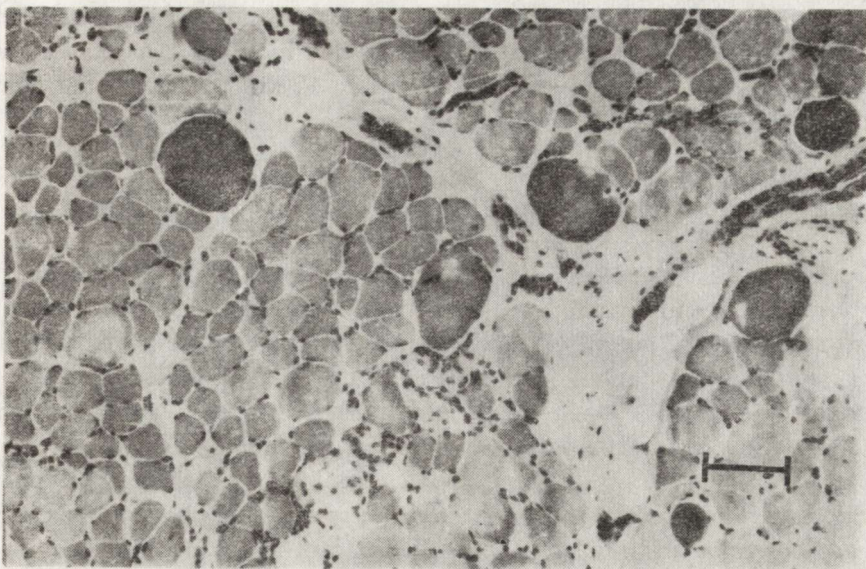


Fig. 1. Duchenne's dystrophy. Quadriceps muscle. Marked random variation in muscle fiber size, endomysial fibrosis, necrotic fibers and phagocytosis, hypertrophic fibers with abnormal dark staining. H-E. Bar — 100 μ m

Ryc. 1. Dystrofia Duchenne'a. Mięsień czterogłowy. Znaczne zróżnicowanie wielkości włókien mięśniowych, zwłóknienie śródmięśniowej, włókna zmienione martwiczo i fagocytowane, przerosłe włókna o nieprawidłowym ciemnym zabarwieniu. H-E. Podziałka — 100 μ m

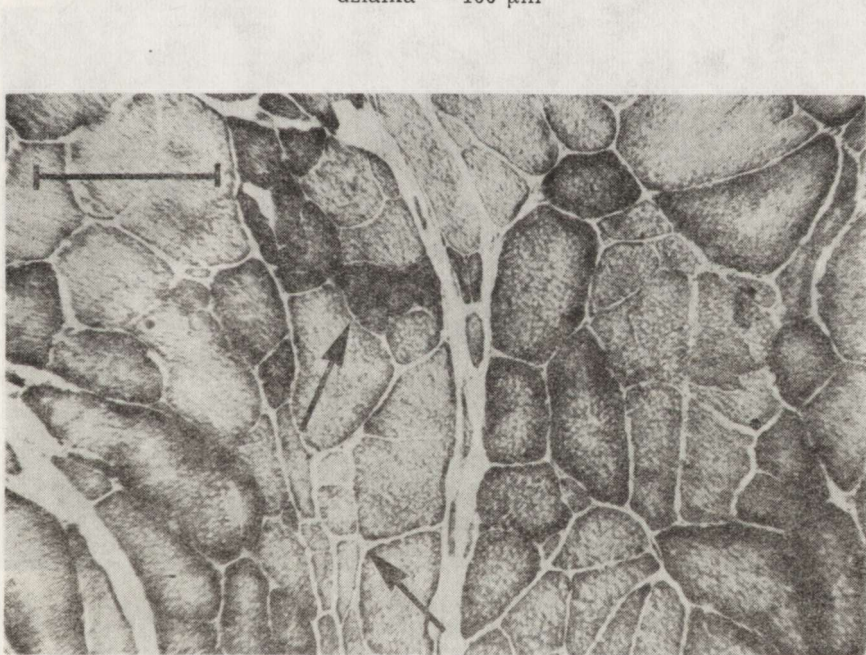


Fig. 2. Becker's dystrophy (case No 1). Quadriceps muscle. Small groups of atrophic fibers (arrows) simulating neurogenic atrophy. NADH reaction, Bar — 100 μ m

Ryc. 2. Dystrofia Beckera (przyp. 1). Mięsień czterogłowy. Drobne ugrupowania zanikłych włókien mięśniowych (strzałki) imitujące zanik neurogeny. Odczyn NADH. Podziałka — 100 μ m

Comparison of EMG and muscle biopsy. Six patients had both myopathic EMG and biopsy, while 1 had myopathic EMG, associated with muscle biopsy, showing advanced myopathic as well as slight neuropathic changes (case No 1).

Limb-girdle dystrophy

EMG. In all 64 cases of limb-girdle dystrophy, the EMG record was characteristic of myogenic involvement. It should be noted, that quite a large number of potentials had normal parameters, some of potentials were even higher than in normal. Fibrillations were noted in 4.8% and pseudomyotonic volleys in 7.8% of muscles in most advanced cases. However, the cumulative pattern was obviously myogenic.

Muscle biopsy. The muscle biopsies in 63 cases showed myopathic changes such as necrotic fibers, basophilic fibers and phagocytosis. Changes in fibers size and muscle fiber splitting were very pronounced. Architectural changes, moth-eaten fibers and whorled fibers were common. In one patient (case No 2), the biopsy showed typical myopathic changes as well as neurogenic features: fiber type grouping and group fiber atrophy (Fig. 3).

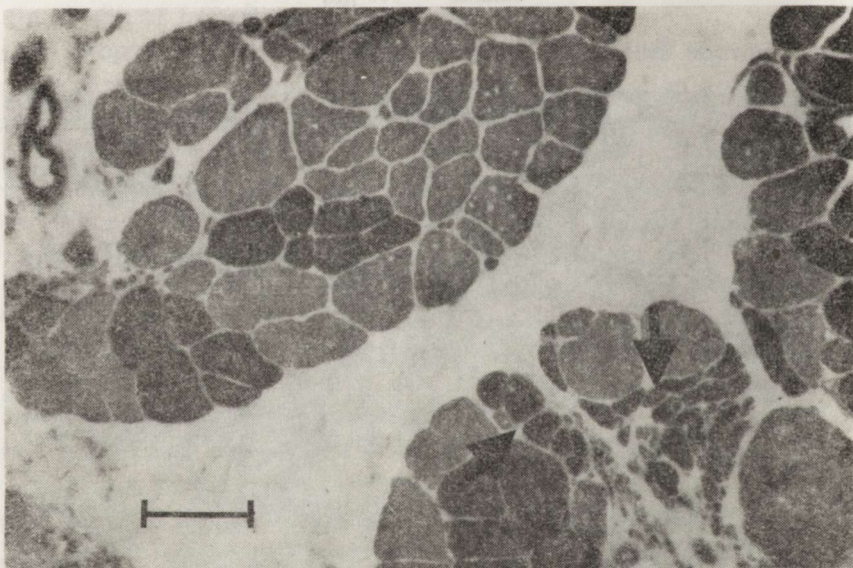


Fig. 3. Limb-girdle dystrophy (case No 2). Biceps muscle. Variations in fibers sizes with marked hypertrophy. Groups of small dark angular fibers (arrows) and type grouping of type II (light) fibers. NADH reaction. Bar — 100 μ m

Ryc. 3. Dystrofia kończynowo-obręczowa (przyp. 2). Mięsień dwugłowy. Zróżnicowanie wielkości włókien mięśniowych z bardzo znacznym przerostem. Zgrupowania małych wielobocznych ciemnych włókien (strzałki) i skupienia włókien typu II (jasne). Odczyn NADH. Podziałka — 100 μ m

Comparison of EMG and muscle biopsy. In all but one case, EMG and biopsy data were concordant. In one case (No 2), EMG was myopathic whereas in biopsy, additionally to myopathic, minor neuropathic changes were seen.

Facioscapulohumeral dystrophy

EMG. In 23 patients, the biceps brachii showed an electrical activity meeting all criteria of the myogenic lesion. In 6 patients (cases No 3—8), however, the EMG records of muscles contralateral to biopsied muscles were normal. In some of the other muscles of these patients the EMG was myogenic and provided a sufficient basis for correct diagnosis.

Muscle biopsy. In the group of 29 patients, 6 cases (No 3—8) had normal muscle biopsy (4 taken from biceps, 1 from deltoid and 1 from quadriceps muscle). Twenty two biopsies showed various degree of myopathic alterations — from the mildest to the marked. Degeneration was not pronounced, fibrosis was rarely seen. Mild inflammatory response was observed in 1 case, profuse in 1. In one patient (case No 9) in addition to mild myopathic alterations, changes of denervation, consisting of group atrophy, fiber type grouping and targetoid fibers were present.

Comparison of EMG and muscle biopsy. In 6 clinically typical patients (cases No 3—8), both EMG and biopsy were normal. In one case (case No 9), EMG showed myopathic changes and, in biopsy, both myopathic and neuropathic changes were seen.

Congenital muscular dystrophy

EMG. In all 12 cases of congenital dystrophy, the EMG showed changes characteristic of pronounced myogenic lesion.

Muscle biopsy. An extensive adipose and connective tissue proliferation was a hallmark of the 11 biopsies in congenital dystrophy. There was an increased variability in the size of fibers, with large and small fibers, occasionally with central nuclei being present in all biopsies. Changes of degeneration and regeneration, of various degree, were also noted.

Comparison of EMG and muscle biopsy. All 12 cases of congenital dystrophy had concordant EMG and biopsy results.

Group II — Myotonic disorders

Myotonic dystrophy

EMG. In all but one case of Steinert disease, the bioelectrical activity was characteristic of myogenic lesion. In these cases additionally myotonic volleys were recorded and there was a sufficient basis even for

nosological diagnosis. In one patient (case No 10) EMG was normal. In 3 patients (cases No 11—13) in distal muscles a neurogenic EMG record and in some nerves slowing of motor conduction velocity was found.

Muscle biopsy. Of 13 patients with myotonic dystrophy, 8 showed characteristic changes consisting of variability in the size of fibers with type I fiber atrophy, type II hypertrophy, internally placed nuclei, occasionally sarcoplasmic masses and ring fibers as well as necrosis, phagocytosis and fibrosis. Additionally in 3 biopsies (cases No 11—13) neurogenic features such as group fiber atrophy and fiber type grouping were seen. (Fig. 4). In one biopsy (case No 14) the only pathology was type I fiber atrophy and one biopsy (case No 10) was normal.

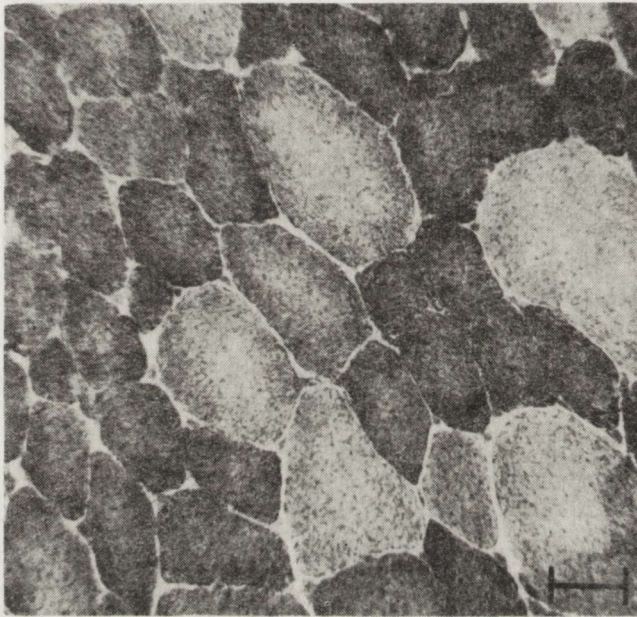


Fig. 4. Myotonic dystrophy (case No 14). Biceps muscle. Type grouping of type I (dark) fibers. NADH reaction. Bar — 50 μ m

Ryc. 4. Dystrofia mitotyczna (przyp. 14). Mięsień dwugłowy. Zgrupowania włókien typu I (ciemnych). Odczyn NADH. Podziałka — 50 μ m

Comparison of EMG and muscle biopsy. Twelve patients had both myopathic EMG and biopsy, one (case No 10), with definite clinical signs and family history had both normal EMG and biopsy. In three patients (cases No 11—13) with some neurogenic signs in muscle biopsy, the EMG record from biceps brachii fulfilled all criteria of myogenic lesion, in other muscles, however, mostly in distal ones, the record had a neurogenic character and the patients do belong to a so called intermediate group (see discussion). In one patient (case No 14) the EMG and biopsy results should be considered as a true discordance.

Myotonia congenita

EMG. In all cases of myotonia congenita, the EMG had a diagnostic significance. In all 7 cases, there were pronounced myotonic volleys. Only in 2 cases slight myogenic changes of EMG parameters (shortening of potential duration and increased polyphasia) were noted.

Muscle biopsy. In the group of 7 patients, 2 showed discrete myopathic changes, 1 (case No 15) showed type I fiber grouping, 2 biopsies (cases No 16 and 17) were considered non-diagnostic, and 2 were normal.

Comparison of EMG and muscle biopsy. In 2 patients, EMG and biopsy results were concordant, in 1 patient (case No 15) EMG was myopathic, whereas in biopsy, minor changes suggesting denervation, were seen. In 2 cases (No 16 and 17) EMG was myopathic and biopsy non-diagnostic and in 2 cases (No 18 and 19) EMG was myopathic, whereas biopsy was normal.

Group III — Myopathies

Congenital myopathies with characteristic structural changes

EMG. All but 3 cases (No 20—22), of congenital myopathies with characteristic structural changes showed myogenic EMG pattern. The myogenic features were, however, much less pronounced than e.g. in dystrophy. The EMG, in various myopathies, looked very much alike and statistical analysis did not show any significant difference between them (Hausmanowa-Petrusewicz, Ryniewicz 1976). The exception was myotubular myopathy in which many fibrillations were detected. The most commonly changed parameter was the potentials duration (in 70% of muscles). In 50% of the muscles, the percentage of polyphasic potentials was increased, while 30% of muscles showed low amplitude of bioelectrical activity. The maximal effort pattern in all but 10% of the muscles was rich, proportionally to the force of a given muscle, i.e. without features of pathologic interference. As mentioned, in 3 patients the EMG record was normal, as it was, also in the other examined muscles.

Muscle biopsy. The morphological picture of biopsy material revealed nosologically dependent differences.

Central core disease. In group of 10 patients, 2 biopsies showed a presence of multicores, whereas in 8, typical central cores were present. In one case cores coexisting with rods were seen and in one case, the muscle appeared to be undifferentiated. In one case (No 23), with moderate myopathic changes, there were seen cores as well as target and targetoid fibers.

Myotubular myopathy. In all three cases central nuclei were observed in a majority of the fibers, with involvement of both fiber types. In 2 cases they were associated with type I fiber hypertrophy.

Rod myopathy. All 5 biopsies showed the presence of the rods, with a weak differentiation in fiber types in 2 cases.

Congenital fibers type disproportion. Six of 7 patients had biopsies characterized by small size of type I fibers and their deficiency. Only in one case did type I fiber predominance occur.

Comparison of EMG and muscle biopsy. The myogenic character of EMG records was alike in cases of congenital myopathies with different morphological abnormalities (Fig. 5). EMG and biopsy data were

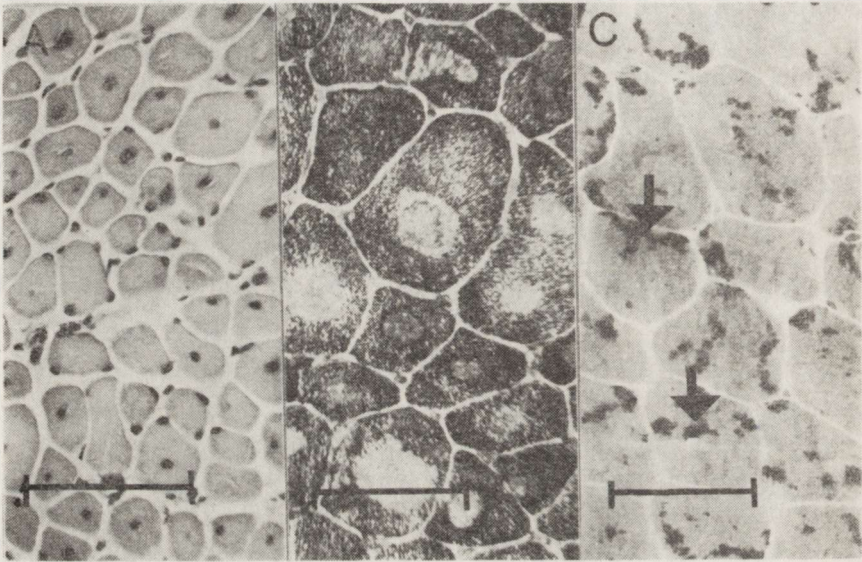


Fig. 5. Congenital myopathies with characteristic structural changes. A. Myotubular myopathy. Most fibers with centrally placed nuclei. H-E. Bar — 100 μ m. B. Central core disease. Lack of enzymatic activity in central regions of numerous fibers. NADH reaction. Bar — 50 μ m. C. Numerous cytoplasmic rods (arrows) in muscle fibers. Modified Gomori trichrome. Bar — 50 μ m

Ryc. 5. Wrodzone miopatie strukturalnie swoiste. A. Miopatia miotubularna. Większość włókien mięśniowych z centralnie umieszczonym jądrem. H-E. Podziałka — 100 μ m. B. Miopatia typu central core. Brak odczynu enzymatycznego w części centralnej licznych włókien mięśniowych. Odczyn NADH. Podziałka — 50 μ m. C. Miopatia nitkowata. Liczne struktury nitkowate w cytoplazmie włókien mięśniowych (strzałki). Zmodyfikowana trójbarwna metoda Gomoriego. Podziałka — 50 μ m

concordant in 21 of group of 24 patients. In one patient (case No 23), with central core disease, EMG was myopathic and muscle biopsy showed in addition to myopathic changes features of denervation. In 3 cases with definite abnormalities in muscle biopsy: case No 20 — rod myopathy, cases No 21 and 22 — fibers type disproportion, EMG was normal.

Undetermined myopathies

EMG. In so called undetermined myopathies, (65 cases), the changes of the EMG parameters were slighty myogenic, similar to the congeni-

tal ones. Of 65 patients, 4 (cases No 24—27), showed an entirely normal pattern of electrical activity.

Muscle biopsy. Different features characterized respectively the congenital and adult forms of myopathy.

Congenital forms. The muscle biopsies in 37 patients showed changes considered as myopathic, non characteristic. In 5 patients (cases No 28—32) muscle biopsies showed, in addition, neurogenic changes, consisting of fibers type grouping and/or group fiber atrophy. In 5 cases (No 33—37) no pathological changes were noted.

Adult forms. All but one biopsy in this group of 18 cases showed non-specific myopathic changes, varying from mild to severe. One biopsy was normal.

Comparison of EMG and muscle biopsy. EMG and biopsy data were concordant in 50 of 65 patients. In 4 cases (No 24—27), EMG was normal and biopsy was myopathic. In 5 cases (No 28—32), EMG was myogenic, whereas in biopsy, in addition to myopathic changes, slight features suggesting denervation were seen. In 6 cases (No 33—38), EMG was myogenic and biopsy was normal.

Metabolic myopathies

EMG. Of 9 patients with periodic paralysis, 7 had slight EMG changes with myogenic features (between attacks): mainly shortening of potentials, decrease of amplitude, increased polyphasia. Two cases (No 39 and 40) had normal EMG pattern. No myotonic volleys even in patients with hyperkaliemic paralysis were observed. Of 10 patients with glycogenosis, only 3 showed slight myogenic EMG changes, mainly shortening of potentials and increased polyphasia. In 7 patients the EMG was normal but bioelectrical abnormality of muscle was detected by stimulation according to Dyken et al. (1967), which demonstrated a drop in evoked muscle potentials during nerve stimulation at 18 Hz frequency. In 7 of 9 cases of lipid myopathy, slight myogenic changes were stated. Two patients (cases No 41 and 42) had normal EMG.

Muscle biopsy. The type of metabolic changes underlying the disease process determined the morphological features of the biopsy material.

Periodic paralysis. Seven of 9 patients had myopathic biopsy, with the presence of vacuoles in 1 case. In 1 biopsy (case No 43) the only abnormality observed was a weak metabolic differentiation of the fiber types. One biopsy was considered normal (case No 40).

Glycogenoses. In 9 muscle biopsies, besides characteristic enzymatic changes and glycogen deposits, in some cases, myopathic alterations of various degree were seen. In 1 case (No 44) the only abnormality was the preponderance of type I fibers.

Lipid myopathies. Seven biopsies showed discrete myopathic changes with an excess of lipid droplets in oil red O staining in a majority of

the cases and ragged-red fibers present in one case. In one biopsy (case No 45) in addition, targetoid fibers and weak metabolic differentiation were observed.

Comparison of EMG and muscle biopsy. Twenty one patients had both myopathic EMG and biopsy. In 1 case (No 40) of periodic paralysis, with severe attacks and family history, both EMG and biopsy were normal. In 1 patient (case No 43) with periodic paralysis, EMG was myopathic and biopsy was considered non-diagnostic and in 1 patient (case No 39) myopathic biopsy was associated with normal EMG. In one case (No 45) of lipid myopathy with myopathic EMG, in the biopsy were seen both myopathic and neuropathic changes. In 1 patient (case No 41) with definite myopathic changes in muscle, EMG was normal. In 1 patient (case No 44) with glycogenosis, EMG was myogenic whereas biopsy showed no pathological changes.

Endocrine myopathies

EMG. Of 3 patients with thyroid myopathy, only 1 with thyreotoxicosis had a myogenic EMG changes. Two patients (cases No 46 and 47) had a normal EMG record. However, using ischemic test or repetitive stimulation, some abnormalities were noted.

Muscle biopsy. All 3 biopsies showed myopathic changes, consisting of necrosis, phagocytosis, fiber atrophy and fibrosis. Vacuolated fibers were seen in 1 case and moth-eaten and whorled fibers in another.

Comparison of EMG and muscle biopsy. In our group of 3 patients only 1 had concordant EMG and biopsy data, 2 had normal EMG and myopathic biopsy: case No 46 with hypothyreosis and case No 47 with thyreotoxicosis.

Other myopathies

EMG. The subgroup of "other myopathies" included mostly ocular myopathy. It is worth stressing that all but two cases (No 48 and 49) had slight or moderate EMG changes in biceps brachii in spite of very restricted ocular clinical features.

Muscle biopsy. Different morphological changes characterized ocular myopathy and myopathy with sarcoidosis.

Ocular myopathy. Muscle biopsy in 7 cases revealed moderate myopathic changes with the presence of ragged-red fibers. Type II fiber atrophy was seen in two cases, vacuoles in many of the fibers were noted in one biopsy.

Myopathy with sarcoidosis. In this biopsy (case No 50), besides moderate myopathic alterations, group atrophy was seen.

Comparison of EMG and muscle biopsy. In two cases (No 48 and 49) of ocular myopathy with definite morphological muscle changes EMG

was normal. In one patient (case No 50) with sarcoid myopathy EMG was myopathic, and in biopsy both myopathic and neuropathic alterations were seen.

Group IV — Inflammatory myopathies

EMG. All 34 cases, both of childhood and adult type of poly/dermato/myositis, showed EMG features of myogenic lesion. In 45% of the muscles, fibrillations, in 28% positive sharp waves and only in 3% pseudomyotonic volleys were seen. Fifteen percent of the potentials had an amplitude higher than normal. The most frequent changes were: decreased mean potential duration, increased percentage of polyphasic potentials and disproportionally rich maximal effort pattern as compared to weak muscle force.

Muscle biopsy. Differences in the morphological picture were also observed between the childhood and the adult form of the disease.

Childhood type. Muscle biopsies from 14 patients disclosed atrophy of all fiber types, occasionally with perifascicular distribution. Most of the biopsies showed inflammatory response of various degree (Fig. 6). Changes typical of degeneration and regeneration were common. Targetoid fibers, group atrophy and type I fiber atrophy, coexisting with degenerative and inflammatory changes, were seen in one case (No 51) (Fig. 7).

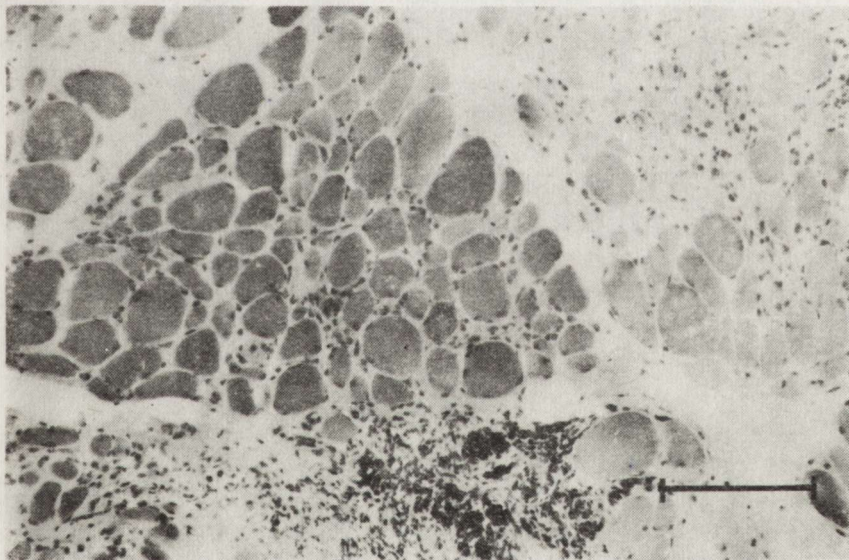


Fig. 6. Childhood polymyositis. Quadriceps muscle. Massive inflammatory infiltrates in perimysial and endomysial connective tissue. Many necrotic and atrophic fibers. H-E. Bar — 100 μ m

Ryc. 6. Zapalenie wielomięśniowe, typu dziecięcego. Mięsień czterogłowy. Obfite nacieki zapalne w tkance łącznej śródmięśniowej i omięśniowej. Liczne martwice i zanikłe włókna mięśniowe. H-E. Podziałka 100 μ m

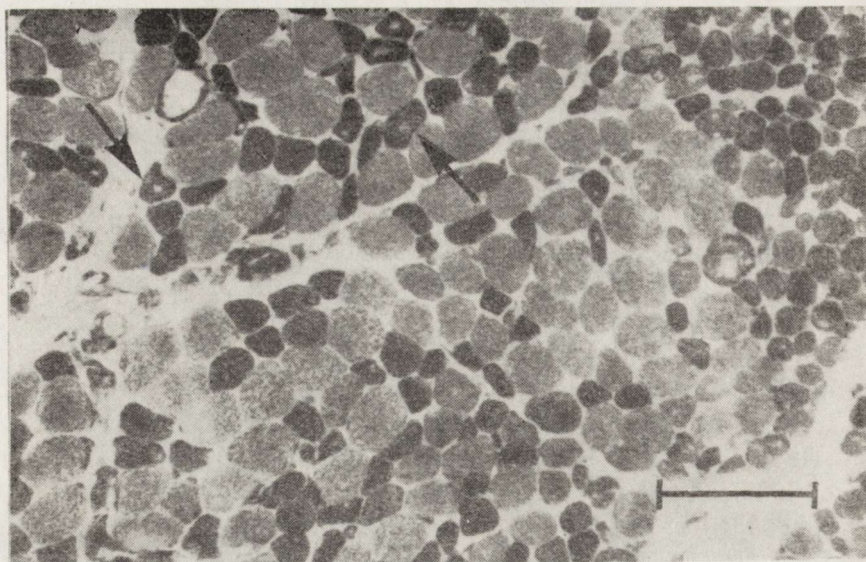


Fig. 7. Childhood dermatomyositis (case No 51). Quadriceps muscle. Targetoid fibers (arrows) and type I (dark) fiber atrophy. NADH reaction. Bar — 100 μ m

Ryc. 7. Zapalenie skórno-mięśniowe, typu dziecięcego. Mięsień czterogłowy. Liczne tarczowate włókna mięśniowe (strzałki) i zanik włókien typu I (ciemne). Odczyn NADH. Podziałka — 100 μ m

Adult type. In the group of 20 patients, the common pathological alterations were: necrotic fibers with phagocytosis, regenerating fibers occurring sometimes as a perifascicular atrophy, as well as mononuclear inflammatory infiltrates in the connective tissue. In addition, in one patient, atrophy of type I fibers and hypertrophy of type II fibers were seen. In 4 cases (No 52—55) changes typical of denervation, consisting of group fiber atrophy and the presence of target and targetoid fibers were observed.

Comparison of EMG and muscle biopsy. In 4 cases (No 51—54) EMG was myogenic with fibrillations present in examined muscles, whereas in muscle biopsy, myopathic alterations, with minor changes suggesting denervation, were observed. In one case (No 55) with myopathic-neuropathic biopsy, besides a myogenic pattern, pseudomyotonic volleys were noted in EMG.

DISCUSSION

EMG and muscle biopsy are two basic tools in the diagnosis and classification of neuromuscular diseases. The scope and limitations of these two methods were compared by several authors (Humphrey, Shy 1962; Brusa et al. 1963; Schwartz et al. 1966; Hausmanowa-Petrusewicz, Jędrzejowska 1971; Black et al. 1977; Hausmanowa-Petrusewicz 1978; Micaglio et al. 1980), and most recently by Buchthal and Kamieniecka (1982).

The results were slightly different, however most of the authors found an essential concordance between EMG and muscle biopsy data. It appears, however, that, in some cases, clinical signs and laboratory tests are inconsistent or contradictory. In our previous paper (Hausmanowa-Petrusewicz, Jędrzejowska 1971) we made an analysis of the correlation between EMG and biopsy findings, in patients observed in the period 1961—1969. We took into account both the neurogenic and myogenic muscle diseases. However, the histochemical data were then disregarded, limiting the analysis to conventional light microscopy. Figure 8 confirms the importance of both methods used in present study — EMG agrees with the overall diagnosis in 95% of the cases, muscle biopsy in 91.2% of the cases.

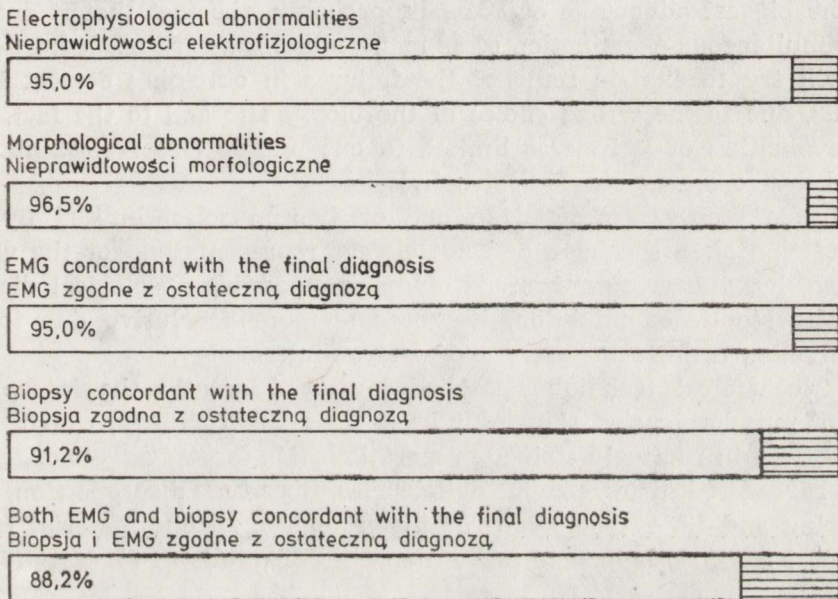


Fig. 8. Diagnostic yield of EMG and muscle biopsy (summary)

Ryc. 8. Diagnostyczna wartość EMG i biopsji mięśniowej (zestawienie zbiorcze)

Previous studies (Humphrey, Shy 1962; Brusa et al. 1963; Schwartz et al. 1966; Hausmanowa-Petrusewicz, Jędrzejowska 1971; Micaglio et al. 1980) reported concordance between EMG and biopsy findings with clinical classification in 80% to 95% of patients with myogenic diseases. Buchthal and Kamieniecka (1982) found the clinical diagnosis to be confirmed by both EMG and muscle biopsy in 77% of myogenic diseases. Their study differs from previous ones in that biopsy findings were compared with EMG only in contralateral muscles: histological abnormalities were quantified, histochemistry was studied in all muscles and specific abnormalities were distinguished from nonspecific ones.

In our material a concordance between two tested diagnostic methods was higher (88.2%) than in Buchthal and Kamieniecka series (1982).

The difference arises probably from different histological criteria used by us, especially in the group of congenital myopathies, in which the structural changes were assumed to be "specific".

The diagnostic scope of EMG, based on the quantitative evaluation of all possible parameters, is rather high. This examination is basic in the attempt to classify the diseases into two main groups — neurogenic and myogenic. The EMG was never misleading in our cases but, except for myotonic disorders, did not contribute to the nosological diagnosis.

In this paper, the diagnostic scope of EMG was artificially reduced, because, in order to obtain a correlation with a biopsy taken from the same muscle, we limited the discussion on EMG results to one muscle. This type of evaluation is, of course, voluntarily chosen.

The biggest advantage of EMG is, probably, the fact that it enables the simultaneous examination of as many muscles as are needed. Further we will try to explain some of the failures in obtaining correct EMG results, due to the wrong choice of the biopsy site and to the fact, that the evaluation of EMG was limited to one muscle (see facioscapulohumoral dystrophy, myotonic dystrophy).

Muscle biopsy, restricted to one or two muscles, limited by the size of the taken specimen and not always representative for the whole process, has the great advantage of making possible nosological diagnosis. The bioptic examination, has become more conclusive due to the introduction of histochemistry and electron microscopy.

Histochemical techniques applied improved greatly the interpretation of muscle biopsies, showing muscle fiber abnormalities, which could not be seen in routinely stained preparations (i.e. target, targetoids, cores, rods, ragged-red fibers, enzyme deficiencies, fiber type disproportion, type grouping and fiber type hypo- or hypertrophy). In our material histochemical methods helped to make a specific diagnosis in 31 cases (7.0%) (Tab. 4).

Table 4. Cases with histochemically characteristic muscle findings

Tabela 4. Zestawienie przypadków z charakterystycznym obrazem histochemicznym mięśni

Histochemical pattern Obraz histochemiczny	Number of cases Liczba przypadków
Central core myopathy Miopatia typu central core	10
Rod myopathy Miopatia nitkowata	5
Congenital fiber type disproportion Wrodzone zaburzenie typów włókien	7
Centronuclear myopathy with type I atrophy Miopatia miotubularna z zanikiem włókien typu I	2
Ophthalmoplegia + presence of ragged-red fibers Oftalmoplegia z obecnością postrzępionych czerwonych włókien mięśniowych	7

For the purpose of analyzing the pathological changes in muscle biopsy classical criteria were adopted (Dubowitz, Brooke 1973). Most of the individual pathologic features of muscle are not nosologically specific for a given disease, but, in a certain context they indicate whether the disease is primarily "myogenic" or "neurogenic". There are, however, problems concerning the interpretation of the pathological changes. Alterations described as characteristic of myopathy, have been reported in biopsies of muscles affected by chronic denervation (Drachman et al. 1967; Mumenthaler 1970).

According to Ringel et al. (1976), denervation-like changes can occur in a muscle fiber not only after neuronal damage but, also, if a portion of muscle fiber is deprived of neuronal trophic influence by a myopathic process, e.g.: 1) blocking of "trophic-influence receptors" of the post synaptic region of the neuromuscular junction, which could occur e.g. in myasthenia gravis; 2) longitudinal splitting of a part of the fiber, distant from the neuromuscular junction; 3) necrosis between a surviving part of the fiber and its neuromuscular junction; 4) fibers regeneration from myoblasts not yet innervated *in vivo* or in tissue culture.

Thus, in many neuro-muscular diseases, characterized by segmental injury to muscle fibers, such as muscular dystrophies or inflammatory myopathies, the portion of the muscle fibers, deprived of its neural influence may behave like a denervated fiber. This denervated segment could produce fibrillation potentials (Desmedt, Borenstein 1973; 1975).

In EMG, the presence of spontaneous fibrillations and positive sharp potentials, may be explained also by the involvement of the terminal nerve fibers and axon endings, in addition to muscle fibers, which results in so-called "distal neuronitis" or "neuromyositis".

In an experimental study Desmedt and Borenstein (1975) recorded fibrillation potentials from segments of muscle fibers, separated by myotomy from the part carrying the motor endplate. Segmental muscle fiber necrosis also divides the fiber into one part with and one without the end plate. Longitudinal splitting of fibers can also cause "denervated" fiber parts (Swash, Schwartz 1977; Bradley 1979). Segmental muscle fiber necrosis and muscle fiber splitting are often seen in inflammatory myopathies. This mechanism is confirmed by experiments performed by Adams et al. (1962), McComas and Mrožek (1968) and also by Ludin (1970). The latter author showed that instability of a membrane due to reduced intracellular potassium concentration would explain the occurrence of spontaneous activity without denervation. Hence, a number of the morphological changes in muscle could explain the occurrence of spontaneous activity in EMG. However, the intramuscular nerve degeneration cannot be excluded, and, in fact, the intramuscular nerve involvement has been observed in inflammatory myopathies (Coërs 1965). Even though, there are some indications of the involvement of the motor

innervation in many myopathic diseases (Coërs 1965; Jędrzejowska et al. 1965; Karpati et al. 1971; Schochet et al. 1972; Bradley et al. 1978; Henrikson, Stålberg 1978).

The observations of Humphrey and Shy (1962), Brusa et al. (1963), Schwartz et al. (1966), Black et al. (1974), Micaglio et al. (1980), and Buchthal and Kamieniecka (1982), however, suggest that a true division between the neurogenic and myogenic process exists or, at least, can be used as a convenient clinical criterion.

We were mostly interested in cases of a discrepancy between clinical diagnosis and the two basic laboratory tests: EMG and muscle biopsy and/or the discrepancy between these two tests.

No inconsistency was found between clinical and laboratory findings in 169 cases of Duchenne dystrophy, confirming the previous observations (Hausmanowa-Petrusewicz, Jędrzejowska 1971; Black et al. 1974; Micaglio et al. 1980; Buchthal, Kamieniecka 1982).

Bradley et al. (1978), in their review of 30 cases of slowly progressive x-linked recessive Becker type of muscular dystrophy from 8 families, reported both in histopathology and in EMG some features of involvement of the motor innervation. Their observations agree well with those of Goebel et al. (1979), who found a mixed "myopathic-neurogenic" pattern in muscle biopsies of 2 patients. Buchthal and Kamieniecka (1982) stated only myogenic changes both in biopsy and EMG. In one of our 7 cases in muscle biopsy, fiber type grouping and group fiber atrophy, in addition to marked myopathic changes, were seen, whereas in EMG, a typical myogenic record was present. The problem arises as to whether the pathological process does primarily involve both muscle and motor nerves, or in chronic diseases of this type, the pathological interplay between muscle and motor innervation can result in neurogenic changes.

The same concerns the limb-girdle syndromes, where the interplay between pathologically changed muscle and motor innervation may result in "neuropathic" alterations in "myopathic" biopsy. As pointed out by Bradley (1979), every patient in his group had changes indicating myopathy and denervation at the same time. He found no relationship between changes in EMG and muscle biopsy. This was true in his series even when EMG was performed on the same muscle on contralateral side to that where biopsy was taken. Black et al. (1974) found myopathic changes, both in EMG and muscle biopsy, in 3 patients with limb-girdle dystrophy with family history and 10 patients with limb-girdle syndrome, which failed to show any significant clinical feature that would help distinguishing between polymyositis and sporadic limb-girdle dystrophy. Patients with slowly progressing weakness of pelvic and shoulder girdle muscles, who do not have morphologically or biochemically distinct findings in muscle biopsy, are diagnosed as a limb-girdle dystrophy. There are 64 such patients in our material. There is a great concordance be-

tween EMG and muscle biopsy findings in our group. Only in one case, minor pathological changes suggesting denervation, in addition to marked myopathic alterations, are present. There may be some difficulty in distinguishing them from chronic spinal muscular atrophies. Coërs and Tellerman-Toppet (1979) found that the terminal innervation ratio was increased in limb-girdle cases, classified as denervation and might help distinguishing spinal muscular dystrophy.

The confusions arising from histopathological evaluation of biopsy in facioscapulohumeral dystrophy are mentioned even in text-books (Carroll 1979). The sampling problem is a very difficult one in this type of dystrophy. There were a number of cases described with normal biopsy from one muscle and with obvious changes from another ones (Carroll 1979). Also in Buchthal and Kamieniecka series (1982) in 5 cases from 25, the EMG or biopsy testing was either inconsistent with diagnosis or of nodiagnostic value. It occurred also in our series. However, the EMG performed in other muscles (beside contralateral to biopsy muscle) proved the myogenic character of the cases. In our material, this appears to be true not only for deltoid muscle, since 6 patients with definite clinical features had normal biopsy taken from different muscles (4 taken from biceps, 1 from deltoid and 1 from quadriceps muscle). Munsat et al. (1972) described prominent inflammatory infiltrates in muscle biopsied from several members of a family with this syndrome. We observed inflammatory response in 2 cases. In general, the biopsies in facioscapulohumeral dystrophy show milder changes than in other dystrophies.

In myotonic dystrophy, the bioptic picture may vary from near normal to markedly changed. The common finding, although not specific, and which does not occur in all biopsies, is a type I atrophy and type II hypertrophy, a predominance of type I fibers (Engel, Brooke 1966; Dubowitz, Brooke 1973), but also the presence of ring-binden fibers and centrally placed nuclei. Some biopsies (Casanova, Jerusalem 1979) may indicate a neurogenic process, although no morphologic abnormality of peripheral nerve was found by Pollock and Dyck (1976) in myotonic dystrophy. In our material, changes suggesting neurogenic impairment in biopsy (taken from proximal muscles), were present in 3 patients, in whom, clinically, the coexistence of peroneal muscular atrophy with myotonic dystrophy was seen (Hausmanowa-Petrusewicz et al. 1977). In those 3 cases, EMG from other muscles, beside the biceps brachii, confirmed the mixed character of the cases. Thus, muscle biopsy, in these cases is a more sensitive method of showing early denervation (reinnervation changes).

In one case (No 10), a 7 year old girl with percussion myotonia and family history, both EMG and biopsy were normal. Investigations were obviously performed too early since distinct clinical symptoms developed later in the course of the disease.

The growing field in neuromuscular disorders are congenital myopathies with characteristic structural changes. Our knowledge is based mostly on histochemical and EMG data. The conventional quantitative EMG can merely classify this group into myogenic diseases, which has no nosological meaning. EMG can, however, help in describing the state of a muscle as much more benign than e.g. in dystrophies or only slightly — if at all — progressive (Hausmanowa-Petrusewicz, Ryniewicz 1976).

Many of these entities overlap and may be indistinguishable on any ground other than morphological. In many cases, the severity of the morphological changes seems to be unrelated to the clinical weakness in the muscle (Brooke et al. 1979). The EMG most often shows similar changes in various myopathies again not correlated with the severity of the disease. This was also true in our material. The EMG changes were usually mild, and in 3 cases (No 24, 25, 26) with definite abnormalities in muscle biopsy (2 cases of congenital fiber type disproportion and one case of rod myotrophy), even normal. The cause of this discrepancy remains obscure and is probably due to insufficient sensitivity of EMG.

The poorly defined group called "undetermined myopathies" includes patients with distinct clinical manifestations of myopathy who have myogenic EMG and biopsy with no morphologically or biochemically specific findings. It is possible that different etiology and pathogenesis operates in each patient. A high incidence of discrepancy was found in this group. EMG and biopsy results were dissociated in 24% of cases. This group is, however, open for further investigations.

In polymyositis Lambert et al. (1950; 1954) described the occurrence of fibrillations (and less often other types of spontaneous activity), and Vilppula (1972) confirmed these observations. The pathogenesis of this spontaneous activity is still a matter of discussion. Originally, some authors (Bauvens 1956; Richardson 1956) considered it to be connected with changes in distal nerve findings which lead to denervation. Lambert (1954) considered this activity to be a result of the well-known phenomenon of muscle fiber splitting.

As can be seen from our results (Tab. 2), the EMG showed no neurogenic pattern in any case of myopathy. In the present study the EMG test is found to be, however, not sensitive enough in some mild cases (for instance congenital myopathies), but never misleading. As has been stated many times, this test is never (except for myotonic disorders), specific and does not give a clue to the nosological diagnosis.

The appearance of neurogenic signs in myopathic biopsy in cases with myogenic EMG represents the most frequent inconsistency in our material. One possible explanation is that, EMG is not sensitive enough to detect such minor neurogenic alterations; the other is that, changes we considered neurogenic in muscle biopsy may result, in part, from muscle fiber splitting.

The reasons for the discrepancies stated in the present study may be classified as follows: 1) the wrong choice of biopsy site; 2) unduly conventional or difficult appraisal of histologic alterations; 3) insufficiently sensitive EMG testing which does not enable to detect minimal changes, which may be seen in histochemistry and EMG; 4) the inconclusive bioptic features in very advanced stages of morbid process when EMG shows, usually, the distinct character of the abnormalities; 5) the mixed histopathological pattern seen in some muscles, whereas the EMG usually has some more distinct features.

We feel that it is useful to make a retrospective study on the basis of our experience. It gives us some indication as to what should be done further and what to avoid. Also, it gives us an idea as to the scope and limitations of these two diagnostic methods.

Some authors expressed the view that the division of neuromuscular diseases into two groups, neurogenic and myogenic is a false one. In turn, other authors (McComas et al. 1971) believe that most myopathies are neural. According to our experience, the classification into neurogenic and myogenic neuromuscular diseases is justified and practically useful. Other authors who make use of the quantitative EMG (Mumenthaler 1963; Black et al. 1974; Buchthal, Kamieniecka 1982) have reached the same conclusion.

The necessary conditions for increasing the diagnostic yield of both methods are: quantification, unconventional appraisal of the data and the use of supplementary methods, both in EMG and histology.

*

Acknowledgement: We wish to thank Drs. Barbara Emeryk, Aniela Kopeć, Katarzyna Rowińska, Elżbieta Szmidt from EMG laboratory who recorded and evaluated electro myograms and Barbara Badurska, Anna Fidziańska, Ewa Sawicka and Halina Strugalska from morphological laboratory, who read muscle biopsies, in the period under consideration.

WARTOŚĆ DIAGNOSTYCZNA ILOŚCIOWEJ ELEKTROMIOGRAFII I BIOPSIJ MIĘŚNIOWEJ W MIOPATIACH

Opis 464 przypadków

Z 1077 przypadków chorób nerwowo-mięśniowych leczonych w Klinice Neurologicznej AM w Warszawie w latach 1970—1980 wybrano 464 przypadki chorób pierwotnie mięśniowych. Rozpoznanie ustalono biorąc pod uwagę dane kliniczne, genetyczne oraz wyniki szeregu testów laboratoryjnych. Oceniano przydatność diagnostyczną badań elektromiograficznych (EMG) i wycinka mięśniowego (WM) oraz porównywano wyniki tych dwóch rodzajów badań. Porównanie dotyczyło jedynie wyników EMG i WM w 2 mięśniach kontralateralnych, co różni tę pracę od podobnych poprzednio publikowanych, a wydaje się słuszne ze względu na większą dokładność oceny. Wyniki EMG i biopsji mięśniowej były zgodne z rozpoznaniem w 409 przypadkach (88,2%). U 8 pacjentów (1,5%) z wyraźnymi klinicznymi objawami uszkodzenia układu mięśniowego, wyniki EMG i WM były prawidłowe. W 47 przypadkach stwierdzono niezgodność pomiędzy dwiema oceniami

nymi metodami diagnostycznymi. Jako przyczyny tych rozbieżności rozpatrywano między innymi: 1) Zły wybór miejsca wycinka; 2) Niedostateczną czułość badania EMG, które nie wykrywa niewielkich zmian patologicznych, widocznych w badaniu histochemicznym lub elektronowo-mikroskopowym; 3) Trudną interpretację zmian morfologicznych w przypadkach bardzo zaawansowanych, podczas gdy EMG daje w tych przypadkach odpowiedź jednoznaczną; 4) Mieszany charakter zmian morfologicznych w mięśniu, podczas gdy w EMG wyraźnie przeważają cechy neurogenne lub mioгенne.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ЭЛЕКТРОМИОГРАФИИ И МЫШЕЧНОЙ БИОПСИИ ПРИ МИОПАТИЯХ

Анализ 464 больных

Резюме

Из 1077 случаев нервно-мышечных заболеваний госпитализированных в Нейрологической Клинике Медакадемии в Варшаве, в 1970—80 годах, были выбраны 464 случая первично мышечных заболеваний. Диагноз был поставлен на основе клинических и генетических данных, а также ряда лабораторных тестов. Была оценена диагностическая пригодность электромиографических исследований (ЭМГ) и мышечной биопсии (Му), а также сравнивались результаты этих двух видов исследований. Сравнение относилось лишь к результатам ЭМГ и МУ в 2 контрлатеральных мышцах, что отличает эту работу от подобных, ранее опубликованных, и повидимому, является целесообразным ввиду большей точности оценки. Результаты ЭМГ и мышечной биопсии сходны с диагнозом в 409 случаях (88,2%). У 8 пациентов (1,5%) с явными нарушениями мышечной системы, результаты ЭМГ и МУ отклонялись от нормы. В 47 случаях была обнаружена несогласованность между оценками двух диагностических методов. Причины расхождений усматриваются в частности в: 1) Неправильном выборе места для биопсии; 2) Недостаточной чувствительности исследования ЭМГ, которое не обнаруживает небольших патологических изменений, улавливаемых в гистохимическом или электронно-микроскопическом исследовании; 3) Сложной интерпретации морфологических изменений в длительных случаях, в то время как ЭМГ дает в этих случаях однозначный ответ; 4) Смешанном характере морфологических изменений в мышце, в то время как в ЭМГ отчетливо преобладают нейрогенные или миогенные черты.

REFERENCES

1. Adams R. D., Denny-Brown D., Pearson C. M.: Diseases of muscle. New York 1962, 72—90.
2. Bauwens P.: Variations of the motor unit. Proc. Roy. Soc. Med., 1956, 49, 110—114.
3. Black J. T., Bhatt C. P., De Jesus P. V., Schotland D. L., Rowland L. P.: Diagnostic accuracy of clinical data, quantitative electromyography and histochemistry in neuromuscular disease. J. neurol. Sci., 1974, 21, 59—70.
4. Bradley W. G.: Limb-girdle syndromes. In: Handbook of clinical neurology, Diseases of muscle, Part I. Eds: P. J. Vinken, G. W. van Bruyn. 1979, 453—462.
5. Bradley W. G.: Muscle fiber splitting. In: Muscle regeneration. Ed.: A. Mauro. Raven Press, New York 1979, 215—232.
6. Bradley W. G., Jones M. Z., Mussini J. M., Fawcett P. P. W.: Becker-type muscular dystrophy. Muscle and Nerve, 1978, 1, 111—132.
7. Brooke M. H., Carroll J. E., Ringel S. P.: Congenital hypotonia revisited. Muscle and Nerve, 1979, 2, 84—100.

8. Brusa A., Loeb C., Moretti G., Sacco G.: A comparison of histologic and electromyographic findings in various neuromuscular disorders. *Neurology (Minneapolis)*, 1963, 13, 630—640.
9. Buchthal F.: An introduction to electromyography. Scandinavian University Books, Gyldendal, Copenhagen, 1957, 1—43.
10. Buchthal F.: The electromyogram. *World Neurol.*, 1962, 3, 16—34.
11. Buchthal F.: Electrophysiological signs of myopathy as related with muscle biopsy. *Acta Neurol.*, 1977, 32, 1—29.
12. Buchthal F., Kamieniecka Z.: The diagnostic yield of quantified electromyography and quantified muscle biopsy in neuromuscular disorders. *Muscle and Nerve*, 1982, 5, 255—280.
13. Carroll J. E.: Facioscapulohumeral and scapulooperoneal syndromes. In: *Handbook of clinical neurology, Diseases of muscle, Part I*. Eds: P. J. Vinken, G. W. Bruyn. 1979, 421—433.
14. Casanova G., Jerusalem F.: Myopathology of myotonic dystrophy. A morphometric study. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1979, 45, 231—240.
15. Coërs C.: Histology of the myoneural function in myopathies. *Muscle Proceedings of the Symposium at the University of Alberta, June 1964*, Pergamon Press, Oxford, New York, Toronto, Sydney 1965, 453—478.
16. Coërs C., Telerman-Toppet N.: Differential diagnosis of limb-girdle muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Neurology (Minneapolis)*, 1979, 29, 957—972.
17. Desmedt J. E., Borenstein S.: Collateral innervation of muscle fibres by motor axons of dystrophic motor units. *Nature*, 1973, 246, 500—501.
18. Desmedt J. E., Borenstein S.: Relationship of spontaneous fibrillation potentials to muscle fibre segmentation in human muscular dystrophy. *Nature*, 1975, 258, 531—534.
19. Drachman D. B., Murphy S. R., Nigam M. P., Hills J. R.: "Myopathic" changes in chronically denervated muscle. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1967, 16, 14—24.
20. Dubowitz V. M.: Histochemical aspects of muscle disease. In: *Disorders of voluntary muscle*. Ed. J. N. Walton. Churchill and Livingstone, London, 1981, 261—295.
21. Dubowitz V. M., Brooke M. H.: *Muscle biopsy: A modern approach*. Saunders, Philadelphia 1973, 1—475.
22. Dyken M. L., Smith D. M., Peache R. Z.: An electromyographic diagnostic screening test in Mc-Ardle's disease and a case report. *Neurology (Minneapolis)*, 1967, 17, 45—56.
23. Engel W. K.: Focal myopathic changes produced by electromyographic and hypodermic needles. "Needle myopathy". *Arch. Neurol.*, 1967, 16, 509—511.
24. Engel W. K., Brooke M. H.: Histochemistry of myotonic disorders. In: *Progressive Muskeldystrophie, Myotonie, Myasthenie*. Ed. E. Kuhn. Springer, Stuttgart 1966, 203—222.
25. Goebel H. H., Prengel H., Gulotta F., Kiefer H., Jones M. Z.: Becker's X-linked muscular dystrophy. Histological, enzyme-histochemical and ultrastructural studies of two cases, originally reported by Becker. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1979, 46, 69—77.
26. Hausmanowa-Petrusewicz I.: Diagnostic value of quantitative electromyography. Its scope and limitations. In: *Contemporary clinical neurophysiology*. Eds. W. A. Cobb, H. Van Duijn. Elsevier, Amsterdam, 1978, Suppl. 34, 487—492.
27. Hausmanowa-Petrusewicz I., Emeryk B., Wąsowicz B., Kopec A.: Electromyography in neuromuscular diagnostics. *Electromyography*, 1967, 7, 203—225.
28. Hausmanowa-Petrusewicz I., Jędrzejowska H.: Correlation between electromyographic findings and muscle biopsy in case of neuromuscular disease. *J. neurol. Sci.*, 1971, 13, 85—106.

29. Hausmanowa-Petrusewicz I., Ryniewicz B.: EMG findings in s.c. nonprogressive myopathies. *J. Neurol.*, 1976, 211, 241—251.
30. Hausmanowa-Petrusewicz I., Jędrzejowska H., Rowińska-Marcińska K., Borkowska J.: Coexistence of peroneal muscular atrophy and myotonic dystrophy features. In: *Peroneal atrophy and related disorders*. Eds. G. Serratrice, H. Roux. Masson Press, New York 1977, 49—66.
31. Henrikson K., Stalberg E.: The terminal innervation pattern in polymyositis. A histochemical and SFEMG study, *Muscle and Nerve*, 1978, 1, 3—12.
32. Humphrey J. G., Shy C. M.: Diagnostic electromyography. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1962, 6, 339—362.
33. Jędrzejowska H., Johnson A. G., Woolf A. L.: The intramuscular nerve endings in muscular dystrophy. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1965, 5, 225—242.
34. Karpati G., Carpenter S., Andermann F.: A new concept of childhood nemaline myopathy. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1971, 24, 291—304.
35. Lambert E. H., Beckett S., Chen C. J., Eaton L. M.: Unipolar electromyograms of patients with dermatomyositis. *Fed. Proc.*, 1950, 9, 76—89.
36. Lambert E. H., Sayre G. P., Eaton L. M.: Electrical activity in muscle in polymyositis. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 1954, 79, 64—69.
37. Ludin M. P.: *Electromyography in practice*. Thieme, Stuttgart 1970, 94—96.
38. McComas A. J., Mrozek K.: Denervated muscle fibres in hereditary muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1968, 30, 526—531.
39. McComas A. J., Sica R. E. P., Campbell M. J.: Sick motoneurons. An unifying concept of muscle disease. *Lancet*, 1971, 1, 321—325.
40. Micaglio G. F., Negrin P., Fardin P.: Diagnostic value of EMG compared with that of muscle biopsy in 71 myopathies. *Acta Neurol. (Napoli)*, 1980, 35, 51—57.
41. Mumenthaler M.: Valeur de la biopsie pour le diagnostic des maladies neuromusculaires. Etude de 235 cas personnels. *Rev. Neurol.*, 1963, 108, 462—469.
42. Mumenthaler M.: Myopathy in neuropathy. In: *Muscle diseases*. Eds: J. N. Walton, N. Canal, G. Scarlato. Excerpta Medica, International Congress Series, Amsterdam 1970, 199, 585—598.
43. Munsat T. L., Piper D., Cancilla P., Mednick J.: Inflammatory myopathy with facioscapulohumeral distribution. *Neurology (Minneapolis)*, 1972, 22, 335—347.
44. Paakari T., Mumenthaler M.: Needle myopathy. An experimental study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1974, 208, 133—138.
45. Pollock M., Dyck P. J.: Peripheral nerve morphometry in myotonic dystrophy. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1976, 33, 33—39.
46. Richardson A. T.: Clinical and electromyographic aspects of polymyositis. *Proc. Roy. Soc. Med.*, 1956, 49, 111—116.
47. Ringel S. P., Bender A. N., Engel W. K.: Extrajunctional acetylcholine receptors. *Arch. Neurol. (Chic.)*, 1976, 33, 751—758.
48. Schochet S. S., Zellweger H., Ionasescu V., McCormick W. G.: Centronuclear myopathy: disease entity or syndrome? *J. Neurol.*, 1972, 16, 215—228.
49. Schwartz R. A., Archibald K. C., Hagstrom J. W.: Correlative findings by electromyography and muscle biopsy in neuromuscular disorders. *Arch.-Phys. Med. Rehab.*, 1966, 47, 653—658.
50. Swash M., Schwartz M.: Implications of longitudinal muscle fiber splitting in neurogenic and myopathic disorders. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1977, 40, 1150—1159.
51. Vilppula A.: Muscular disorders in some collagen diseases. *Acta Med. Scand.*, 1972, Suppl. 540, 1—72.

Authors' address: Department of Neurology, Medical School, 4, Lindleya Str., 02-005 Warszawa

HALINA WEINRAUDER, ANNA ZARĘBA-KOWALSKA

IMMUNOFLUORESCENT DEMONSTRATION OF GLIAL
FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN (GFAP)
IN HYPOPHYSEAL NEURAL LOBE *IN VITRO* *

Neuropathology Department, Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences

The morphological features of pituicytes are relatively well known (see Wittkowski 1980, for review). Although on this basis they were considered to be glial cells, their classification and suggested neuroectodermal origin required final proof. The application of the specific astrocytic marker — GFAP — by Suess and Pliška (1981) and Salm et al. (1982) provided evidence that pituicytes of the rat hypophyseal neural lobe *in vivo* are indeed glial cells exhibiting remarkable similarities to astrocytes. GFAP, a protein isolated by Eng et al. (1971) was localized in fibrillary astrocytes (Bignami et al. 1972; Uyeda et al. 1972; Bignami, Dahl 1974; 1977), as well as in protoplasmic astrocytes in which glial filaments were not present (Bissel et al. 1974; Ludwin et al. 1976; Braak et al. 1978). This protein, considered to be the main component of 9—10 nm intermediate filaments of astrocytes (Eng, Kosek 1974; Schachner et al. 1977; Fedoroff et al. 1983), is now commonly used as an antigenic marker in studies of development, differentiation and pathology of glia *in vivo* and *in vitro* (for review see Raff et al. 1979).

In this work an attempt has been made to demonstrate GFAP in organotypic cultures of hypophyseal neural lobes derived from newborn rats and to describe the morphology of GFAP-positive cells by using indirect immunofluorescence technique. Insofar such cells have only been characterized in studies *in vivo* (Suess, Pliška 1981; Salm et al. 1982). Organotypic cultures of the rat hypophyseal neural lobes maturing *in vitro* were described for the first time by Zaręba-Kowalska et al. (1983); preliminary results of studies on glial markers in pituicytes *in vitro* have been published elsewhere (Zaręba-Kowalska, Weinrauder 1984).

* Presented in part at the International Symposium on Histochemistry and Cytochemistry, Poznań, June 3-5, 1983

MATERIALS AND METHODS

Organotypic cultures

Twenty newborn Wistar rats of both sexes were decapitated, the cranial cavity opened and the brain removed. The neural lobes were separated from pars intermedia and adenohypophysis. 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% saline extract of 9-day-old chicken embryo. It was supplemented with glucose (600 mg/100ml) and penicillin (100 units/ml). The pH of the medium ranged from 7.0 to 7.3. The cultures were examined with a light microscope.

Indirect immunofluorescence

Selected 12-day-old cultures were washed 3 times for 10 min in buffered physiological salt solution (PBS), quickly air dried and fixed in cold acetone (-20°C) for 4 min. They were then stored at a temperature -20°C . Before the test, the cultures were quickly rinsed in PBS and air dried. In the test anti-GFAP human serum* (diluted 1:100), as a first layer for 30 min and gamma globulins against rabbit γ -globulins (IgG/F(ab)₂ — fragment, fluorescein conjugated, Behringwerke, FRG) (diluted 1:20) for 30 min as a second layer were applied. This was followed by rinsing in PBS (3×15 min). All incubations and washings were performed at a room temperature. Finally, coverslips were mounted in a solution containing 9 parts of glycerol and 1 part of PBS and examined under a Leitz Orthoplan fluorescence microscope with appropriate filters.

Controls were processed by substituting PBS or normal rabbit serum for GFAP antiserum or by substituting PBS for fluorescein-labeled antibody. Further controls of GFAP specificity consisted of HeLa and monkey kidney cultures, on which the immunofluorescent tests were performed.

RESULTS

In the outgrowth zones of the rat hypophyseal neural lobe cultures, conglomerations of GFAP-positive cells were observed. They consisted mostly of "flat" cells varying in number, exhibiting a negative nucleus, a cytoplasm of fibrous structure and several short, thick processes, in which fluorescence appeared condensed (Fig. 1). Spindle-shaped, bipolar cells were also found in these conglomerations (Fig. 2). Individual cells

* Kindly supplied by Dr. Elisabeth Bock from Protein Laboratory, University of Copenhagen

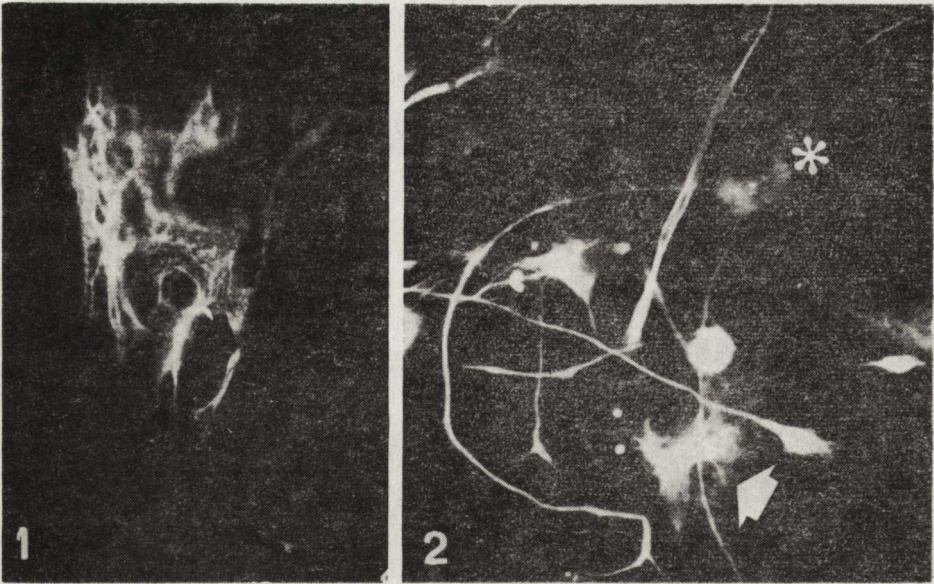


Fig. 1. Outgrowth zone. "Flat" pituicyte exhibiting negative nucleus and fibrillary pattern of immunofluorescence in cytoplasm. Cell lying against a background of GFAP-negative cells. $\times 600$

Ryc. 1. Strefa wzrostu. Pituicyt z ujemnym jądrem i włóknkową strukturą odczynu immunofluorescencyjnego w cytoplazmie, leżący na tle komórek o ujemnym odczynie na GFAP. Pow. 600 \times

Fig. 2. Conglomeration of GFAP-positive cells showing considerable polymorphism. Spindle-shaped and spider-shaped cells and cells with short processes and fibrillary pattern of cytoplasm (arrow). Note cell with very long branched processes (asterisk). $\times 400$

Ryc. 2. Grupa komórek o dodatnim odczynie na GFAP i znacznym polimorfizmie. Komórki wrzecionowate, „pajęczkowate” oraz komórki z krótkimi wypustkami i włóknkową strukturą cytoplazmy (strzałka). Wyróżnia się komórka z bardzo długimi, rozgałęzionymi wypustkami (gwiazdka). Pow. 400 \times

were sometimes seen lying on the periphery of the culture some distance from the explant. Clusters of GFAP-positive cells were generally visible against a background of GFAP-negative cells or cells with weak fluorescence at varying distance from the periphery of the explant, frequently without distinct connection to the explant.

In some cultures the pituicytes, lying in a three-dimensional network of fluorescing cells and showing very long, thick and multibranching processes were observed. They appeared to be growing out of the explant and had very strong fluorescence (Fig. 3). Some cells exhibited perinuclear condensation of fluorescence and had a noticeable delicate network of fibrils in their cytoplasm. The cells lying relatively loosely in the outgrowth zone had stellate or spider-like shape, typical of astrocytes, and showed a very strong, brilliant fluorescence. The observed morphological pictures indicated considerable cellular polymorphism. The pituicytes lying in the outgrowth zone often possessed a small perikaryon

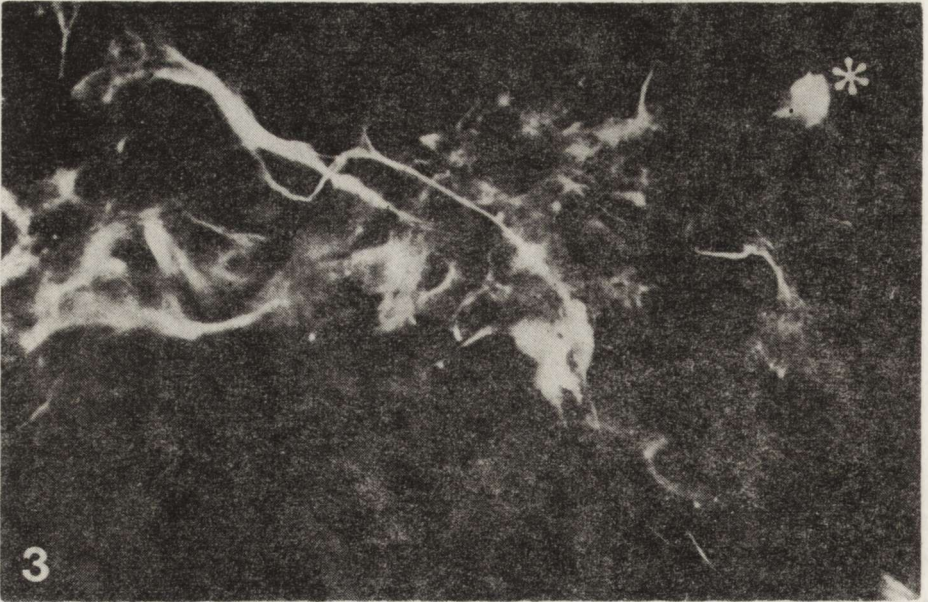


Fig. 3. Periphery of explant. At lower part of figure oval cells with very weak reaction. At upper part — conglomeration of cells lying in network of processes exhibiting very strong fluorescence. Spider-shaped cell with brilliant fluorescence in perikaryon and thin processes (asterisk). $\times 400$

Ryc. 3. Brzeg eksplantatu. W dolnej części zdjęcia owalne komórki o bardzo słabym odczynie, w górnej — skupienie komórek leżących w splecionej sieci wypustek wykazujących bardzo silną fluorescencję. „Pajączkowata” komórka z silną fluorescencją w perykarionie i z cienkimi wypustkami (gwiazdka). Pow. $400 \times$

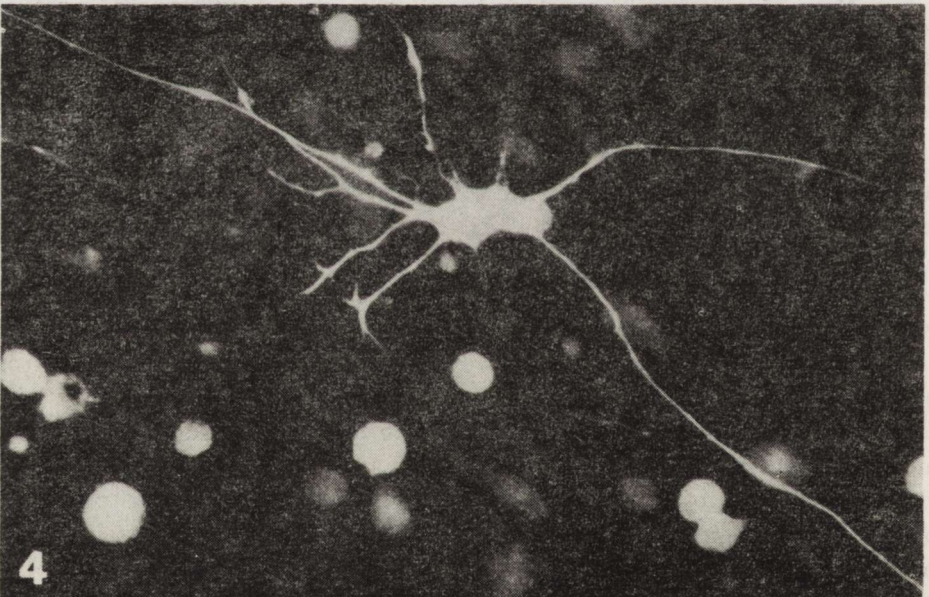


Fig. 4. Astrocyte-like cell with numerous long and multibranching processes exhibiting very strong immunoreactivity. $\times 600$

Ryc. 4. Komórka astrocytów-podobna z licznymi, długimi, rozgałęzionymi wypustkami i z bardzo silnym odczynem. Pow. $600 \times$

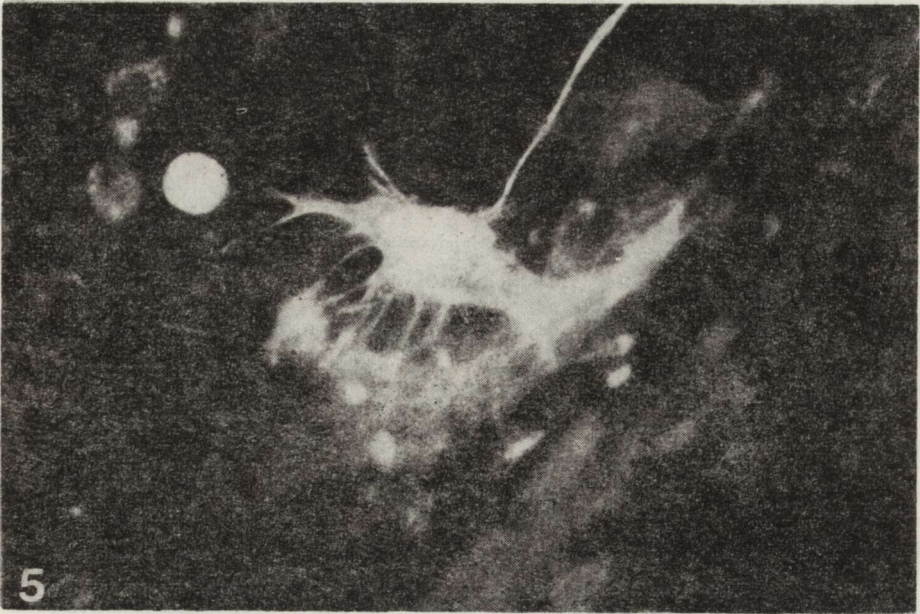


Fig. 5. Outgrowth zone. Strongly fluorescing pituicyte with "bizarre" shape lying against a background of cells with weak GFAP reaction. $\times 800$

Ryc. 5. Strefa wzrostu. Pituicyt o intensywnej fluorescencji i „dziwacznym” kształcie, leżący na tle komórek ze słabym odczynem na GFAP. Pow. $800 \times$

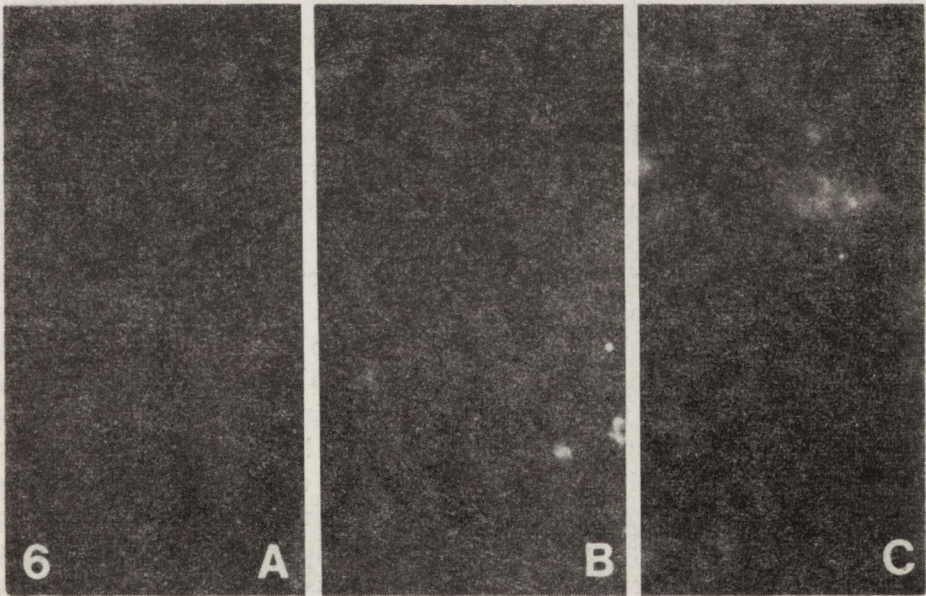


Fig. 6. Control tests. A. Hypophyseal neural lobe — reaction with PBS instead of GFAP antiserum. B. HeLa cells culture — reaction with GFAP antiserum. C. Monkey kidney culture — reaction with GFAP antiserum. $\times 400$

Ryc. 6. Odczyny kontrolne. A. Nerwowy płąt przysadki — odczyn z PBS zamiast surowicy anty GFAP. B. Hodowla komórek HeLa — odczyn z surowicą anty GFAP. C. Hodowla nerki małpiej — odczyn z surowicą anty GFAP. Pow. $400 \times$

and very long, slender and ramified processes (exceeding many times the diameter of a perikaryon), (Fig. 4). Also found were cells showing epithelioid morphology with a "flat" cellular body and short, thick processes ("flat" epithelioid cells) as well as "bizarre" forms with thickened processes resembling reactive astrocytes (Fig. 5).

All control tests were negative (Fig. 6), both those in which PBS or normal serum was substituted for GFAP antiserum as well as those in which HeLa cultures and monkey kidney cultures were used. This confirmed the specificity of the immunofluorescent test with anti-GFAP serum used.

DISCUSSION

The present work provided, for the first time, evidence for the presence of GFAP — specific astrocytic marker in pituicytes *in vitro*. Insofar, the GFAP immunoreactivity in pituicytes was demonstrated only *in vivo* in the human neural lobe (Velasco et al. 1979) and mature rat neural lobe (Suess, Pliška 1981; Salm et al. 1982).

Pituicytes cultured for 12 days presented a homogeneous cell population. The central part of the explant was composed of oval-shaped cells exhibiting weak immunoreactivity, while the cells lying at the periphery of the explant, especially in the outgrowth zone, showed strong fluorescence and astrocyte-like morphology. Suess and Pliška (1981) demonstrated that after 6 days of implantation of dissected mature rat neural lobe under the kidney capsule, GFAP-reactivity was frequently missing in the central part of the explant. The authors interpreted this phenomenon as a rapid disappearance of GFAP from "nonfunctional" cells. In the present experimental conditions *in vitro* absence or weak GFAP reaction may have resulted from an incomplete maturation of the cells. Pituicytes growing out of the explant were stellate-shaped, similar to astrocytes, and frequently layed in the network of intermingled processes exhibiting strong GFAP-immunoreactivity. The cells lying relatively loosely in the outgrowth zone, having no distinct connection with the explant, were characterized by considerable morphological polymorphism and some of them showed features similar to these of reactive cells. They were distinguished from the rest of the population by very strong fluorescence. Salm et al. (1982) pointed out the intensification of GFAP-reactivity in pituicytes of the mature rat neural lobe in comparison to astrocytes *in vivo*. Comparative studies performed on organotypic cultures of newborn rat neural lobe and cerebellum appear to confirm this phenomenon (Weinrauder, in preparation). This may suggest the occurrence of a greater number of GFAP antigenic determinants in pituicytes than in astrocytes. As was demonstrated by the method applied, the pituicytes showed considerable morphological polymorphism in

the outgrowth zone: stellate-shaped, spider-shaped, bipolar (comet-like) cells as well as "bizarre" forms with thickened, branched processes were observed. Considerable polymorphism of astrocytes *in vitro* was described by Duffy (1982) and Fedoroff et al. (1983). In younger cultures, Duffy (1982) observed many spindle-shaped cells with very strong GFAP-reactivity in the cytoplasm. With progressive differentiation of astrocytes in culture, cells appeared with small perikarya and numerous long, well developed processes rendering a stellate shape to the cells. Very similar forms were observed in our material. Some cultured pituicytes took on "bizarre" shapes, similar to those of the reactive astrocytes *in vitro* previously described by other authors (Manthorpe et al. 1979; Duffy 1982; Fedoroff et al. 1983). Considerable polymorphism and the appearance of reactive forms of astrocytes in association with the intensification of immunoreactivity in reaction with anti-gial serum was observed in cultured rat cerebellum subjected to MNU (Weinrauder, Kraśnicka 1982). It seems that glial antigen production increases in stimulated reactive astrocytes *in vitro*. Increased GFAP may have expressed an increased potential for filament formation, and this in turn may illustrate the process of structural adaptation of the cells to culture conditions (Buckley, Porter 1967; Weinstein, Kornblith 1971). The fibrillary pattern of fluorescence was observed only in some pituicytes, the majority of cells exhibited reaction of diffuse character.

The presence of 8–9 nm intermediate filaments in pituicytes was questioned. In ultrastructural studies of fetal, immature and mature rats (Galabov, Schiebler 1978; Dellmann, Sikora 1981) stressed the absence of glial filaments in pituicytes. On the other hand, in an earlier examination based only on light microscopic morphology, Dellmann (1962) mentioned fibrous and protoplasmic pituicytes in the posterior pituitary. The appearance of numerous filaments in cultured pituicytes starting from the third week *in vitro* was noted in ultrastructural studies performed in our laboratory (Gajkowska, Zaręba-Kowalska 1983). Takei et al. (1980) also reported that non-neoplastic pituicytes of human cancer patients contained numerous filaments in their cytoplasm. This supports the case for the appearance of glial filaments in reactive pituicytes but does not allow to predict the presence of GFAP in association with them because glial filaments may also have an antigenic character different from that of GFAP (Paetau et al. 1979). Immunoreactive soluble GFAP was found in the absence of glial filaments in C-6 glioma cultures (Bissel et al. 1974) and in astrocytomas (Eng, Rubinstein 1978), thus it is possible that GFAP-positive cells exhibiting a diffuse pattern of fluorescence have the capacity to form glial filaments. Glial filament formation may be considered as a dual process involving the synthesis of GFAP monomer subunits and subsequent initiation of polymerization (Jacque et al. 1980). This would seem to be a key issue in explaining

GFAP function and gliofibrillogenesis in normal and pathological cells.

The occurrence of glial markers in cells of the pituitary gland suggest their glial character and may be very useful in the identification of the particular types of cells of the gland. Apart from GFAP, the S-100 protein — another glial marker — was studied in the pituitary gland. The presence of S-100 was noted in folliculo-stellate cells of the rat anterior pituitary (Cocchia, Miani 1980; Nakajima et al. 1980) as well as in pituicytes of the posterior pituitary (Cocchia, Miani 1980; Shirasawa et al. 1983).

The results of our studies provide further evidence for the neuroectodermal origin of pituicytes and indicate that pituicytes cultured for 12 days *in vitro* retain their antigenic properties in relation to GFAP. In our opinion, the possibility of following cell growth and differentiation *in vitro*, which may shed light on the functional role of GFAP which to date is little known, is deserving particular attention. The organotypic culture of neural lobe seems to be a very useful experimental model for such studies.

IMMUNOFLUORESCENCYJNA LOKALIZACJA KWAŚNEGO BIAŁKA WŁÓKIENEK GLEJOWYCH (GFAP) W PŁACIE NERWOWYM PRZYSADKI IN VITRO

Streszczenie

Badano występowanie i lokalizację kwaśnego białka włókienek glejowych (GFAP) w 12-dniowych hodowlach płata nerwowego przysadki noworodka szczura. Przy pomocy pośredniej metody immunofluorescencji stwierdzono występowanie GFAP w komórkach wyrastających z eksplantatu i leżących w strefie wzrostu. Obserwowano komórki o typowej włókienkowej budowie cytoplazmy i krótkich, szerokich wypustkach, a także komórki z dyfuzyjną fluorescencją cytoplazmy i silnie rozbudowaną siecią wypustek. Komórki GFAP-dodatnie w hodowlach 12-dniowych cechował znaczny polimorfizm. W eksplantatach komórki dodatnie spotykano rzadko, a odczyn nie miał włókienkowej struktury. Wyniki badań potwierdzają neuroektodermalne pochodzenie pituicytów i wskazują na zachowanie przez nie, wspólnych z astrocytami, właściwości antygenowych w warunkach *in vitro*.

ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНТНА ДЕМОНСТРАЦИЯ КИСЛОГО ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО БЕЛКА (GFAP) В НЕРВНОЙ ДОЛИ ГИПОФИЗА IN VITRO

Резюме

Авторы исследовали выступление и локализацию кислого глиозного фибриллярного белка (GFAP) в 12-дневных культурах нервной доли гипофиза новорожденной крысы. При помощи косвенного метода иммунофлуоресценции констатировано выступление GFAP в клетках вырастающих из эксплантата и лежащих в зоне роста. Авторы наблюдали клетки

с типичным фибриллярным строением цитоплазмы и с короткими, широкими отростками, а также клетки с диффузионной флуоресценцией цитоплазмы и с сильно развитой сетью отростков. GFAP—положительные клетки в 12-дневных культурах отличались значительным полиморфизмом. В экплантатах положительные клетки встречались редко, а реакция не имела фибриллярной структуры. Результаты исследований подтверждают невроэктодермальное происхождение питуцитов и указывают на сохранение ими, общих с астроцитами, антигенных свойств в условиях *in vitro*.

REFERENCES

1. Bignami A., Dahl D.: Astrocyte-specific protein and neuroglia differentiation. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic protein. *J. comp. Neurol.*, 1974, 153, 27—38.
2. Bignami A., Dahl D.: Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J. Histochem. Cytochem.*, 1977, 25, 466—469.
3. Bignami A., Eng L. F., Dahl D., Uyeda C. T.: Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Res.*, 1972, 43, 429—435.
4. Bissell M. G., Rubinstein L. J., Bignami A., Herman M. M.: Characteristics of the rat C-6 glioma maintained in organ culture system. Production of glial fibrillary acidic protein in the absence of gliofibrillogenesis. *Brain Res.*, 1974, 82, 77—89.
5. Braak E., Drenckhahn D., Unsicher K., Gröschel-Stewart U., Dahl D.: Distribution of myosin and the glial fibrillary acidic protein (GFA protein) in rat spinal cord and in the human frontal cortex as revealed by immunofluorescence microscopy. *Cell Tiss. Res.*, 1978, 191, 493—499.
6. Buckley I. K., Porter K. R.: Cytoplasmic fibrils in living culture cells. *Protoplasma*, 1967, 64, 349—380.
7. Cocchia D., Miani N.: Immunocytochemical localization of the brain-specific S-100 protein in the pituitary gland of adult rat. *J. Neurocytol.*, 1980, 9, 771—782.
8. Dellmann H.-D.: Neurohistologische Untersuchungen über die Verknüpfung von Hypothalamus und Hypophyse. (unter besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse beim Rind). Ein Beitrag zum Problem der Neurosekretion und der hypothalamischen Beeinflussung der Adenohypophyse. *J. Hirnforsch.*, 1962, 5, 249—344.
9. Dellmann H.-D., Sikora K.: Pituicyte fine structure in the developing neural lobe of the rat. *Dev. Neurosci.*, 1981, 4, 89—97.
10. Duffy P. E.: Glial fibrillary acidic protein and induced differentiation of glia *in vitro*. *J. neurol. Sci.*, 1982, 53, 443—460.
11. Eng L. F., Kosek J. C.: Light and electron microscopic localization of the glial fibrillary acidic protein and S-100 protein by immunoenzymatic techniques. *Trans. Amer. Soc. Neurochem.*, 1974, 5, 160.
12. Eng L. F., Rubinstein L. J.: Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J. Histochem. Cytochem.*, 1978, 26, 513—522.
13. Eng L. F., Vanderhaeghen J. J., Bignami A., Gerstl B.: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res.*, 1971, 28, 351—354.
14. Fedoroff S., White R., Neal J., Subrahmanyam L., Kalnins V. I.: Astrocyte

- cell lineage. II. Mouse fibrous astrocytes and reactive astrocytes in cultures have vimentin- and GFAP-containing intermediate filaments. *Dev. Brain. Res.*, 1983, 7, 303—315.
15. Gajkowska B., Zaręba-Kowalska A.: Endoplasmic reticulum reaction in cultured pituicytes in response to hypophyseal stalk transection. *Neuroendocrinol. Lett.*, 1983, 5, 87—92.
 16. Galabov P., Schiebler T. H.: The ultrastructure of the developing neural lobe. *Cell Tiss. Res.*, 1978, 189, 313—329.
 17. Jacque C.: Glial and neuronal immunochemical markers as normal brain maturation. In: *Neurological mutations affecting myelination. INSERM Symposium No 14.* Ed. N. Baumann, Elsevier, North-Holland Biomedical Press, Amsterdam 1980, 305—319.
 18. Ludwin S. K., Kosek J. C., Eng L. F.: The topographical distribution of S-100 and GFA proteins in the adult rat brain. An immunohistochemical study using horseradish peroxidase labelled antibodies. *J. comp. Neurol.*, 1979, 165, 197—208.
 19. Manthorpe M., Adler R., Varon S.: Development, reactivity and GFA immunofluorescence of astroglia-containing monolayer cultures from rat cerebrum. *J. Neurocytol.*, 1979, 8, 605—621.
 20. Nakajima T., Yamaguchi H., Takahashi K.: S-100 protein in folliculostellate cells of the rat pituitary lobe. *Brain Res.*, 1980, 191, 523—531.
 21. Paetau A., Virtanen I., Stenman S., Kurki P., Linder E., Vaheri A., Westermarck B., Dahl D., Haltia M.: Glial fibrillary acidic protein and intermediate filaments in human glioma cells. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1979, 47, 71—74.
 22. Raff M. C., Fields K. L., Hakomori S-L., Mirsky R., Pruss R. M., Winter J.: Cell-type specific markers for distinguishing and studying neurons and the major classes of glial cells in culture. *Brain Res.*, 1979, 174, 283—308.
 23. Salm A. K., Hatton G. I., Nilaver G.: Immunoreactive glial fibrillary acidic protein in pituicytes of the rat neurohypophysis. *Brain Res.*, 1982, 236, 471—476.
 24. Schachner M., Hedley-Whyte E. T., Hsu D. W., Schoemaker G., Bignami A.: Ultrastructural localization of glial fibrillary acidic protein in mouse cerebellum by immunoperoxidase labeling. *J. Cell Biol.*, 1977, 75, 67—73.
 25. Shirasawa N., Kihara H., Yamaguchi S., Yoshimura F.: Pituitary folliculostellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in postnatal, castrated and thyroidectomized rats. *Cells-Tiss. Res.*, 1983, 249, 231—235.
 26. Suess U., Pliška V.: Identification of the pituicytes as astroglial cells by indirect immunofluorescence-staining for the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.*, 1981, 221, 27—33.
 27. Takei Y., Seyama S., Pearl G. S., Tindall G. T.: Ultrastructural study of the human neurohypophysis. II. Cellular elements of neural parenchyma, the pituicytes. *Cell Tiss. Res.*, 1980, 205, 273—287.
 28. Uyeda C. T., Eng L. F., Bignami A.: Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. *Brain Res.*, 1972, 37, 81—89.
 29. Velasco M. E., Roessmann U., Gambetti P.: Immunohistochemical demonstration of glial fibrillary acidic (GFA) protein in human pituitary gland. *J. Neuro-path. exp. Neurol.*, 1979, 38, 347.
 30. Weinrauder H., Kraśnicka Z.: Obraz immunofluorescencyjny hodowli mózdzku poddanej działaniu metylnitrozomocznika. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 241—255.
 31. Weinstein R. S., Kornblith P. L.: Ultrastructure of a cloned astrocytoma in tissue culture. *Cancer*, 1971, 27, 1174—1181.

32. Wittkowski W.: Zur Morphologie der Glia in der Neurohypophyse. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. Eds. A. Oksche, A. Vollrath. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1980, 667—756.
33. Zareba-Kowalska A., Renkawek K., Gajkowska B.: Ultrastructural study of the hypophysial lobe of newborn rats in tissue culture. *Cell Tiss. Res.*, 1983, 230, 463—468.
34. Zareba-Kowalska A., Weinrauder H.: Glial markers in organotypic culture of the hypophyseal neural lobe. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1984, In press.

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

MIROŚLAW J. MOSSAKOWSKI, BARBARA GAJKOWSKA

INFLUENCE OF INDOMETHACIN ON THE ULTRASTRUCTURAL
PATHOLOGY OF THE BRAIN FOLLOWING TEMPORARY ISCHEMIA
IN MONGOLIAN GERBILS (*MERIONES UNGUICULATUS*)

Department of Neuropathology and Laboratory of Electron Microscopy, Medical
Research Centre, Polish Academy of Sciences

It has been repeatedly demonstrated that, cerebral ischemia is followed by an increased content of various classes of prostaglandins in the brain tissue (Ruszczewski 1977; Gaudet, Levine 1979; Gaudet et al. 1980; Iannotti et al. 1981; Moscovitz, Coughlin 1981a; Bhakoo et al. 1982). This led to a supposition, that they may be, at least in part, responsible for the development of postischemic brain tissue alterations. Theoretically, the damaging effect of prostaglandins may result from either their vasoactive function and induction of intravascular thrombocytic aggregations or their destabilizing activity on the cell membranes of the nervous system, regardless unknown exact mechanism(s) of the latter. All elements of the above mentioned pathology were shown to follow cerebral ischemia. The other studies demonstrated the preventive effect of inhibition of the cyclo-oxygenase activity on the development of postischemic events in the brain, which may participate in the nerve tissue lesions (Furlow, Hallenbeck 1978; Moscovitz, Coughlin 1981b; Boulu et al. 1982; Bhakoo et al. 1982; Kägström et al. 1983). In most of the studies this effect was obtained with the use of indomethacin, a well known potent inhibitor of prostaglandin synthesis (Abdel-Halim et al. 1978).

Our previous studies (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1982, 1983), carried out on Mongolian gerbils in which cerebral ischemia was produced by bilateral occlusion of common carotid arteries for 30 min, showed that indomethacin applied before cerebral ischemia prevented neither postischemic venous hyperemia nor the appearance of secondary ischemic foci located in the border-line zones between watersheds of larger cerebral arteries. On the contrary, it obviously prevented the occurrence of small patchy ischemic foci, spread over the most of the brain grey structures in the postischemic period. Tissue lesions in indo-

methacin-treated animals as compared with those in untreated ones, appeared later, were less extensive and solely restricted to posterior hypothalamic, septal and dorso-lateral thalamic regions. The remaining brain structures, including cerebral cortex, white matter and basal ganglia were apparently normal. The aim of the present investigations was an electron microscope evaluation of early tissue lesions and their evolution in animals in which temporary brain ischemia was preceded by indomethacin treatment. The electron microscope examination included both areas of the brain which under light microscope were apparently normal and those which showed severe tissue alterations.

MATERIAL AND METHODS

The experiments were carried out on adult Mongolian gerbils of both sexes, weighing 55—70 g in which under light ether anesthesia both common carotid arteries were ligated for a period of 30 min. In all animals tracheostomy was performed, which was used in case of spontaneous respiration disturbances for artificial ventilation with room air through mechanical respiratory pump (Medipan, Poland). The full surgical procedure was presented previously (Kapuściński, Mossakowski 1983).

The experimental animals were divided into two groups. The first group of animals ($n=9$), 45 min prior to carotid ligation were given intraperitoneally a single injection of indomethacin (Merck-Sharp and Dohme Res. Lab. USA), dissolved in Krebs-Ringer solution in a dose of 10 mg/kg body weight. Indomethacin was prepared immediately before each experiment by dissolving powdered substance in 70% ethanol and then in 5 ml of CO₂-saturated Krebs-Ringer solution. The second group of animals instead of indomethacin were given intraperitoneal injection of the solvent. The animals of both experimental groups were sacrificed on 2, 4 and 6 hr after release of carotid arteries by intracardiac perfusion with 2 percent glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3. Following removal from the skull the brains were washed in the same solution and then cut coronally into slices 1 mm thick. Tissue blocks (1 mm³ in size) were taken from the frontal cortex, Ammon's horn, sub-cortical white matter, thalamus, septal area and posterior hypothalamus. The latter 3 blocks were cut in these regions in which light microscopy revealed tissue damage, resistant to indomethacin action (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1983). Tissue blocks were further postfixed for 1 hr in 2% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, dehydrated routinely in graded ethanol solutions and embedded in Epon 812. Ultrathin sections, cut on ultramicrotome, were counterstained on grids with uranyl acetate and lead citrate. The material was studied under the Jeol electron microscope JEM 7 A.

In order to visualize the blood vessels content in the examined material part of animals (3 in each experimental group) were sacrificed by decapitation. Fresh tissue blocks taken from the brain regions mentioned above, were fixed by immersion in 0.1 M glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.3 and then processed routinely to embedding in Epon 812.

Additional control groups of animals were used for assessment of possible direct influence of indomethacin and surgical procedure. Four animals with no surgery were given identical dose of indomethacin and then sacrificed in pairs after 2 and 6 h. In 4 others 45 min after indomethacin injection, sham-operation, consisting in bilateral isolation of common carotid arteries, was performed. Animals were sacrificed 2 and 6 h after operation. The last control group consisted of 4 gerbils in which sham operation was not preceded by indomethacin administration. The material from all control groups was processed in the same manner as that in experimental ones.

RESULTS

The electron microscope tissue lesions were found in both experimental groups, although they differed remarkably in the intensity and topographic distribution.

In animals, in which bilateral carotid artery ligation was not preceded by indomethacin administration, contrary to the previous light microscopic observations, grey structure alterations were present in all examined areas of the brain already in the earliest stages of the study. At the beginning they consisted in severe swelling of astrocytic cytoplasm involving both perikarya and cellular processes. In all areas of the brain, numerous astrocytes with remarkably swollen cytoplasm, either totally deprived of subcellular organellae or showing their abnormal aggregation were present (Fig. 1). Swollen mitochondria with peripherally displaced cristae, widened channels and cisterns of rough endoplasmic reticulum with reduced number of ribosomes and numerous dense bodies were seen amongst preserved cytoplasmic organellae. The same concerned astrocytic processes, either surrounding capillaries or lying free in the neuropil. Most of the other structural elements of neuropil were normal. In most instances the capillary walls were unchanged, only some of them revealing swelling of endothelial cells (Fig. 2). At that period of observation neuronal perikarya were either normal or showed ultrastructural alterations of minor intensity. They consisted in some mitochondrial swelling and dilatation of channels of rough endoplasmic reticulum (Fig. 2). Typical ischemic dark neurons, with electron dense hyaloplasm, severely distended channels of rough endoplasmic reticulum, and remarkably swollen mitochondria were rare. As a rule, they were accompanied by swollen glial satellite cells (Fig. 3).

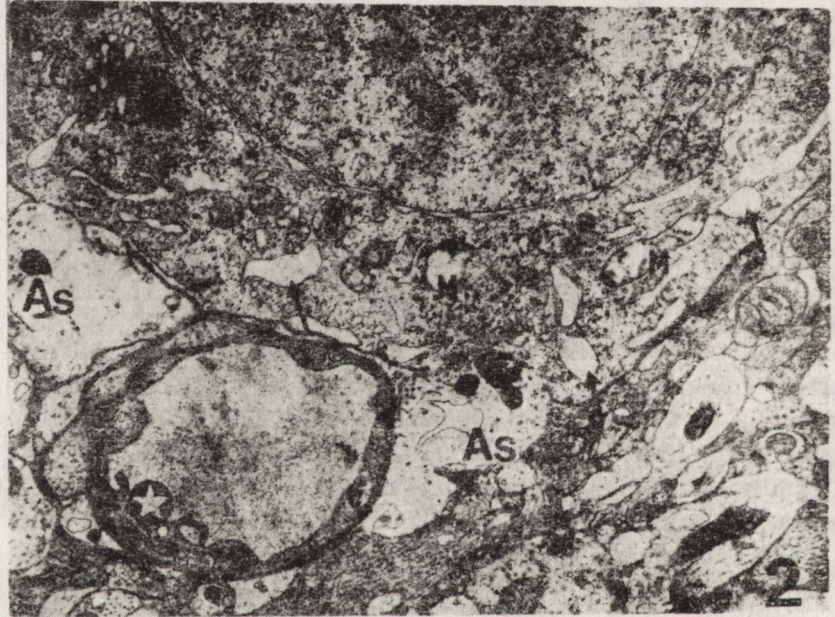
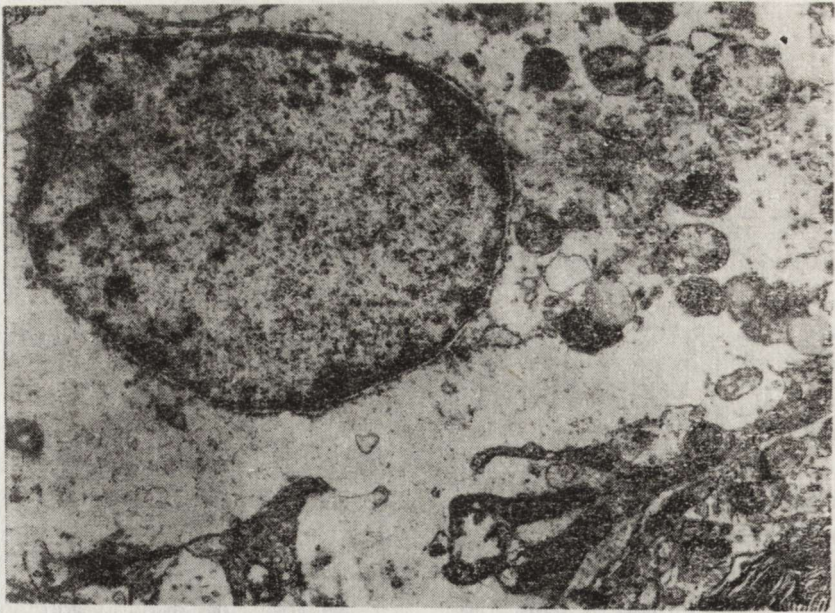


Fig. 1. Ischemia, 2 h survival. Hypothalamus. Fragment of astrocyte with remarkably swollen cytoplasm and reduced number of abnormal organelles grouped in perinuclear area. $\times 12\ 700$

Ryc. 1. Niedokrwienie, 2 godz. przeżycia. Podwzgórze. Fragment obrzmiałej komórki gwiaździstej ze skąpą ilością zmienionych organelli cytoplazmatycznych zgrupowanych w okolicy przyjądrowej. Pow. $12\ 700 \times$

Fig. 2. Ischemia, 2 h survival. Cerebral cortex. In the fragment of neuron (N) some mitochondria (M) are swollen and channels of rough endoplasmic reticulum dilated (arrows). Note swollen astrocytic processes (As) and endothelial cells (asterisk). $\times 6\ 000$

Ryc. 2. Niedokrwienie, 2 godz. przeżycia. Kora mózgowa. We fragmencie komórki nerwowej (N) widoczne są obrzmiałe mitochondria (M) i poszerzone kanały szorstkiej siatki śródplazmatycznej (strzałki). Zwraca uwagę obrzmienie wypustek astrocytów (As) i komórek śródbłonna (gwiazdka). Pow. $6\ 000 \times$

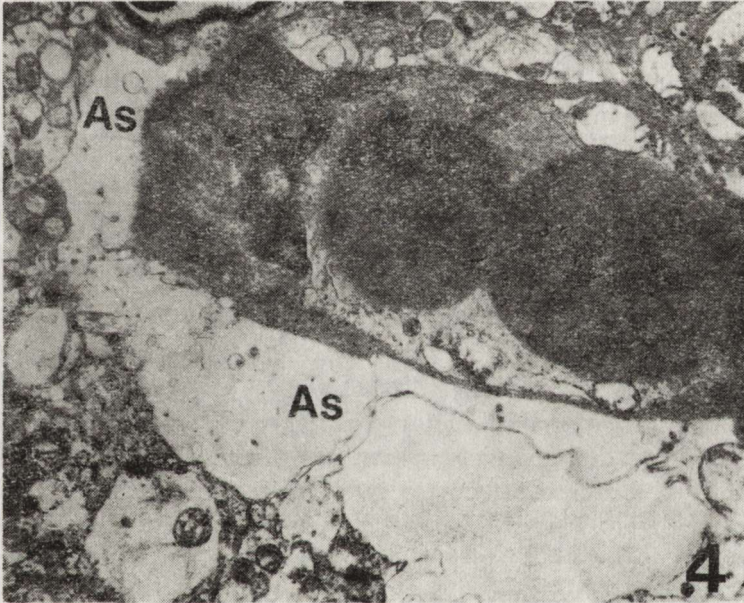
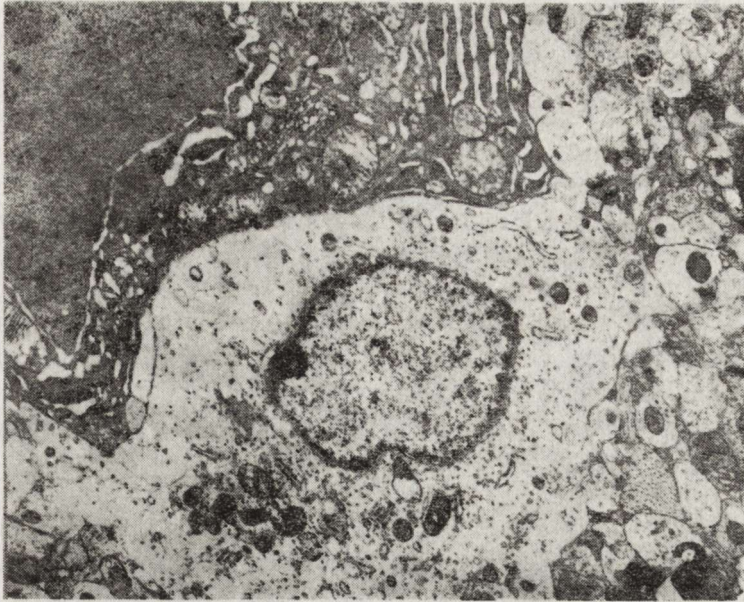


Fig. 3. Ischemia, 2 h survival. Cerebral cortex. Fragment of a typical ischemic dark neuron and swollen satellite glial cell with irregular aggregation of cytoplasmic organelles. $\times 5\,700$

Ryc. 3. Niedokrwienie, 2 godz. przeżycia. Kora mózgu. Widoczny fragment typowego ciemnego neuronu i obrzmiałej satelitarnej komórki glejowej z nieregularnymi skupieniami organelli cytoplazmatycznych. Pow. 5 700 \times

Fig. 4. Ischemia, 4 h survival. Cerebral cortex. Note extensively swollen perivascular astrocytic processes (As), totally deprived of cytoplasmic organelles. $\times 14\,200$

Ryc. 4. Niedokrwienie, 4 h godz. przeżycia. Kora mózgu. Bardzo znacznie obrzmiałe okołonaczyniowe wypustki astrocytów (As), całkowicie pozbawione struktur cytoplazmatycznych. Pow. 14 200 \times

Pathological changes intensified and become more widespread in the later period of observation, that is 4 h following the release of carotid arteries ligation. They were most severe in hypothalamic, septal and thalamic areas. Astrocytic processes surrounding capillaries were distended in a balloon-like fashion and their cytoplasm was totally deprived of any subcellular organelles (Figs 4, 5). The same concerned oligodendrocytes. Ultrastructural abnormalities involved neuropil elements such as axons, dendrites and synapses. Most of them were swollen, contained damaged mitochondria and widened cisterns and channels of either smooth or rough endoplasmic reticulum (Fig. 5). In most of the presynaptic bags, vesicles were abnormally dispersed. Great proportion of neurons showed severe ischemic alterations with cytoplasmic disintegration of varying intensity. On the 6th h after carotid ligation release, the above described changes were more intensive, evolving to full tissue necrosis (Fig. 6).

The white matter structures were also involved, starting from the earliest period of observation. Similarly as in the grey structures, pathological changes consisted in remarkable cytoplasmic swelling of both oligodendrocytes and astrocytes (Fig. 7). Perivascular astrocytic processes were most severely damaged. The membrane structures of numerous of them were entirely disrupted, leading to the situation, that capillaries with either swollen or normal endothelial cells were lying in empty spaces, containing some cellular residua (Fig. 8). Myelin sheaths were generally unchanged, while axons contained swollen mitochondria and vesicular structures originating probably from channels of smooth endoplasmic reticulum (Fig. 7). Neither intravascular clotting nor thrombocyte aggregations were found at any observation period.

Electron microscopy in indomethacin-treated animals showed an evident time-dependence and varied remarkably in different brain structures. In sections taken from the previously mentioned areas of hypothalamus, septum and dorso-lateral thalami the ultrastructural picture and its evolution did not differ essentially from those in untreated animals. There was severe astrocytic swelling, most intense around capillary walls, which were in many instances lined by greatly swollen endothelial cells (Fig. 9). The above changes intensified in time, involving other structures of neuropil (Fig. 10). Most of the neurons revealed typical ischemic alterations. Even those with less intensive lesions were surrounded by greatly swollen astrocytic processes and damaged nerve cell extensions and their endings (Fig. 11). Contrary to that, in the cerebral cortex and in Ammon's horn no ultrastructural abnormalities were seen in the earliest period of examination, that is 2 h following carotid release. In particular there was no astrocytic swelling both in the capillary surrounding and in the neuropil remote from the blood vessels (Fig. 12). Nerve cells were ultrastructurally normal. The same was

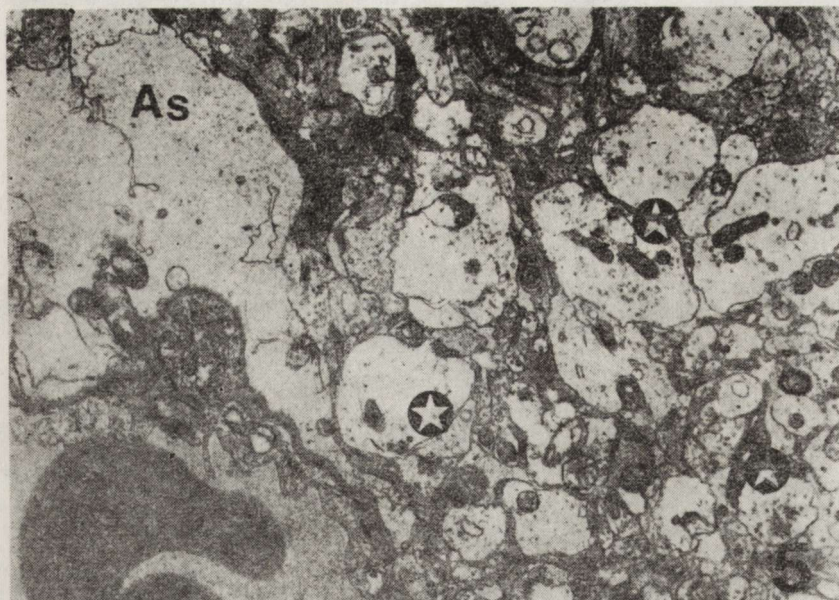


Fig. 5. Ischemia, 4 h survival. Ammon's horn. Swollen astrocytic processes (As) with reduced number of cytoplasmic organelles and swollen mitochondria. In neuropil adjacent to the blood vessels synapses (asterisks) with swollen axoplasm, irregularly distributed vesicles and small, shrunken mitochondria are seen. $\times 8\ 500$

Ryc. 5. Niedokrwienie, 4 godz. przeżycia. Róg Amona. Widoczne okołonaczyniowe wypustki astrocytów (As) są obrzmiałe i zawierają nieliczne struktury śródplazmatyczne. Zwraca uwagę obrzmienie aksoplazmy zakończeń synaptycznych (gwiazdki) z nierównomiernym rozkładem pęcherzyków i obecnością drobnych, obkurczonych mitochondriów. Pow. 8 500 \times

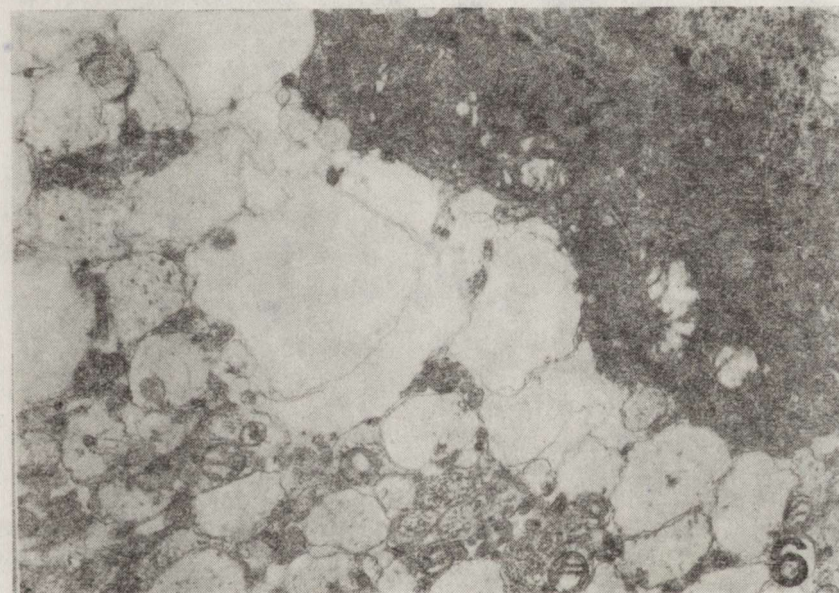


Fig. 6. Ischemia, 6 h survival. Hypothalamus. Fragment of neuron and neuropil elements exhibit severe ultrastructural abnormalities indicating their complete disintegration. $\times 12\ 700$

Ryc. 6. Niedokrwienie, 6 godz. przeżycia. Podwzgórze. Fragment komórki nerwowej i elementy neuropilu wykazują ciężkie uszkodzenia ultrastrukturalne wskazujące na ich dezintegrację. Pow. 12 700 \times

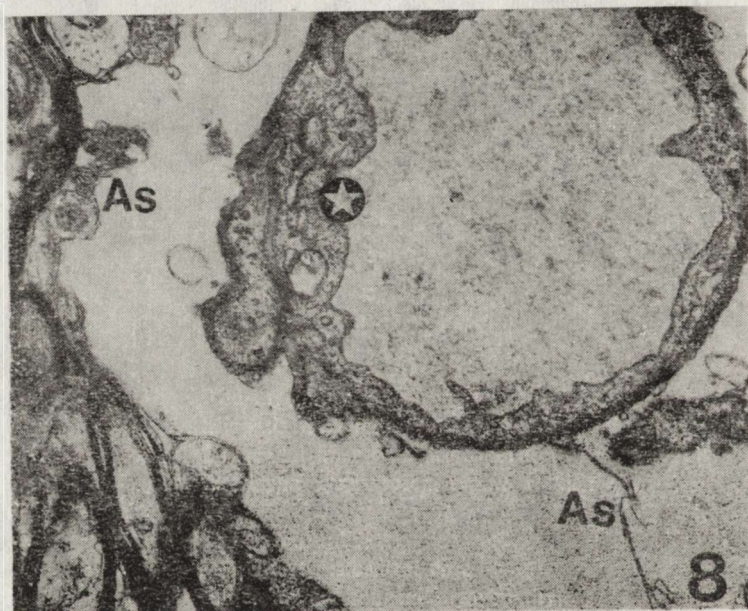
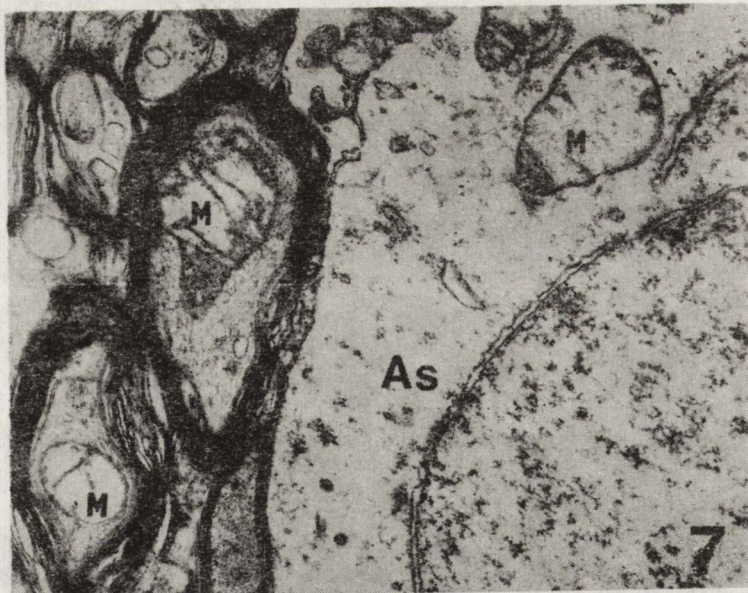


Fig. 7. Ischemia, 4 h survival. Subcortical white matter. Fragment of severely swollen astrocyte (As). Neighbouring nerve fibers with unchanged myelin sheaths reveal swollen mitochondria (M) and small vesicular structures in the axoplasm. $\times 12\ 700$

Ryc. 7. Niedokrwienie, 4 godz. przeżycia. Podkorowa istota biała. Widoczny fragment znacznie obrzmiałego astrocyta (As). Położone w sąsiedztwie aksony, z nieuszkodzonymi osłonkami mielinowymi zawierają w aksoplazmie obrzmiałe mitochondria (M) i drobne struktury pęcherzykowate. Pow. 12 700 \times

Fig. 8. Ischemia, 6 h survival. Subcortical white matter. Severely swollen perivascular astrocytic processes (As), almost totally deprived of cytoplasmic organelles with disrupted cellular membranes. Note swelling of the capillary endothelial cells (asterisk). $\times 12\ 700$

Ryc. 8. Niedokrwienie, 6 godz. przeżycia. Podkorowa istota biała. Znacznie obrzmiałe okołonaczyniowe wypustki astrocytów (As), niemal całkowicie pozbawione struktur cytoplazmatycznych z uszkodzonymi błonami komórkowymi. Zwraca uwagę obrzmienie komórek śródbłonna naczyniowego (gwiazdka). Pow. 12 700 \times

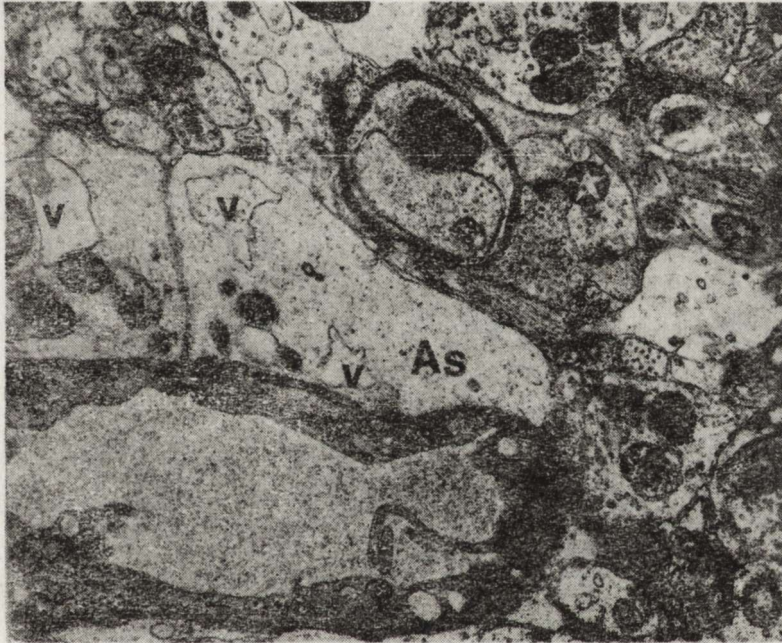
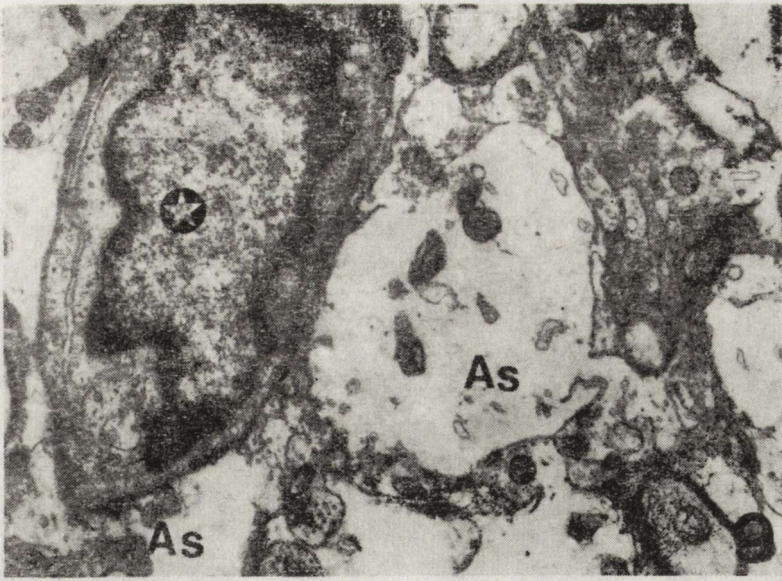


Fig. 9. Ischemia with indomethacin, 6 h survival. Thalamus. Remarkably swollen perivascular astrocytic processes (As) with reduced number of cytoplasmic organelles. Swollen endothelial cells (asterisk) narrowing the capillary lumen. $\times 7400$

Ryc. 9. Niedokrwienie z indometacyną, 6 godz. przeżycia. Wzgórze. Bardzo znaczne obrzmienie okołonaczyniowych wypustek astrocytów (As) zawierających szczątkowe struktury cytoplazmatyczne. Widoczne jest obrzmienie komórek śródbłonna (gwiazdka) zwązające światło naczynia. Pow. 7400 \times

Fig. 10. Ischemia with indomethacin, 6 h survival. Thalamus. Note few shrunken mitochondria and vacuoles (v) in slightly swollen perivascular astrocytic processes (As) and varying in number vesicles in synaptic buttons (asterisks) $\times 9000$

Ryc. 10. Niedokrwienie z indometacyną, 6 godz. przeżycia. Wzgórze. Zwracają uwagę skąpe obkurczone mitochondria i wakuole (v) w cytoplazmie lekko obrzmiałych okołonaczyniowych wypustek astrocytów (As) i zmienna ilość pęcherzyków w zakończeniach synaptycznych (gwiazdki). Pow. 9000 \times

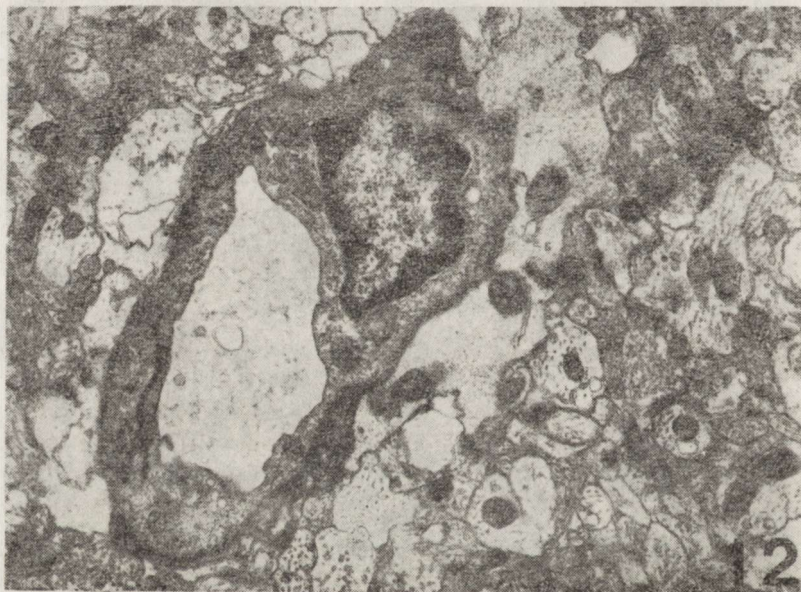
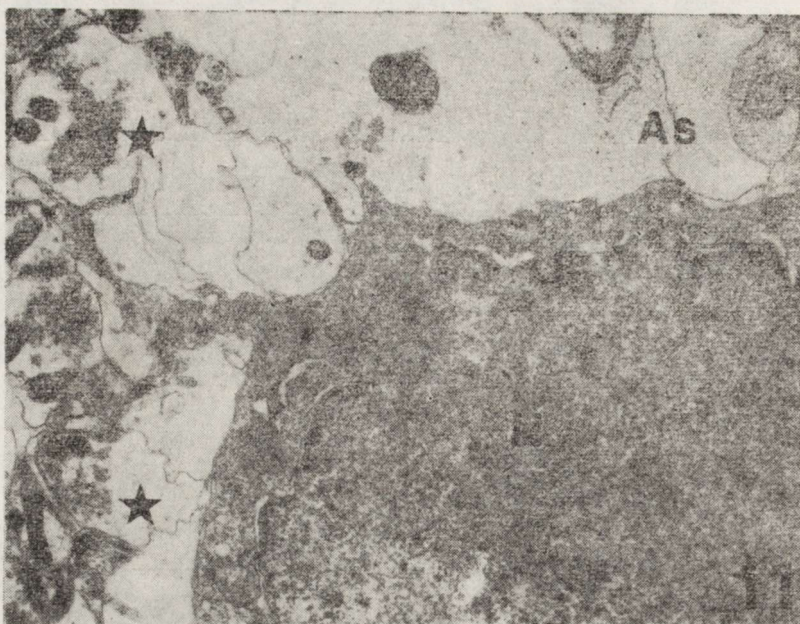


Fig. 11. Ischemia with indomethacin, 6 h survival. Hypothalamus. Fragment of ischemic neuron (N). Synaptic endings (asterisks) exhibit swollen axoplasm with great number of vesicles. Note greatly swollen astrocytic processes (As) with reduced number of cytoplasmic organelles. $\times 12\ 700$

Ryc. 11. Niedokrwienie z indometacyną, 6 godz. przeżycia. Podwzgórze. Fragment neuronu (N) z typowymi cechami uszkodzenia niedokrwiennego. Zakończenia synaptyczne (gwiazdki) o obrzmiałej cytoplazmie zawierają znaczną ilość pęcherzyków; skupionych w nieregularnych ugrupowaniach. Obrzmiałe wypustki astrocytów (As) pozbawione struktur cytoplazmatycznych. Pow. 12 700 \times

Fig. 12. Ischemia with indomethacin, 2 h survival. Cerebral cortex. Note only slight swelling of some astrocytic processes around unchanged blood vessels. $\times 12\ 700$

Ryc. 12. Niedokrwienie z indometacyną, 2 godz. przeżycia. Kora mózgu. Wokół naczynia o prawidłowej strukturze widoczne są tylko pojedyncze wypustki astrocytów z nieznacznym obrzmieniem. Pow. 12 700 \times

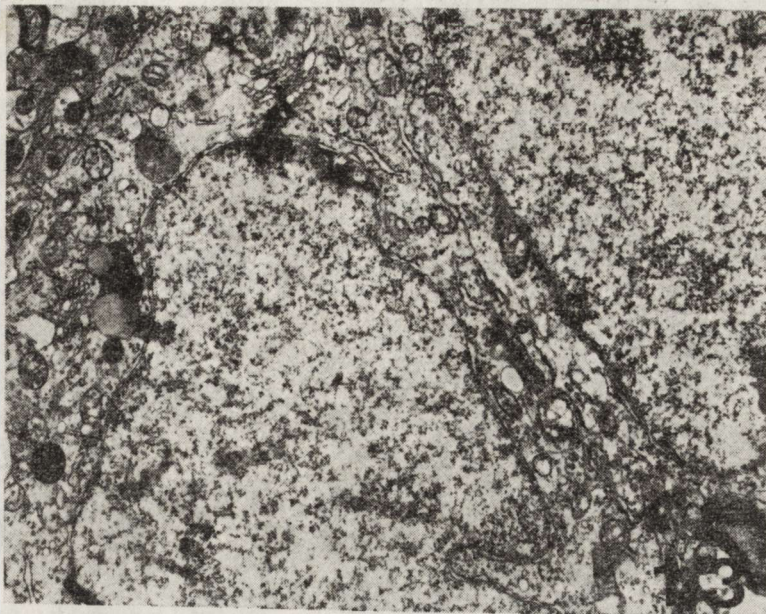


Fig. 13. Ischemia with indomethacin, 4 h survival. Ammon's horn. Fragments of two unchanged pyramidal neurons. $\times 8\ 500$

Ryc. 13. Niedokrwienie z indometacyną, 4 godz. przeżycia. Widoczne fragmenty dwóch niezmiennych piramidowych komórek nerwowych. Pow. 8 500 \times

Fig. 14. Ischemia with indomethacin, 6 h survival. Cerebral cortex. In a fragment of apparently normal neuron, some swollen mitochondria (M), dilated Golgi profiles and channels of rough endoplasmic reticulum are visible (arrows). $\times 6\ 400$

Ryc. 14. Niedokrwienie z indometacyną, 6 godz. przeżycia. Kora mózgu. We fragmencie składają niezmienną komórkę nerwową widoczne są pojedyncze obrzmiałe mitochondria (M) oraz poszerzone kanały siatki śródplazmatycznej i zbiorniki aparatu Golgiego (strzałki). Pow. 6 400 \times

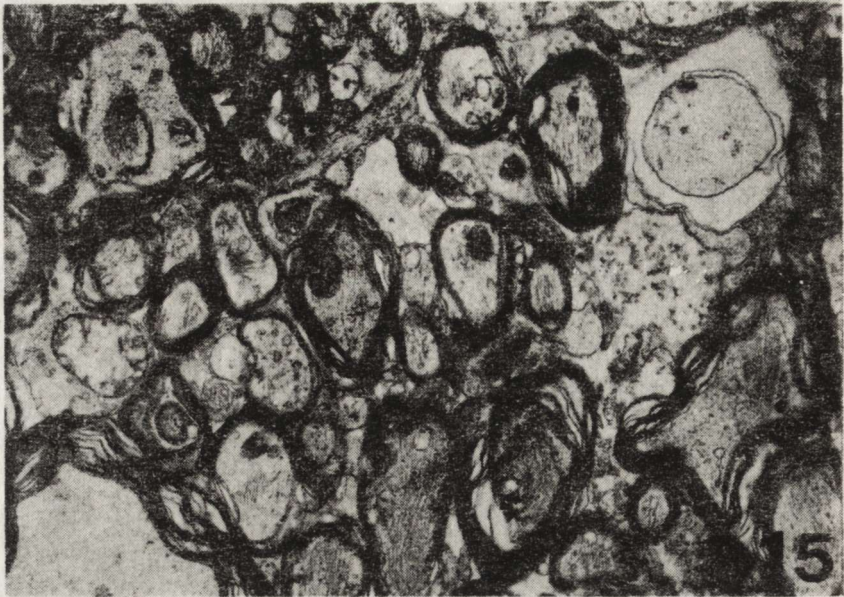


Fig. 15. Ischemia with indomethacin, 4 h survival. Subcortical white matter. Apparently normal ultrastructure of most of the axons, myelin sheaths and glial processes. $\times 12\ 700$

Ryc. 15. Niedokrwienie z indometacyną, 4 godz. przeżycia. Podkorowa istota biała. Prawidłowy obraz mikroskopowo-elektronowy większości włókien osiowych, osłonek mielinowych i wypustek glejowych. Pow. $12\ 700 \times$



Fig. 16. Ischemia with indomethacin, 6 h survival. Thalamus. Neuron with features of nucleolar microsegregation. Note partial segregation of filamentous (arrows) and granular (asterisks) parts of nucleolus. $\times 12\ 700$

Ryc. 16. Niedokrwienie z indometacyną, 6 godz. przeżycia. Wzgórze. Neuron z cechami mikrosegregacji jąderka. Zwraca uwagę częściowy rozdziel włókienkowej (strzałki) i ziarnistej (gwiazdki) części jąderka. Pow. $12\ 700 \times$

observed after 4 h of recovery (Fig. 13). However, on the 6th h of the postischemic period some ultrastructural abnormalities appeared in the cerebral cortex. They consisted in a slight perivascular astrocytic swelling, dilatation of cisterns and channels of endoplasmic reticulum and Golgi system and mitochondrial swelling in some nerve cells (Fig. 14). On the contrary, the white matter structures were apparently normal in all observation stages (Fig. 15).

In all experimental and control animals treated with indomethacin, great number of neurons and glial cells revealed nucleolar abnormalities taking the form of microsegregation and accumulation of perichromatin granules (Fig. 16). Except that, no other ultrastructural pathological changes were found in the control groups throughout.

DISCUSSION

In general, the present electron microscope study confirmed our previous light microscopic observation, concerning influence of cyclo-oxygenase inhibition by indomethacin on the tissue sequela of temporary brain ischemia. Indomethacin administered 45 min before carotid arteries ligation for 30 min did not prevent the appearance or influenced further evolution of focal tissue lesions localized in posterior hypothalamic and septal regions as well as in dorso-lateral thalamic nuclei. Pathological changes in these brain regions in indomethacin-treated animals did not differ essentially from those in untreated ones. In the course of 6 h observation they evolved to full tissue necrosis, the subsequent stages of which were similar to those described by Brierley et al. (1973), Garcia et al. (1978) and Jenkins et al. (1979). The only slight difference between the treated and untreated animals consisted in less intense astrocytic swelling in the former ones. Our previous supposition, concerning the possible appearance of thrombocyte aggregations in the blood vessels on the necrosis periphery was not confirmed. The aggregations were totally absent from both treated and untreated animals. This agrees well with previous observations of Hossmann et al. (1980).

In the selectively damaged brain areas, in the previous studies on the influence of indomethacin on the cerebral microcirculation following brain ischemia, focal ischemic foci were found in the recovery period both in untreated and treated animals (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1982). Although the exact brain angioarchitectonics in Mongolian gerbils is not known, a detailed inspection of the material presented by Levy and Brierley (1974) and Tamura et al. (1981) allows to consider the above mentioned regions as the borderline zones between watersheds of larger branches of the internal carotid arteries and the carotid and vertebral-basilar systems. Since the classical work of Zülch (1955), the

vascular borderline zones are known to be the areas of severe hemodynamic disturbances, depending on the systemic hemodynamics. The presence of the latter in the Mongolian gerbils after both uni- and bilateral carotid artery ligation was clearly shown by Ito et al. (1975) and Kapaściński and Mossakowski (1983).

Indomethacin pretreatment markedly influenced the electron microscope picture of the remaining brain structures. In untreated animals ultrastructural tissue pathology, the same as in the above described areas, was present in such brain structures as neocortex, Ammon's horn and subcortical white matter. The most striking abnormality consisted in glial swelling, involving mostly astrocytic perikarya and perivascular processes, and ischemic lesions of neurons including their extensions and synaptic endings. In indomethacin-treated animals pathological changes of this nature were not present at all or they appeared in much less intense form solely on the 6th hour of postischemic period.

The mechanism of the preventive action of indomethacin remains open. As an inhibitor of cyclo-oxygenase activity it remarkably reduces the synthesis of endogenous prostaglandins in the brain. Abdel-Halim et al. (1978) showed that single application of indomethacin in a dose of 3 mg/kg b.w. decreases cerebral synthesis of prostaglandins to 20 percent for a period of 8 h. This led to the supposition of its protective effect against the action of vasoactive prostaglandins, accumulation of which in the brain after ischemia of different type and duration was found by Ruszczewski (1977), Gaudet et al. (1979, 1980), Iannotti et al. (1981), Moscovitz, Coughlin (1981a) and Bhakoo et al. (1982). Improvement of the cerebral blood flow after ischemia, resulting from indomethacin pretreatment was described by Furlow and Hallenbeck (1978), Moscovitz and Coughlin (1981b), Boulu et al. (1982) and Kägström et al. (1983). However, Hallenbeck and Furlow (1979) and Hallenbeck et al. (1982) demonstrated the positive effect of the drug only when indomethacin was applied in combination with prostacycline PGI_2 and heparin. On the other hand, Harris et al. (1982) noticed even a harmful effect of indomethacin on the ischemic brain. Our own observations on the influence of the drug on the postischemic cerebral microcirculation indicated its partial efficacy, consisting in prevention of patchy secondary ischemic foci, spread over most of the grey brain structures with no effect on postischemic venous hyperemia and focal secondary ischemia in vascular borderline zones (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1982).

Even more controversial are the results concerning the influence of indomethacin on the blood flow in undamaged brain. Most of the authors have demonstrated that indomethacin administration results in reduction of the cerebral blood flow and decrease of vascular reactivity, to the increased CO_2 level (Pickard, MacKenzie 1973; Pickard et al. 1977; Hedquist 1977; Bill 1979; Sakabe, Siesjö 1979; Dahlgren et al. 1981).

On the contrary Busija and Heistadt (1983) found that indomethacin influenced neither cerebral blood flow nor vascular reactivity to hypercapnia. According to Hierton's observation (1981) indomethacin does not reduce cortical blood flow, but diminishes it in the brain stem structures and cerebellum. Similar regional differences were observed by Pickard et al. (1976) and Vlachov (1976), who stated that indomethacin at the same time reduced the total cerebral blood flow but dilates pial vessels.

In the light of the above presented data and the results of own electron microscope observations, the solely vasogenic mechanism of the protective action of indomethacin seems questionable. Its cytoprotective action, preventing alterations of cellular membrane permeability and their metabolic consequences, is more probable. The fact that early ultrastructural pathology of the ischemic brain is dominated by severe astrocytic swelling, which is lacking in indomethacin-treated animals, appears to support such a view. This concept was also brought up by Crockard et al. (1980), Iannotti et al. (1981), Bhakoo et al. (1982) who related the preventive effect of indomethacin on postischemic brain edema to its cytoprotective action. Ischemic brain edema, at least in its early stages, is of cytotoxic nature, resulting from altered permeability of cellular membranes (Klatzo 1975). Astrocytic swelling is one of its fundamental ultrastructural evidences. As swollen astrocytic processes are known to compress cerebral capillaries, it seems possible that the preventive influence of indomethacin on the disturbances of regional cerebral flow can also be connected with its effect on membrane permeability. This would also explain lack of patchy ischemic foci spread over grey structures of the brain in indomethacin-treated animals.

The molecular mechanism of cytoprotective action of indomethacin is unknown. Perhaps it can be related to its inhibitory influence on the activity of phospholipase A₂ (Jesse, Franson 1979). Volpi et al. (1980) demonstrated that indomethacin reduced the permeability of the cellular plasma membrane for calcium. Its antagonistic action to calcium ions was also shown by Northover (1977). Pappius and Wolf (1977) although denying the influence of indomethacin on the vasogenic brain edema, demonstrated its protective effect on numerous metabolic parameters in the brain damaged by various factors.

Two other questions concerning indomethacin action require short discussion. The first is its time-dependence shown in our electron microscope study. Preventive effect of indomethacin against generalized astrocytic swelling and ischemic damage to the nerve cells was clearly shown to occur during the early stages of postischemic period. It was obviously less at the 6th h of recovery period, as shown by the appearance of slight perivascular astrocytic swelling and some features of nerve cells injury. It seems plausible to connect this with the relatively short half-

-life of the drug. In our previous study, when keeping ischemic animals for longer survival periods, indomethacin was administered every subsequent 6 h.

The second question concerns the presence of a rather unexpected finding in the brains of indomethacin-treated animals. In all of them ultrastructural features of nucleolar microsegregation were seen in both nerve and glial cells. This may indicate a noxious side-effect of the drug on nuclear RNA metabolism. This problem, forms subject of an accompanying paper (Gajkowska et al. 1984).

WPLYW INDOMETACYNY NA OBRAZ ULTRASTRUKTURALNY WCZESNYCH NIEDOKRWIENNYCH USZKODZEŃ MÓZGU U CHOMIKA MONGOLSKIEGO (*Meriones unguiculatus*)

Streszczenie

Oceniono obraz mikroskopowo-elektronowy mózgu chomików mongolskich, u których 30-minutowe obustronne podwiązanie tętnic szyjnych poprzedzono dootrzewnowym podaniem indometacyny w dawce 10 mg/1 kg masy ciała. Wyniki porównano z materiałem zwierząt, u których w tych samych warunkach doświadczalnych nie stosowano indometacyny.

Stwierdzono, że indometacyna pozostawała bez wpływu na pojawienie się i rozwój ognisk uszkodzeń tkankowych w obszarach pogranicza unaczynienia przez duże pnie pochodzące od tętnic szyjnych wewnętrznych oraz pogranicza między układem szyjno-wewnętrznym i kręgowo-podstawnym. Były to ogniska w okolicy tylnego podwzgórza, przegrody i grzbietowo-bocznych jąder wzgórza. Występujące tu zmiany w okresie 6 godzin obserwacji ewoluowały do stadium martwicy tkanki zarówno u zwierząt leczonych, jak i nie leczonych. Podanie indometacyny zapobiegało natomiast uogólnionym uszkodzeniom tkanki występującym w korze mózgu, jądrach podstawy oraz w podkorowej istocie białej. W szczególności chroniło ono przed pojawieniem się tu obrzmienia astrocytów oraz niedokrwiennych zmian komórek nerwowych, nawet w obszarach charakteryzujących się wybiórczą wrażliwością neuronów na niedostatek tlenu. Osłaniające działanie indometacyny wiązano z jej wpływem cytoprotekcyjnym. U wszystkich zwierząt, którym podawano indometacynę stwierdzono nieprawidłowości w strukturze jąderka, występujące zarówno w komórkach nerwowych, jak i glejowych, w postaci mikrosegregacji i pojawienia się w nadmiarze ziaren interchromatynowych. Zmiany tego typu uznane są za morfologiczny wykładnik zaburzeń w syntezie i/lub transporcie kwasów nukleinowych. Biochemiczne potwierdzenie tego faktu ograniczy niewątpliwie ze względu na następstwa metaboliczne użyteczność indometacyny jako środka ograniczającego skutki tkankowe niedokrwienia mózgu.

ВЛИЯНИЕ ИНДОМЕТАЦИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРНУЮ КАРТИНУ РАННИХ ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ МОЗГА МОНГОЛЬСКОГО ХОМЯКА (*MERIONES UNGUICULATUS*)

Резюме

Оценивалась электронно-микроскопическая картина мозга монгольских хомяков, у которых внутрибрюшинное введение индометацина в дозе 10 мг/кг веса тела, предшествовало двусторонней перевязке шейных артерий. Результаты сравнивались с материалом животных, у которых в таких же экспериментальных условиях не применялся индометацин.

Было обнаружено, что индометацин не влиял на появление и развитие очагов тканевых повреждений в пограничных областях больших сосудов, происходящих от внутренних шейных артерий, а также на границе между внутришейной и позвоночно-базальной системами. Это были очаги в области заднего гипоталамуса, перегородки и спинно-боковых ядер зрительного бугра. Изменения, наблюдаемые в течение 6 часов наблюдений, развивались до стадии некроза ткани, как у лечимых, так и у нелечимых животных. Однако, введение индометацина предотвращало общее повреждение ткани, выступающее в мозговой коре, базальных ядрах и подкорковом белом веществе. В частности, оно предохраняло от появления отека астроцитов и ишемических изменений нервных клеток, даже в областях характеризующихся избирательной чувствительностью нейронов к недостатку кислорода. Охраняющее действие индометацина объясняется его цитопротекционным влиянием. У всех животных, которым вводился индометацин были обнаружены нарушения в структуре ядрышка, выступающие как в нервных, так и глиальных клетках, в виде микросегрегации и появления в избытке интерхроматиновых зерен. Нарушения этого типа рассматриваются как морфологический показатель нарушений в синтезе и/или транспорте нуклеиновых кислот. Биохимическое подтверждение этого факта, ввиду метаболических последствий, несомненно ограничит пригодность индометацина как средства, ограничивающего тканевые последствия ишемии мозга.

REFERENCES

1. Abdel-Halim M. S., Sjöquist B., Ånggård E.: Inhibition of prostaglandin biosynthesis in rat brain. *Pharmacol. Toxicol.*, 1978, 43, 266—272.
2. Bhakoo K. K., Lascelles P. T., Crockard H. A., Avery S. F.: Brain prostaglandins and cerebral edema following temporary vascular occlusion in gerbils. V Intern. Conf. Prostaglandins, Florence, May 18—21, 1982. Abstracts, p. 706.
3. Bill A.: Effects of indomethacin on regional blood flow in conscious rabbits — a microsphere study. *Acta Physiol. Scand.*, 1979, 105, 437—442.
4. Boulu R. G., Plotkin M., Guenian C., Sofeir M., Wiernsperger N.: Effect of indomethacin in experimental cerebral ischemia. *Pathol. Biol.*, 1982, 30, 278—281.
5. Brierley B., Mildrum B. S., Brown A. W.: The threshold and neuropathology of cerebral anoxic-ischemic cell change. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 367—373.
6. Busija D. W., Heistadt D. D.: Effects of indomethacin on cerebral blood flow during hypercapnia in cats. *Am. J. Physiol.*, 1983, 244, 519—524.
7. Crockard H. A., Iannotti F., Hunstock A. H., Smith R. D., Harris R. J., Symon L.: Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in gerbil. *Stroke*, 1980, 11, 494—498.
8. Dahlgren N., Nilsson B., Sakabe T., Siesjö B. K.: The effect of indomethacin on cerebral blood flow and oxygen consumption in the rat at normal and increased carbon dioxide tension. *Acta Physiol. Scand.*, 1981, 111, 475—485.
9. Furlow T. W. Jr., Hallenbeck J. M.: Indomethacin prevents impaired perfusion of the dog brain after global ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 591—594.
10. Gajkowska B., Mossakowski M. J., Zareba-Kowalska A.: Action of indomethacin on nucleolar fine structure. Preliminary report. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 367—377.
11. 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.
12. Gaudet R. J., Alam I., Levine L.: Accumulation of cyclooxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 653—658.

13. Gaudet R. J., Levine L.: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 86, 393—401.
14. Hallenbeck J. M., Furlow T. W. Jr.: Prostaglandin I₂ and indomethacin prevent impairment of postischemic brain reperfusion in the dog. *Stroke*, 1979, 10, 629—637.
15. Hallenbeck J. M., Leitch D. R., Dutka A. J., Greenbaum L. J., McKee A. E.: Prostaglandin I₂, indomethacin and heparin promote postischemic neuronal recovery in dogs. *Ann. Neurol.*, 1980, 12, 145—156.
16. Harris R. J., Bayhan M., Brandston N. M., Watson A., Symon L.: Modulation of pathophysiology of primate focal cerebral ischemia by indomethacin. *Stroke*, 1982, 13, 17—24.
17. Hedquist P.: Base metabolism of prostaglandin action on autonomic neurotransmission. *Ann. Rev. Pharmac. Toxic.*, 1977, 17, 259—279.
18. Hierton C.: Effects of indomethacin, Naproxen and Paracetamol on regional blood flow in rabbits. A microsphere study. *Acta Pharmac. Toxic.*, 1981, 49, 327—333.
19. Hossmann V., Hossmann K-A., Takagi S.: Effect of intravascular platelet aggregation on blood recirculation following prolonged ischemia of the cat. *Brain*, 1980, 222, 159—170.
20. Iannotti F., Crockard A., Ladds G., Symon L.: Are prostaglandins involved in experimental cerebral ischemia in gerbils? *Stroke*, 1981, 12, 301—306.
21. Ito U., Spatz M., Walker J. T. Jr., Klatzo I.: Experimental cerebral ischemia in Mongolian gerbils. I. Light microscopic observations. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1975, 32, 209—223.
22. Jenkins L. W., Povlishock J. T., Becher D. P., Müller J. D., Sulivang H. G.: Complete cerebral ischemia. An ultrastructural study. *Acta Neuropath. (Berl.)*, 1979, 48, 113—125.
23. Jesse R. L., Franson R. C.: Modulation of purified phospholipase A₂ activity from human platelets by calcium and indomethacin. *Biochem. Biophys. Acta*, 1979, 375, 467—470.
24. Kapuściński A., Mossakowski M. J.: Pathophysiological and morphological observations after 30 min bilateral occlusion of the common carotid artery in gerbils. In: *Stroke — animals models. Advances in Biosciences*. 43. Ed. K. Stefanovič. Pergamon Press. London 1983, 63—82.
25. Kägström E., Smith M. L., Wallstedt L., Siesjö B. K.: Cyclo-oxygenase inhibition by indomethacin and recirculation following cerebral ischemia. *Acta physiol. Scand.*, 1983, 118, 193—201.
26. Klatzo I.: Pathophysiological aspects of cerebral ischemia. In: *The nervous system — the basic neuroscience*. Ed. D. B. Tower. Raven Press, New York 1975, 313—322.
27. Levy D. E., Brierley J. B.: Communications between vertebral-basilar and carotid artery circulations in the gerbil. *Exper. Neurol.*, 1974, 45, 503—508.
28. Moscovitz M. A., Coughlin S. R.: Clinical application of prostaglandins and their inhibitors. *Stroke*, 1981a, 12, 882—886.
29. Moscovitz M. A., Coughlin S. R.: Basic properties of the prostaglandins. *Stroke*, 1981b, 12, 696—701.
30. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwienne uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287—301.
31. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Effect of indomethacin on the morphology of the brain vascular network in the postischemic period. In: *De-*

- developmental and circulatory aspects of brain metabolism. Ed. B. B. Mršulja. Raven Press, New York 1982 (in press).
32. Northover B.: Indomethacin — a calcium antagonist. *Gen. Pharmacol.*, 1977, 8, 293—296.
 33. Pappius H. M., Wolf L. S.; Some further studies on vasogenic edema. In: *Dynamics of brain edema*. Eds. H. M. Pappius, W. Feindel. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1976, 138—148.
 34. Pickard J. D., MacKenzie E. T.: Inhibition of prostaglandin and the response of baboon cerebral circulation to carbon dioxide. *Nature New Biol.*, 1973, 245, 187—188.
 35. Pickard J. D., MacDonel J. A., MacKenzie E. T., Harper A. M.: Response of the cerebral microcirculation in baboons to changing perfusion pressure after indomethacin. *Circ. Res.*, 1977, 40, 198—203.
 36. Pickard J. D., Simeone F. A., Vinnall P.: H^+ , CO_2 , prostaglandins and cerebrovascular smooth muscle. In: *Some actions on vascular smooth muscle*. Ed. E. Betz. Springer, Berlin 1976, 101—104.
 37. Ruszczewski P.: Poziom endogennych prostaglandyn w krwi żyłnej mózgu u psa w warunkach hipo- i hiperkapnii, hipoksji i ostrego niedokrwienia w mózgu. Praca doktorska. CMDiK PAN, Warszawa 1977.
 38. Sakabe T., Siesjö B. K.: The effect of indomethacin on the blood flow-metabolism couple in the brain under normal, hypercapnic and hypoxic conditions. *Acta Physiol. Scand.*, 1979, 107, 283—284.
 39. Tamura A., Harizoe H., Fukuda T.: Relationship of cerebral vasculature to infarcted areas following unilateral common carotid artery ligation in the Mongolian gerbils. *J. Cerebral Flow Metabol.*, 1981, 1, Suppl. 1, 194—195.
 40. Vlahov V.: The role of prostaglandin in the regulation of cerebral vessel wall reactivity. In: *Cerebral vessel wall*. Eds. J. Cervós-Navarro, E. Betz, F. Matakas, R. Willenweber. Raven Press, New York 1976, 143—147.
 41. Volpi M., Naccache P. H., Shaafi R. I.: Arachidonate metabolite(s) increase permeability of the plasma membrane of the neuropil to calcium. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1980, 92, 1221—1231.
 42. Zülch J.: On circulatory disturbances in borderline zones of cerebrum and spinal cord. *Proc. 3rd Intern. Congress Neurol. Excerpta Medica*, Amsterdam 1955, 849—859.

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

BARBARA GAJKOWSKA, MIROSLAW J. MOSSAKOWSKI,
ANNA ZAREBA-KOWALSKA

ACTION OF INDOMETHACIN ON NUCLEOLAR FINE STRUCTURE Preliminary report

Laboratory of Electron Microscopy and Department of Neuropathology, Medical
Research Centre, Polish Academy of Sciences

In the recent years indomethacin, a well known inhibitor of fatty acid cyclo-oxygenase, has been widely used in experimental studies on brain ischemia as a factor preventing the damaging effects of prostaglandins, the level of which was shown to increase remarkably at the time of cerebral ischemia and during the postischemic recovery (Ruszczewski 1977; Gaudet, Levine 1979; Gaudet et al. 1980; Iannotti et al. 1981; Bhakoo et al. 1982). As demonstrated by Abdel-Halim et al. (1980) indomethacin in a single dosis of 3 mg/kg body weight reduces the cerebral synthesis of prostaglandins to 20 percent for at least 8 hours. Furlow and Hallenbeck (1978), Hallenbeck and Furlow (1979) and Boulu et al. (1982) noticed that indomethacin premedication of animals subjected to temporary cerebral ischemia remarkably reduced postischemic abnormalities of the regional cerebral blood flow. Indomethacin was also claimed to prevent development of the postischemic brain edema (Crockard et al. 1980; Iannotti et al. 1981; Bhakoo et al. 1982) and protein extravasation to the brain tissue in experimental arterial hypertension, induced by intravenous administration of adrenaline (Johanson 1981). In our own studies, it was shown that the indomethacin administered prior to carotid arteries ligation in Mongolian gerbils prevented appearance of postischemic microcirculatory abnormalities and reduced to a great extent nerve tissue lesions, due to ischemic incident (Mossakowski, Kwiatkowska-Patzer 1982, 1983). However, electron microscopic studies besides beneficial effect on the brain tissue, revealed some striking abnormalities in the ultrastructure of nucleoli of nerve and glial cells being unusual for the ischemic nerve tissue alterations (Brierley et al. 1973; Garcia et al. 1978). This inclined us to study the direct effect of indomethacin on the nerve tissue in *in vivo* and *in vitro* conditions.

MATERIAL AND METHODS

The studies were performed on organotypic cultures of the newborn rats cerebellum and on animals given intraperitoneal injection of indomethacin in a dosis identical with that used in experiments on the temporary brain ischemia (Mossakowski, Gajkowska 1984).

Tissue cultures. Organotypic cultures were prepared from newborn Wistar rat cerebellar tissue on collagen-coated coverslips and maintained in Carrel flasks. Nutrient medium, renewed twice weekly, consisted of 50% human serum, 40% balanced salt solution (BBS) and 10% embryo saline extract, supplemented with glucose to a final concentration of 600 mg/100 ml of medium. The pH of the medium ranged from 7.0 to 7.3. Selected 14 day cultures were subjected for three days to the action of indomethacin. This drug was added into the incubating medium in two doses: 4 mg% and 8 mg%. Cerebellar cultures of the same age *in vitro* carried out in a routine manner with no addition of indomethacin served as control ones.

For electron microscopy the cultures were briefly rinsed in Locke solution. *In situ* fixation was carried out in buffered glutaraldehyde, pH 7.2, the postfixation in osmium tetroxide, the embedding in Epon 812. The cultures were cut on an ultramicrotome, counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined under JEM 7 A electron microscope.

Animals. Experiments were performed on 4-month-old Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) of both sexes which were given intraperitoneal injection of indomethacin (Merck-Sharp and Dohme Res. Lab. USA) dissolved in Krebs-Ringer solution in a dose of 10 mg/1 kg. The drug was administered either 45 min or 6 hrs prior to decapitation. The control animals were given intraperitoneal injection of the solvent.

The tissue blocks comprising cerebral cortex, hypothalamus, thalamus, striatum, septal nuclei and Ammon's horn were fixed in 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, pH 7.2 for 1 h, postfixed in osmium tetrachloride for 1 h, washed with Millonig's buffer, dehydrated in grading ethanol and embedded in Epon 812. The ultrathin sections were counterstained in grids with uranyl acetate and lead citrate and examined under JEM 7 A electron microscope.

RESULTS

Studies on tissue cultures. Marked effects of indomethacin on the nucleoli of both nerve and glial cells were seen after 3 days incubation of cultures in nutrient medium containing the drug in a dose of 4 and

8 mg⁰/. Remarkable variability of size and shape of nucleoli and their partial segregation were the most striking features (Figs 1, 2, 3, 4). The shape of nucleoli was more irregular than in normal untreated cultures. There was partial segregation of RNP granules and fibrils. Relatively large extranucleolar space of chromatin was visible (Figs 1, 2, 3). The



Fig. 1. Dose of 4 mg⁰/ indomethacin. Partial segregation of the nuclear masses. Note the granular and dense fibrillar areas (arrows) and large extranucleolar accumulation of chromatin (Chr). $\times 10\ 520$

Ryc. 1. Dawka 4 mg⁰/ indometacyny. Jąderko wykazuje częściową segregację. Widoczna jest część ziarnista i gęste skupienia części włóknistej jąderka (strzałki) oraz obfite zewnątrz-jąderkowe nagromadzenie chromatyny (Chr). Pow. 10 520 \times

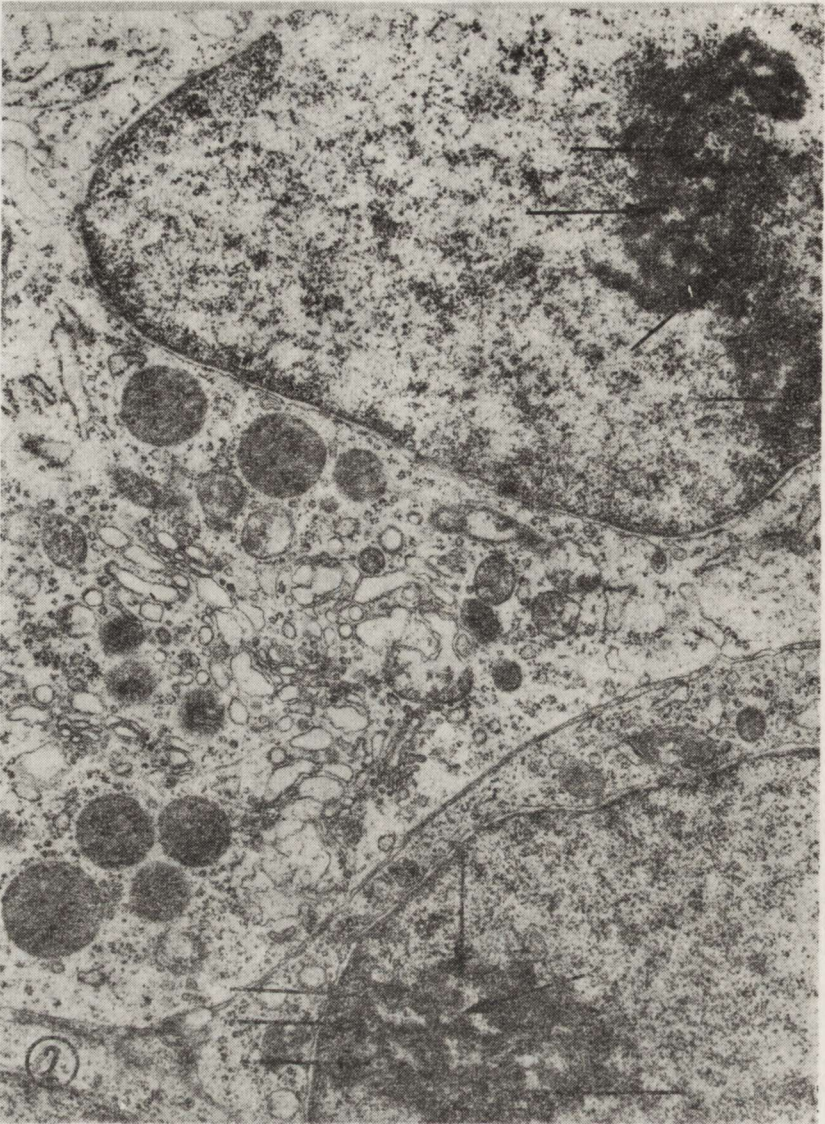


Fig. 2. Dose of 4 mg% indomethacin. In intranucleolar chromatin many perichromatin granules (arrows) are present. $\times 10\ 520$

Ryc. 2. Dawka 4 mg% indometacyny. W chromatynie wewnątrzjądrowej liczne ziarnistości (strzałki) perychromatynowe. Pow. $10\ 520 \times$

number of perichromatin granules was very high, particularly at the inner surface of nucleolus-associated chromatin (Figs 2, 3). The granular portion of nucleoli was smaller than in cells in untreated cultures (Figs 1, 4). In most of the cells nuclei contained dispersed chromatin granules, but in some of them significant amount of chromatin condensed in irregular aggregates was seen. In the cytoplasm the Golgi complexes

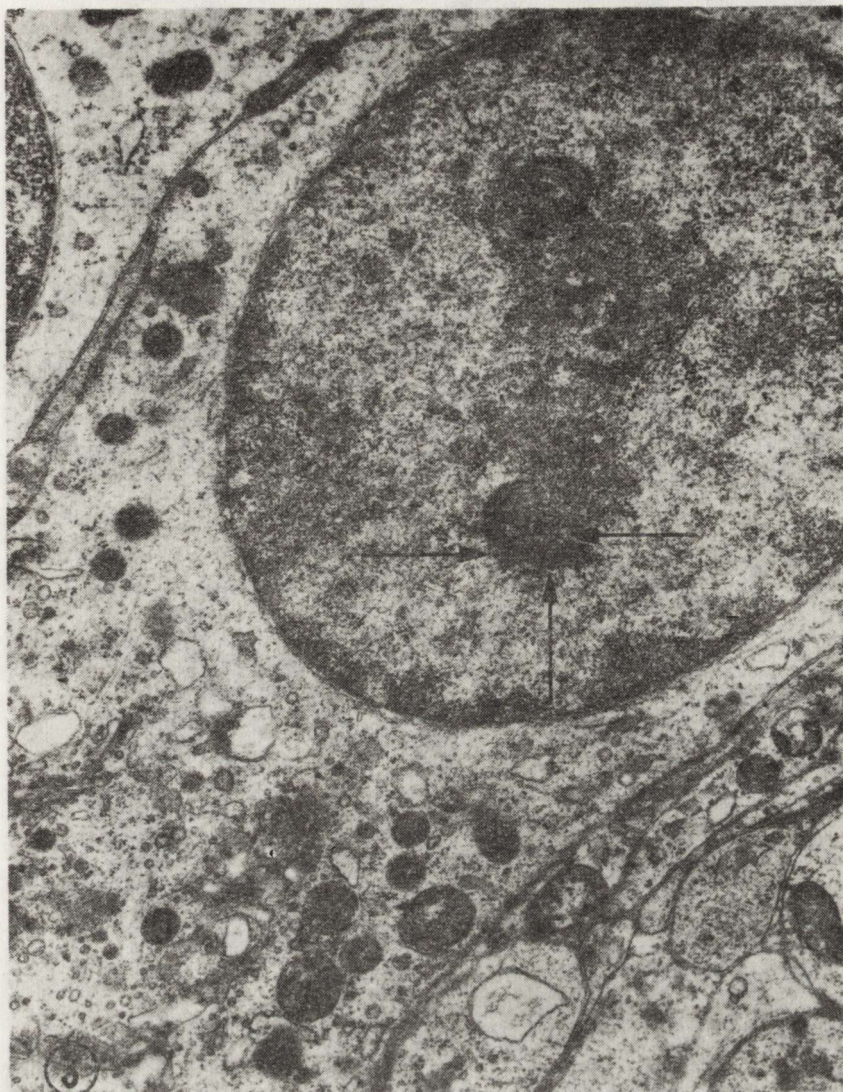


Fig. 3. Dose of 8 mg% indomethacin. Note close relationship of the perichromatin granules (arrows) with fibrillar part of nucleolus and intranucleolar chromatin. The fibrillar substance of the nucleolus forms irregular figures. $\times 10\ 520$

Ryc. 3. Dawka 8 mg% indometacyny. Zwraca uwagę ścisły związek ziarnistości perychromatynowych (strzałki) z częścią włóknistą jąderka i wewnątrzjąderkową chromatyną. Część włóknista jąderka tworzy różnego kształtu figury. Pow. $10\ 520 \times$

were well developed and numerous mitochondria and liposomes were present. In some cells channels of rough endoplasmic reticulum were widely distended (Figs 2, 4). The above described changes were present in cultures treated with both drug doses. No significant dose-dependent differences were noticed, although in some cultures with higher in-

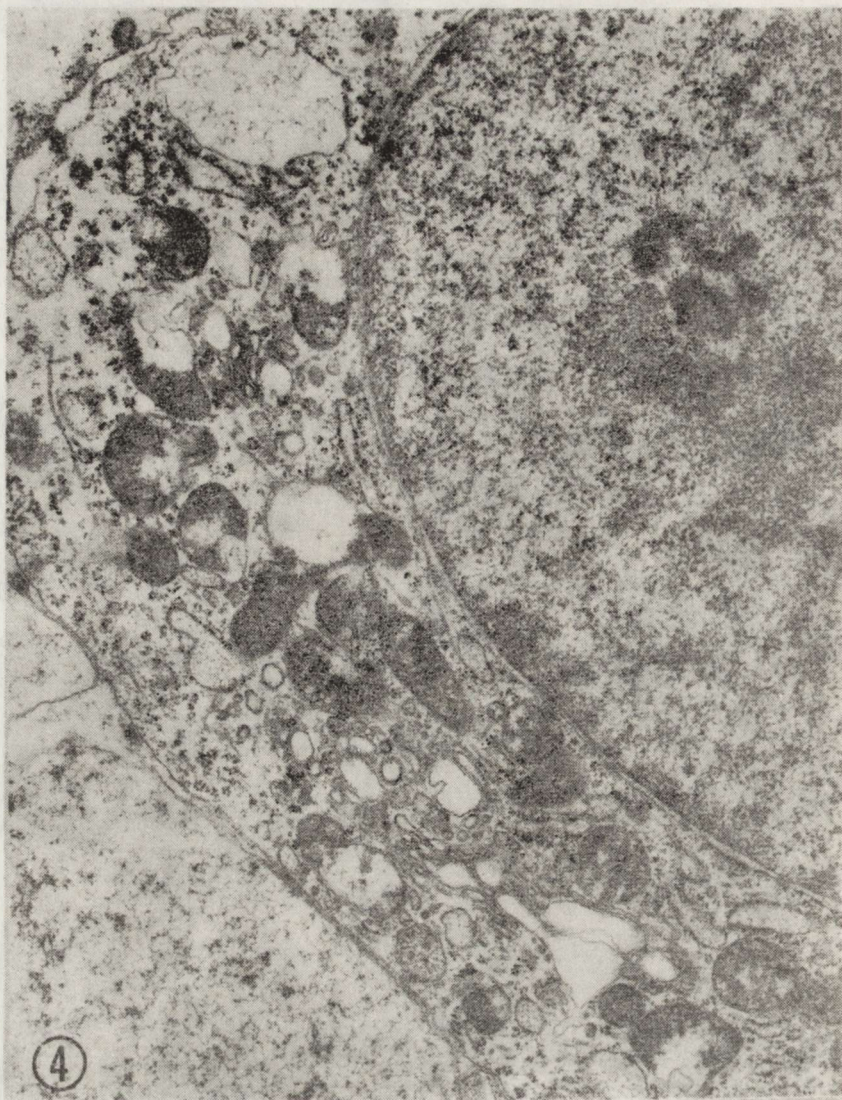


Fig. 4. Dose of 8 mg% indomethacin. Fragment of the nucleolus with typical microsegregation. $\times 10\ 520$

Ryc. 4. Dawka 8 mg% indometacyny. Fragment jąderka z typowymi cechami mikrosegrecji. Pow. 10 520 \times

domethacin dose the nucleolar abnormalities seemed to be more pronounced.

Studies on animals. In indomethacin treated animals some of the nerve and glial cells revealed ultrastructural changes in the nucleoli and cytoplasm. They were more common in cortical and thalamic nerve cells. Nucleolar changes consisted in segregation of its components into two distinct zones: granular and fibrillar. The granular component was

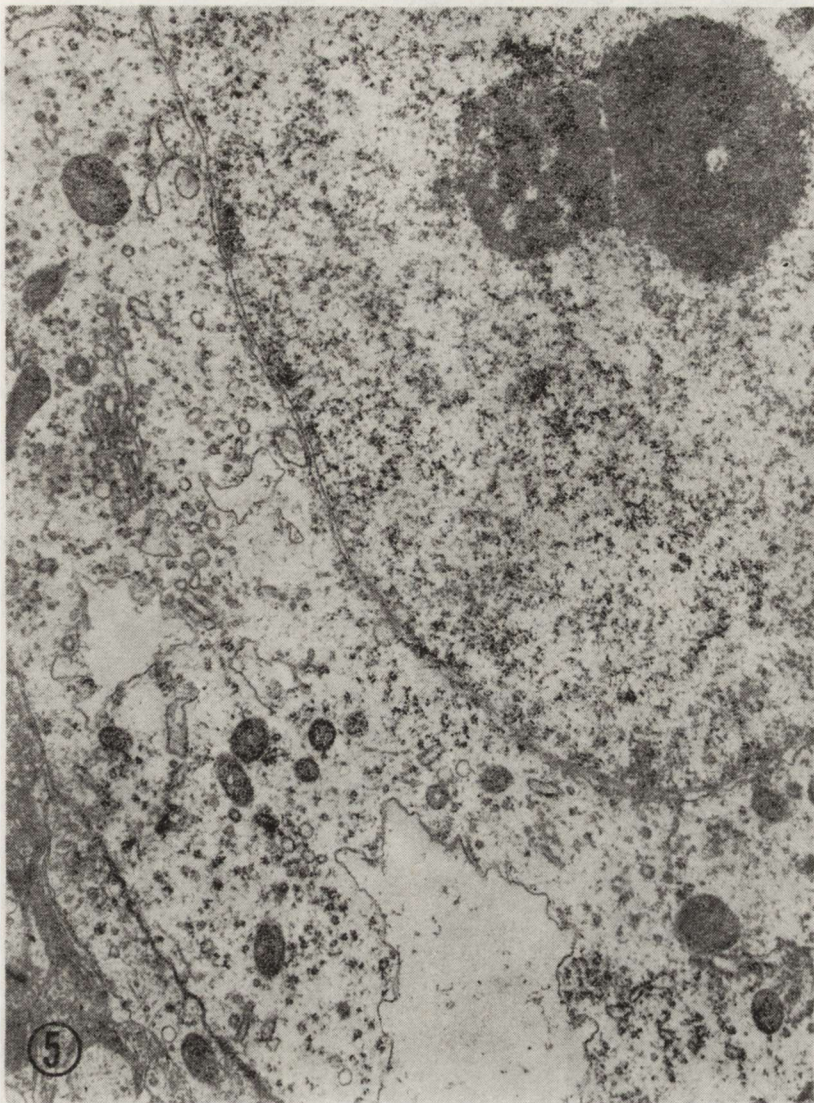


Fig. 5. Cerebral cortex of gerbil 45 min after indomethacin. Note the partial segregation of granular and fibrillar material. $\times 10\ 520$

Ryc. 5. Kora mózgowia chomika mongolskiego. 45 min po podaniu indometacyny. Widoczne oddzielenie się części ziarnistej i włóknikowej jąderka. Pow. $10\ 520 \times$

separated sharply from other elements (Fig. 5). The granular substance was usually located in central portion of nucleoli, while the fibrillary one, as a rule was extruded to their periphery. The extranuclear areas contained numerous perichromatin granules (Figs 5, 6). Amount of the perinucleolar chromatin was changeable. The chromatin in most of the nuclei was homogeneously distributed. In the cytoplasm of the cells some channels of rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes were markedly distended. Most of the channels were electron lucent,

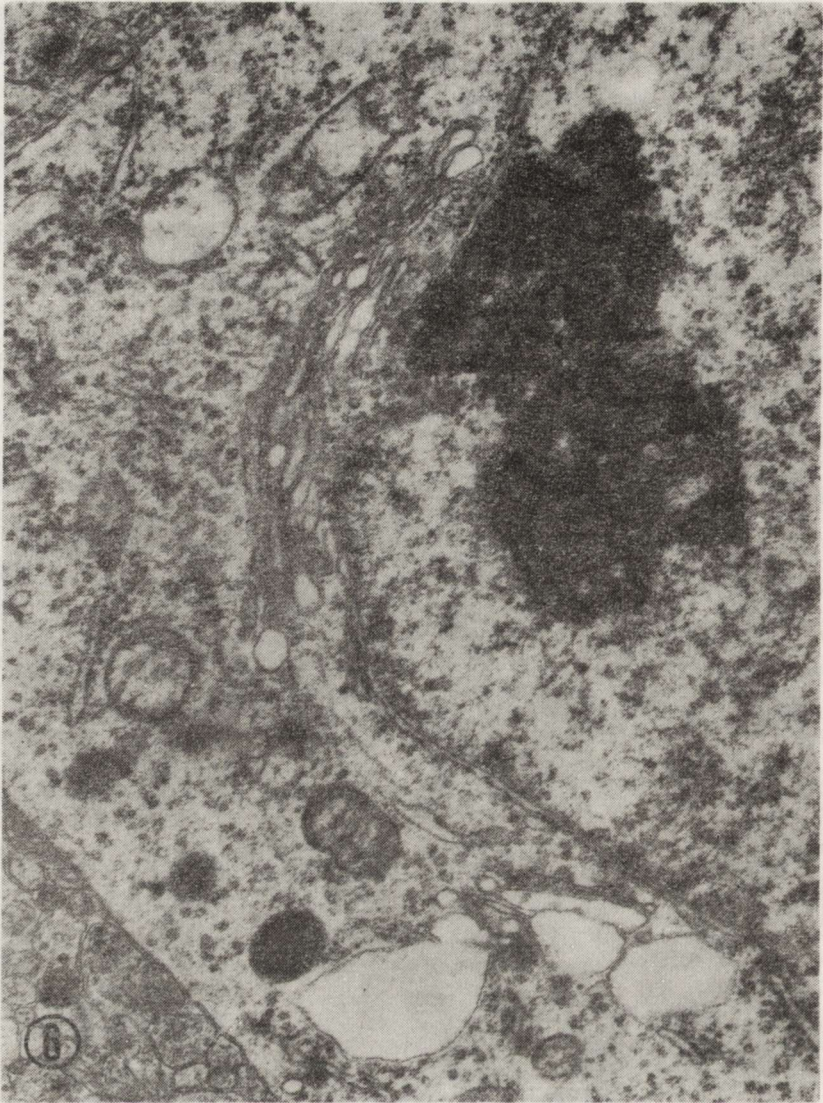


Fig. 6. Striatum of gerbil 45 min after indomethacin. Partial segregation of fibrillar and granular compartment of nucleolus and condensed perinucleolar chromatin (Chr). $\times 10\ 520$

Ryc. 6. Striatum chomika mongolskiego 45 min po podaniu indometacyny. Widoczne częściowe oddzielenie się składników włóknistych i ziarnistych jąderka oraz zagęszczenie przyjąderkowej chromatyny (Chr). Pow. $10\ 520 \times$

only some of them contained a small amount of flake-like material (Figs 5, 6).

The above described changes were present in animals sacrificed both 45 min and 6 hrs following drug administration. It seemed that in animals with longer exposition for the drug the nucleolar changes were more widely distributed.

DISCUSSION

Our observations disclose of the influence of indomethacin on the cellular metabolism of the central nervous system. The drug induces atypical nucleolar segregation, known under the name of microsegregation. This is characterized by the juxtaposition of granular and fibrillar nucleolar compartments, without their segregation into completely separated zones. Similar nucleolar lesions were observed in other tissues after cordycepin and camptothecin action (Puvion et al. 1974; Gajkowska et al. 1977) and were considered as morphological evidence of disturbances in normal synthesis or processing of nucleolar RNA. The observed nucleolar segregation was concomitant with an accumulation of perichromatin granules not only within nuclear chromatin located in the extranuclear areas but also at the surface of the nucleolar RNA components. It was only recently, that cytochemical and electron microscopic-autoradiographic studies were undertaken to explain the functional significance of perichromatin granules (Kumar, Wu 1973; Puvion et al. 1976; Gajkowska et al. 1977). It was suggested that, with a great probability these abnormal granules corresponded to storage forms of either nontransported or abnormally processed ribosomal RNA. Our observations on nucleolar alterations induced by indomethacin *in vitro* and *in vivo* are in good agreement with previous studies on the action of some antimetabolites on the nucleic acids metabolism in non-neural tissue (Monneron, Bernhard 1969; Monneron et al. 1970; Vazquez-Nin, Bernhard 1971; Puvion et al. 1974; Nash et al. 1975). Microsegregation of nucleolar substances concomitant with abnormal perichromatin granules accumulation in the nerve tissue cellular elements under the action of indomethacin may suggest that the drug induces impairment in either nucleolar RNA processing or r-RNA transport. In that case remote effects of indomethacin may be harmful to the nerve tissue metabolism. This side effects of the drug, if confirmed in biochemical studies, will certainly limit its usefulness in the cerebro-vascular events, despite its protective role in the development of postischemic tissue alterations.

WPŁYW INDOMETACYNINY NA ULTRASTRUKTURĘ JĄDERKA

Doniesienie wstępne

Streszczenie

Prześlędzono wpływ indometacyny na ultrastrukturę jąderka komórek nerwowych i glejowych w warunkach *in vivo* i *in vitro*.

Wykazano, że pod wpływem leku dochodzi do mikrosegregacji jąderka i do nieprawidłowego nagromadzenia ziaren perichromatynowych zarówno wśród, jak i na powierzchni okołojąderkowej chromatyny.

Spostrzeżenia te sugerują, że indometacyna, podobnie jak szereg substancji antymetabolicznych może prowadzić do zaburzenia dojrzewania jąderkowego RNA lub upośledzenia transportu r-RNA. Ten uboczny efekt działania leku, jeśli znajdzie potwierdzenie w badaniach biochemicznych, ograniczy niewątpliwie jego użyteczność w zapobieganiu tkankowym następstwom niedokrwienia mózgu.

ВЛИЯНИЕ ИНДОМЕТАЦИНА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ ЯДРЫШКА

Краткое сообщение

Резюме

Исследовалось влияние индометацина на ультраструктуру ядрышка нервных и глиальных клеток в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Было показано, что под влиянием препарата наступает микросегрегация ядрышка и неправильное скопление перихроматиновых зерен, как внутри, так и на поверхности околоядрышкового хроматина.

Эти наблюдения показывают, что индометацин, как и ряд антиметаболических веществ может вести к нарушению созревания ядрышковой РНК или к ухудшению транспорта р-РНК. Этот побочный эффект влияния препарата, если будет подтвержден в биохимических исследованиях, несомненно ограничит его пригодность для предотвращения тканевых последствий ишемии мозга.

REFERENCES

1. Abdel-Halim M., Lunden G., Anggard E.: Prostaglandin profiles in nervous tissue and blood vessels of the brain of various animals. *Prostaglandins*, 1980, 10, 249—258.
2. Bhakoo K. K., Lascelles P. T., Crockard H. A., Avery S. H.: Brain prostaglandins and cerebral edema following temporary vascular occlusion in gerbils. *V. Intern. Conf. Prostaglandins. Florence, May 18—21, 1982. Abstracts 706.*
3. Boulu R. G., Plotkin M., Guemau C., Sofeir M., Wiernsperger N.: Effect of indomethacin in experimental cerebral ischemia. *Pathol., Biol.*, 1982, 30, 278—281.
4. Brierley J. B., Meldrum B. S., Brown A. W.: The threshold and neuropathology of cerebral anoxic, ischemic cell change. *Arch. Neurol.*, 1973, 29, 367—373.
5. Crockard H. A., Iannotti F., Hanstock A. H., Smith R. D., Harris R. J., Symon L.: Cerebral blood flow and edema following carotid occlusion in gerbil. *Stroke*, 1980, 11, 494—498.
6. Furlow T. W. Jr., Hallenbeck J. M.: Indomethacin prevents impaired perfusion of the dog's brain after global ischemia. *Stroke*, 1978, 9, 591—594.
7. Gajkowska B., Puvion E., Bernhard B.: Unusual perinucleolar accumulation of ribonucleoprotein granules induced by camptothecin in isolated liver cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 1977, 60, 335—347.
8. Garcia J. H., Lossinsky A. S., Kauffman F. C., Conger K. A.: Neuronal ischemic injury: light microscopy, ultrastructure and biochemistry. *Acta neuropathol. (Berl.)*, 1978, 43, 85—95.
9. Gaudet A. J., Levine L.: Transient cerebral ischemia and brain prostaglandins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1979, 86, 393—401.
10. Gaudet R., Alam I., Levine L.: Accumulation of cyclo-oxygenase products of arachidonic acid metabolism in gerbil brain during reperfusion after bilateral common carotid artery occlusion. *J. Neurochem.*, 1980, 35, 653—658.

11. Hallenbeck J. M., Furlow T. W. Jr.: Prostaglandin I₂ and indomethacin in the dog. *Stroke*, 1979, 10, 629—637.
12. Iannotti W., Crockard A., Ladds G., Symon L.: Are prostaglandins involved in experimental ischemic edema in gerbils. *Stroke*, 1981, 12, 301—306.
13. Johanson B. B.: Indomethacin and cerebro-vascular permeability to albumin in acute hypertension and cerebral embolism in rat. *Exp. Brain Res.*, 1981, 42, 331—336.
14. Kumar A., Wu R.: Role of ribosomal RNA transcription in ribosome processing in HeLa cells. *J. Mol. Biol.*, 1973, 80, 265—276.
15. Monneron A., Bernhard W.: Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. *J. Ultrastruct. Res.*, 1969, 27, 266—278.
16. Monneron A., Burglen M., Bernhard W.: Action of toyocamycin on nucleolar fine structure and function. *J. Ultrastruct. Res.*, 1970, 32, 370—389.
17. Mossakowski M. J., Gajkowska B.: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in mongolian gerbils. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, 347—365.
18. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Effect of indomethacin on the morphology of the brain vascular network in the postischemic period. In: *Developmental and circulatory aspects of brain metabolism*. Ed. B. B. Mrsulja. Raven Press. New York (in press).
19. Mossakowski M. J., Kwiatkowska-Patzer B.: Wpływ indometacyny na niedokrwiennie uszkodzenia mózgu u chomika mongolskiego (*Meriones unguiculatus*). *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 287—301.
20. Nash R., Puvion E., Bernhard W.: Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranuclear RNA. *J. Ultrastruct. Res.*, 1975, 53, 395—405.
21. Puvion E., Garrido G., Viron A.: Technique rapid d'isolement et de survie en monocouches d'hepatocytes de rat adulte. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1974, 279, 509—512.
22. Puvion E., Moyne G., Bernhard W.: Action of 3'deoxyadenosine (Cordycepin) on the nuclear ribonucleoproteins of isolated liver cells. *J. Microsc. Biol. Cell*, 1976, 25, 17—32.
23. Ruszczewski P.: Poziom endogennych prostaglandyn w krwi żyłnej mózgu u psa w warunkach hipo- i hiperkapnii, hipoksji i ostrego niedokrwienia. Praca doktorska. CMDiK PAN, Warszawa 1977.
24. Vazquez-Nin G., Bernhard W.: Comparative ultrastructural study of perichromatin and Balbiani ring granules. *J. Ultrastruct. Res.*, 1971, 36, 842—860.

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

RYSZARD PLUTA, JAN ALBRECHT

THIOACETAMIDE-INDUCED
HEPATIC ENCEPHALOPATHY IN THE RAT
Clinical Observations

Department of Neuropathology Medical Research Centre,
Polish Academy of Sciences

Recently in this laboratory a model of hepatic encephalopathy (HE) was developed consisting in repeated administrations into rats of thioacetamide (TAA) (Hilgier et al. 1983; Kraśnicka et al. 1983). The procedure appears to be particularly well suited for studying the development of distinct metabolic stages of the disease within a relatively short time (Albrecht 1984; Albrecht, Hilgier 1984; Hilgier, Albrecht 1984). This paper describes in some detail the results of electrocorticographic (ECoG) and electrocardiographic (ECG) studies and behavioral observations made on the animals at various stages of HE in the same model.

MATERIAL AND METHODS

The experiments was performed on 20 female Wistar rats weighing 180—220 g. The animals received intraperitoneal injections of 250 mg/kg body weight of TAA in physiological saline, at 24 h intervals, respectively twice (48 h group), thrice (72 h group) and four times (94—96 h group) (Hilgier et al. 1983; Albrecht, Hilgier 1984).

For implantation of ECoG electrodes the animals were anesthetized with ether. Silver needle electrodes were inserted through holes bored in the skull above the left hemisphere in the fronto-parietal, parieto-occipital and frontal sinus regions and placed epidurally. One bipolar and two monopolar leads were employed. To eliminate the effects of ether, the ECoG recordings were made 2 h after implantation. Both the ECoG and ECG (second limbic lead) activities were recorded with an 8-channel EEG apparatus (Accutrace-8, Beckman). The paper speed was 15 mm/sec.

Observations of the behavior and breathing rate of the rats were carried out throughout the whole period of experiment.

RESULTS

ECoG

The ECoG activity in control animals consisted of 8-17 cps 10—100 μV waves, separated by low frequency (2—5 cps) waves of amplitude reaching 220 μV . Beside, a great number of theta waves of varying amplitude and a few delta waves were a constant element of the recordings (Fig. 1).

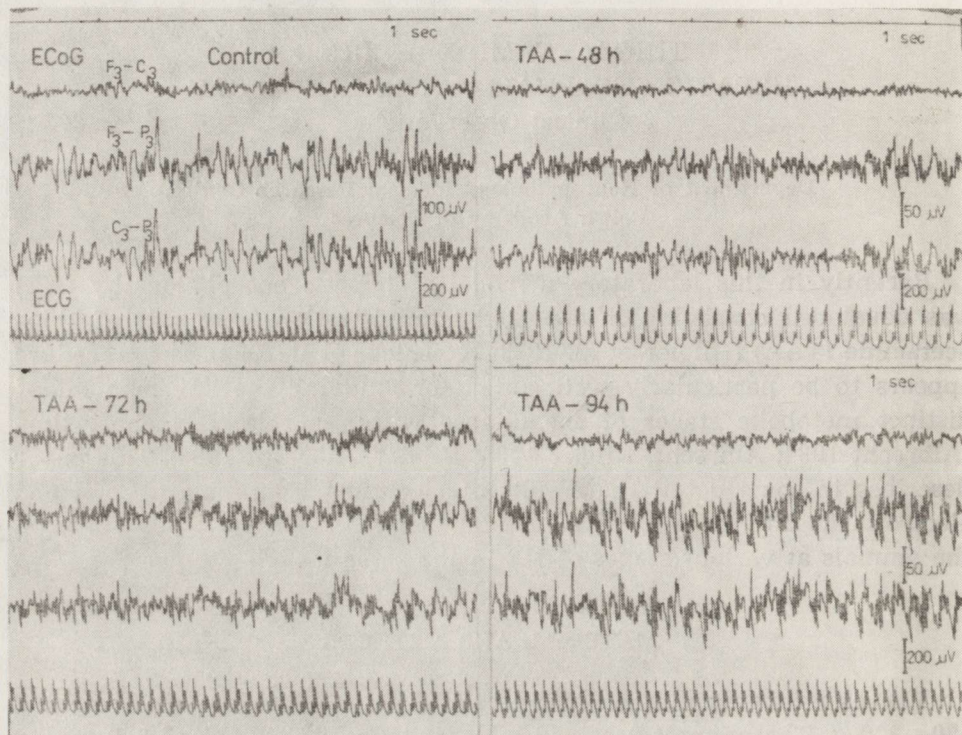


Fig. 1. ECoG and ECG changes after thioacetamide administration. Observation period: 48—94 h after the first administration of TAA. Time constant: 0.03 sec

Ryc. 1. Zmiany ECoG i EKG po podaniu tioacetamidu. Okres obserwacji: 48—94 godz po pierwszym podaniu TAA. Stała czasu: 0,03 sek

In the recordings from the 48 h group, there dominated 18—26 cps waves arranged in spindles of amplitude ranging from 5—10 to 50—70 μV . Beside, numerous 5—7 cps 40 μV waves and single 2—3 cps 65 μV waves were noted (Fig. 1).

After three TAA administrations (72 h) a marked enrichment of the recording was observed. It mostly consisted of 18—23 cps 65 μV waves and 23—33 cps, 10—45 μV spindles. Beside, 4—7 cps 60 μV waves and sporadically 2—3 cps 45 μV waves were present (Fig. 1).

Critical changes in the recordings were observed after the fourth TAA administration (94—96 h group). In the 94th hour, 18—22 cps waves of varying amplitude, typically present in the 72 h group, were separated by a significant number of single — or groups of — slow waves. Numerous 125 μ V peaks occurred independently or preceded the slow waves. Thirty minutes later, an instant decrease of the frequency and amplitude of the recordings was noted (Fig. 2). Single 100 μ V delta waves and very low amplitude (5—10 μ V) waves characterized the recording. In the 95th hour, 75 μ V delta waves were still sporadically present and 1 h later the recordings became isoelectric (Fig. 2).

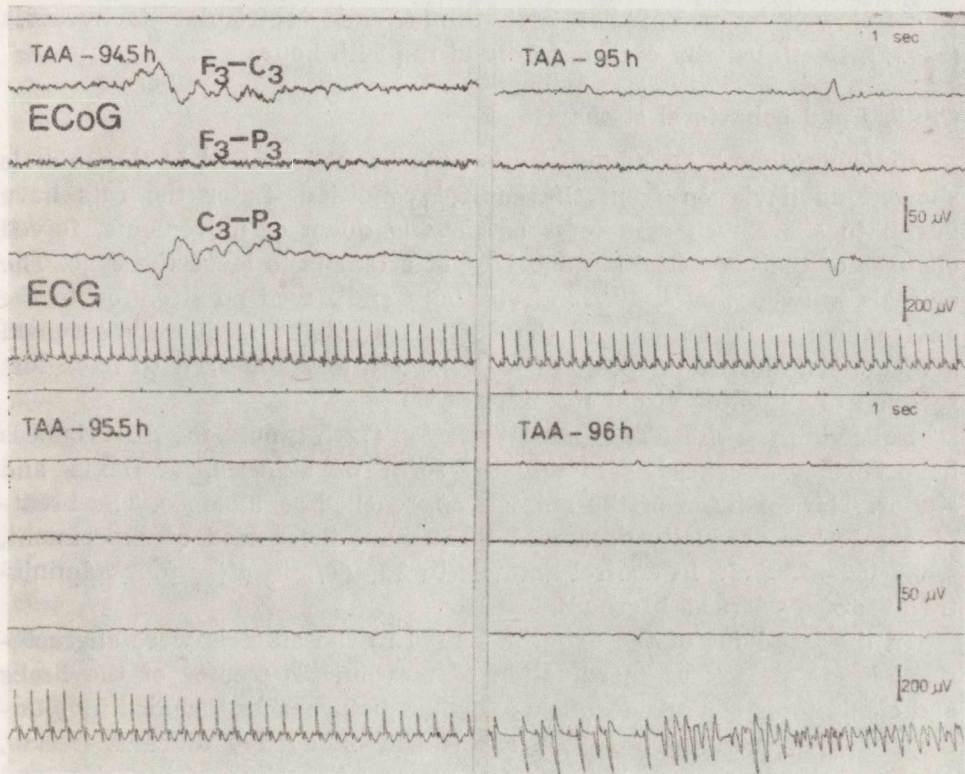


Fig. 2. ECoG and ECG changes after thioacetamide administration. Observation period: 94.5—96 h after the first administration of TAA. Time constant: 0.03 sec

Ryc. 2. Zmiany ECoG i EKG po podaniu tioacetamidu. Okres obserwacji: 94,5—96 godz po pierwszym podaniu TAA. Stała czasu: 0,03 sek

ECG

In the control animals, the ECG recordings showed regular sinusoidal rhythm with a frequency of 390—420/min (Fig. 1). In the 48 h group the first manifestations of cardiac dysfunction were recorded, consisting of bradycardia (200—220/min), an increase of P amplitude, prolonged du-

ration of QRS complex and elevation of ST with disappearance of Q. In the 72 h group the pulse rate was 240—260, the P amplitude was further increased, the ST changes were maintained, though less pronounced and T has begun to reverse. In the 94th h, the pulse rate was 300—310/min, the pulse was regular, the ST changes persisted and T was reversed (Fig. 1). Thirty minutes later, the P and ST changes retreated, the pulse rate was 230—250/min and the QRS amplitude was increased from 160 μ V in control to 260 μ V. In the 95th hour, slight elevation of ST and a pulse rate of 200—220/min were recorded. In the following 30 min, bradycardia has further developed to 180—72/min and the QRS complex was characterized by amplitude variations ranging from 360—80 μ V. This was followed by myocardial arrhythmia and ventricular tachycardia (Fig. 2). Death usually occurred around the 96th hour.

Clinical and behavioral status

Following one TAA administration (during the first 24 h) the animals showed no deviation from the control condition. Later the rats have begun to show such symptoms as slowing down of movements, forced changes of the body position and lack of attempts to leave the cage. The animals were losing agility and elasticity and paid no attention to the environment. The animals of the 48 h group have frequently assumed a maximally curled up position of the body and appeared to have lost reaction to auditory or visual stimuli.

Following the third TAA administration (72 h group) the disturbances have further advanced, assuming the form of akinesia, areflexia and stupor. The condition of the animals approached somnolence. The breathing rate has gradually decreased throughout the period of experiment, from 150—130/min in control animals to 80—60/min after four administrations of TAA (95.5 h group).

In the last hour of the experiment (96 h) the animals were characterized by total lack of coordination of movements, tremor of the limbs and clonic-tonic convulsions. Some further disturbances included involuntary pawing, catching breath, cyanosis and exhaustive diuresis. Besides, all the animals showed akinesia, areflexia, flaccidity of muscles, and a decrease of pulse and breathing rate — a combination of symptoms typical for a comatous condition. All the animals without exception died around the 96th hour.

DISCUSSION

Changes in all the parameters under study became for the first time apparent after two administrations of TAA (the 48 h group), which correlates well with the appearance of changes in the cerebral metabolism

in the same model (Albrecht, Hilgier 1984). Noteworthy, the pattern of biochemical changes at this early stage was interpreted to be indicative of metabolic stimulation of the brain rather than of advanced encephalopathy. The results of the electroencephalographic measurements appear to confirm this conclusion. The ECoG recordings at this stage were characterized by increased frequency and decreased amplitude of the waves, which is in sharp contrast to what has been reported for more advanced stages in patients and in different models. Holm et al. (1977) and Fischer (1977), who have studied long-term HE with very high hyperammonemia and symptoms of coma induced by TAA in the cat, reported decreased frequency in their ECoG recordings, which was accompanied by either an increase or a decrease of amplitude. In turn Opolon et al. (1976) in their studies on the hepatic devascularization model in the pig, have observed ECoG recordings where initially both the frequency and the amplitude were increased. In patients with acute fulminant hepatic failure, a slowing of cerebral electrical activity has been a frequent phenomenon (Hoyumpa et al. 1979). On the other hand, the ECoG changes observed in this study in the 48 h group, resemble those recorded by Lenartowicz (1961) following the infusion of ammonium salts under light ether anesthesia. The decrease of amplitude of ECoG as a characteristic effect of ammonia was originally emphasized by Cohn and Ulshafer (1958). The present results are thus consistent with the earlier observation of moderate hyperammonemia at the same stage of the experiment (Albrecht, Hilgier 1984).

The changes in ECoG noted after subsequent TAA administrations, including in particular the occurrence of high voltage and paroxysmal slow wave forms, were typical of HE gradually advancing from excitation to coma. Notably, the recordings made at subsequent intervals corresponded well with stages 3—1 of the progression of the disease, according to the classification of Opolon et al. (1976).

All the stages of HE in the present model were accompanied by marked changes in the cardiovascular and respiratory systems and by behavioral abnormalities. The changes in ECG, in particular the ST and T changes, as well as cardiac arrhythmia, are interpreted to have manifested the condition of hypoxia, which was related to gradually decreasing breathing rate (cf. Pluta 1982). It remains to be envisaged whether these cardiac changes are a consequence of hepatic encephalopathy or of direct toxic action of thioacetamide or its metabolites. More elaborate studies on the behavioral correlates of different stages of HE in this model are under way.

In conclusion, the present study appears to have confirmed the major advantages of using the TAA model, which were earlier demonstrated in biochemical investigations: the possibility to envisage distinct stages of HE in a short time and with high reproducibility.

ENCEFALOPATIA WĄTROBOWA U SZCZURÓW
WYWOŁANA PODAWANIEM TIOACETAMIDU
Obserwacje kliniczne

Streszczenie

Przeprowadzono badania elektroencefalograficzne (ECoG) i elektrokardiograficzne (EKG) oraz oceniono zachowanie się szczurów w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej wywołanej przez kilkakrotne podanie tioacetamidu (TAA) w dawce 250 mg/kg masy ciała. Pierwsze zmiany w zapisach ECoG stwierdzano w 24 godziny po dwukrotnym podaniu TAA (grupa 48 godz.). Zmiany charakteryzowały się zwiększeniem częstotliwości i zmniejszeniem amplitudy fal, co stanowi przeciwieństwo obrazu opisywanego w zaawansowanych stadiach schorzenia w innych modelach doświadczalnych. Spostrzeżenie to zinterpretowano jako wykładnik tzw. pobudzeniowej, „metabolicznej” fazy encefalopatii, co potwierdza wyniki badań biochemicznych przeprowadzonych na tym samym modelu doświadczalnym. W późniejszych fazach doświadczenia (po 3 i 4 podaniach TAA) zapis ECoG zbliżał się do obrazu typowego dla śpiączki wątrobowej. Narastaniu zmian ECoG towarzyszyło pogłębianie się nieprawidłowości w zapisie EKG, świadczących o niedokrwieniu mięśnia sercowego oraz zmian zachowania zwierząt — od stanu pobudzenia do stanu śpiączki. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność zastosowanego modelu do szybkiej obserwacji różnych stadiów zaawansowania encefalopatii wątrobowej.

ПЕЧЕНОЧНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ У КРЫС ВЫЗВАННАЯ
ВВЕДЕНИЕМ ТИОАЦЕТАМИДА

Клинические наблюдения

Резюме

Были проведены электроэнцефалографические (ЭКоГ) и электрокардиографические исследования (ЭКГ), а также оценивалось поведение крыс при экспериментальной печеночной энцефалопатии, вызванной несколькими введениями тиацетамида (ТАА) в дозе 250 мг/кг веса тела. Первые изменения в записях ЭКоГ были обнаружены через 24 часа после двукратного введения ТАА (группа 48 час.). Изменения характеризовались повышением частоты и снижением амплитуды волн, что является противоположностью картины, описываемой при далеко зашедших стадиях заболевания в других экспериментальных моделях. Это наблюдение интерпретируется как показатель так называемой возбужденной, „метаболической” фазы энцефалопатии, что подтверждает результаты биохимических исследований, проведенных на этой же экспериментальной модели. В более поздних фазах эксперимента (после 3 и 4 введений ТАА) запись ЭКоГ приближалась к типичной для печеночной комы, картине. Усиление изменений ЭКоГ сопровождалось углублением нарушений в записи ЭКГ, свидетельствующим об ишемии сердечной мышцы, а также изменениями поведения животных — от состояния возбуждения до состояния комы. Полученные результаты подтверждают пригодность, примененной модели для быстрого наблюдения разных стадий развития печеночной энцефалопатии.

REFERENCES

1. Albrecht J.: Enhanced RNA and protein synthesis in vitro in astrocytes derived from rats in the early stage of experimental hepatogenic encephalopathy. Acta Neurol. Scand., 1984, submitted.

2. Albrecht J., Hilgier W.: Brain carbonic anhydrase activity in rats in experimental hepatogenic encephalopathy. *Neurosci. Lett.*, 1984, (in press).
3. Cohn R., Ulshafer T. R.: Electroencephalograph correlates of ammonium carbonate intoxication in the rat. *Nature*, 1958, 182, 1735—1736.
4. Fischer B.: Akute Leberschädigung durch Thioacetamid. *Morphologie, Biochemie und neurophysiologische Vergleiche mit Wirkungen hirntoxischer Substanzen*. *Fortschr. Med.*, 1977, 95, 291—294.
5. Hilgier W., Albrecht J.: Poziom amoniaku oraz jego metabolitów w mózgu w doświadczalnej encefalopatii wątrobowej podczas przedłużonego działania tioacetamidu i w okresie powrotu do normy. *Neuropat. Pol.*, 1984, 22, (in press).
6. 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.
7. Holm E., Striebel J. P., Münzenmaier R., Katterman R.: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. *Leber, Magen, Darm*, 1977, 7, 241—254.
8. Hoyumpa A. M., Desmond P. V., Avant G. R., Roberts R. K., Schenker S.: Hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*, 1979, 76, 184—195.
9. 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.
10. Lenartowicz P.: Wpływ soli amonowych na elektrokortikogram i korowe potencjały bezpośrednio wywołane. *Acta Physiol. Pol.*, 1961, 12, 365—380.
11. Opolon P., Lavallard M. C., Huguet Cl., Bidallier M., Granger A., Gallot D., Bloch P.: Hemodialysis versus cross hemodialysis in experimental hepatic coma. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 1976, 142, 845—854.
12. Pluta R.: Badania możliwości przeżycia mózgowia po całkowitym niedokrwieniu i zmian jemu towarzyszących. *Praca doktorska. CMDiK PAN, Warszawa 1982.*

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

ELŻBIETA KIDA, KRYSZYNA RENKAWEK, TERESA PIÓREK

OBRAZ NEUROATOLOGICZNY NASILONEJ DYSKINEZY TWARZOWO-JĘZYKOWEJ

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
i Klinika Neurologiczna ZNK II Wydziału Lekarskiego AM

Ruchy mimowolne o typie dyskinezy twarzowo-językowej stanowią niejednorodny pod względem etiologii zespół objawów klinicznych o nieznannej patogenezie. Postać samoistna dyskinezy twarzowo-językowej występuje u ludzi starych (Kameyama i wsp. 1974; Delwaide, Desseilles 1977). Rzadziej spotyka się przypadki, gdy ruchom mimowolnym towarzyszą dystoniczne skurcze odpowiednich grup mięśniowych, jak ma to miejsce w tzw. chorobie Meige'a (Altrocchi, Alto 1972; Tolosa 1981). Występują one również w postaci dyskinez polekowych, spowodowanych długotrwałym przyjmowaniem neuroleptyków (Faurbye 1970; Simpson, Kline 1976), preparatów L-DOPY (Chase, Tamminga 1979) i fenytoiny (McLellan, Swash 1974). Dyskinezy twarzowe stanowią także jeden z objawów bogatej symptomatologii klinicznej w nabytych i dziedzicznych chorobach mózgu, takich jak: encefalopatia wątrobowa (Victor i wsp. 1965; Nielubowiczowa, Tarnawska 1973; Finlayson, Superville 1981), płasawica Huntingtona czy płasawica starcza (Bruyn 1968).

W każdej z wymienionych grup schorzeń istnieją pewne cechy charakterystyczne dla obserwowanych ruchów w obrębie twarzy. Spontaniczne dyskinezy twarzowo-językowe spotykane u osób po 60 roku życia, z wyraźną przewagą kobiet, cechuje stereotypowość ruchów, ich nierytmiczność, różna częstotliwość (od 7 do 100 na minutę) i amplituda oraz stopniowe nasilanie się wraz z czasem trwania choroby. Wyraźnie zmniejszają się one lub ustępują w stanach senności lub snu (Delwaide, Desseilles 1977).

W encefalopatiach wątrobowych typowe są ruchy mimowolne warg, języka i twarzy polegające na wysuwaniu języka, robieniu z ust ryjka, mlaskaniu, oblizywaniu i grymasach twarzy (Nielubowiczowa, Tarnawska 1973; Finlayson, Superville 1981). Ruchy te często obejmują także kończyny i tułów, nasilając się w stanach pogorszenia i ustępując w okre-

sach poprawy klinicznej, chociaż znane są też przypadki ich utrwalania się (Hurwitz, Montgomery 1965). Ruchy obserwowane w późnych dyskienezach polekowych przypominają najbardziej ruchy płasawicze, często obejmując także kończyny i tułów (Klawans 1976).

Badania neuropatologiczne mające na celu znalezienie wykładnika morfologicznego dla poszczególnych form dyskienez twarzowych, z wyjątkiem obszernego materiału dotyczącego encefalopatii wątrobowych, są nieliczne i dostarczają często odmiennych danych.

Przedmiotem niniejszej pracy jest przedstawienie obrazu klinicznego dyskiinezy twarzowo-językowej o specyficznym charakterze ruchów mimowolnych i zmian morfologicznych, mogących tłumaczyć objawy kliniczne.

OBRAZ KLINICZNY

Chora J. N., lat 75, przyjęta była do Kliniki Neurologicznej ZNK II Wydziału Lekarskiego w Warszawie (Kierownik — prof. H. Jędrzejowska) 30.10.1980 r. z powodu znacznie nasilonych ruchów mimowolnych w obrębie języka i żuchwy. Ruchy te pojawiły się po raz pierwszy przed około półtora roku przed przyjęciem do Kliniki ..., ale występowały sporadycznie i w mniejszym stopniu. Na tydzień przed hospitalizacją dolegliwości zwiększyły się; z powodu stale utrzymujących się ruchów mimowolnych chora miała duże trudności z jedzeniem, mowa stała się dyzartryczna, następnie dołączyły się zaburzenia postawy i chodu.

W 1975 r. chora przeżyła lewostronną mastektomię z powodu raka sutka (rozpoznanie histopatologiczne: *carcinoma solidum dispersum partim adenoides*). W 1979 r. z powodu kilku epizodów utraty przytomności z przemijającym osłabieniem prawych kończyn miała wykonaną tomografię komputerową mózgu, której wynik był prawidłowy. W wywiadzie ponadto rozpoznana była przed 15 laty niedoczynność tarczycy oraz częste wzdęcia po ciężkostrawnych pokarmach. Leczona była środkami nasercowymi, preparatami tarczycy oraz przez krótki okres fenytoiną w dawce 150 mg dziennie. Do czasu obecnej hospitalizacji nie przyjmowała neuroleptyków, pochodnych L-DOPY czy cholinolityków.

Przy przyjęciu u chorej stwierdzono, z odchyień w stanie internistycznym: pojedyncze trzeszczenia u podstawy płuc oraz wyczuwalną wątrobę na 1 palec poniżej łuku żebrowego. Ciśnienie tętnicze 130/80 mm Hg, akcja serca miarowa.

Badanie neurologiczne wykazało, że pacjentka była przytomna, spowolniała psychoruchowo. Mowa była niewyraźna, niezrozumiała z powodu stałych, uporczywych ruchów mimowolnych w obrębie dolnej połowy twarzy. Ruchy te miały charakter stereotypowy i polegały na szybkim wysuwaniu języka daleko na bródkę z następowym jego zbaczaniem,

zawsze w stronę prawą, aż do kącika zewnętrznego ust. Na skórze brody stwierdzono macerację naskórka. Czasami dołączało się także skręcanie żuchwy w prawo. W zakresie kończyn ruchy czynne i siła były prawidłowe. Zwracało uwagę wzmożenie napięcia mięśniowego o typie plastycznym z objawem koła zębatego w prawej kończynie górnej. Nie było drżenia spoczynkowego, pozycyjnego czy zamiarowego. Odruchy fizjologiczne były miernie żywe, czucie niezaburzone, objawy patologiczne nie występowały. Chora samodzielnie nie potrafiła stać.

Po podaniu haloperidolu w dawce 2 mg dziennie uzyskano znaczne zmniejszenie ruchów mimowolnych, ale ze względu na pojawiającą się senność, a następnie stany gorączkowe i przemijający niedowład prawostronny lek odstawiono. Ogólny stan chorej po podaniu antybiotyków, nawodnieniu i środkach krążeniowych poprawił się, natomiast nasiliły się ponownie ruchy mimowolne. W ciągu dalszej obserwacji u chorej pojawiły się silne wzdęcia brzucha, wymioty, zaparcia. Stwierdzono obecność wolnego płynu w jamie otrzewnowej i opłucnej oraz masywne obrzęki kończyn dolnych. Po środkach moczopędnych i uzupełnieniu niedoborów białkowych oraz przetoczeniach krwi uzyskano ponownie poprawę stanu klinicznego. Zwracało uwagę, że ruchy mimowolne wyraźnie nasilały się w okresach poprawy, natomiast zdecydowanie zmniejszały w stanach pogorszeń z okresami patologicznej senności.

Na kilka dni przed zgonem dołączyła się niewydolność krążenia ze spadkiem ciśnienia tętniczego, senność na zmianę ze stanami pobudzenia psychoruchowego oraz niewydolność oddechowa. Chora zmarła 19.01. 1981 r. po ponad 2-miesięcznym pobycie w oddziale.

Badania dodatkowe: OB — 7 mm. Morfologia — Hb 7,6 g⁰/₀, erytrocyty 2 520 000, leukocyty 3 500 z prawidłowym rozmazem. Surowica: mocznik 98 mg⁰/₀, kreatynina 2 mg⁰/₀. Cukier — od wartości prawidłowych do 18 mg⁰/₀ pod koniec życia. Transaminazy 52,72 j. Proteinogram: białko całkowite 5,2 g⁰/₀, albuminy 49,4⁰/₀, alfa₁-globuliny 4,4⁰/₀, alfa₂-globuliny 7,2⁰/₀, beta-globuliny 12⁰/₀, gamma-globuliny 27⁰/₀. Bilirubina 2mg⁰/₀. Cholesterol 108 mg⁰/₀. Wskaźnik protrombinowy 77⁰/₀. Przejściowo niskie wartości potasu (2,7 mE) oraz podwyższony poziom fosfatazy zasadowej (120—170 j.). Płyn mózgowo-rdzeniowy: cytoza 3, białko 22 mg⁰/₀. EEG: zapis niskonapięciowy, bez czynności alfa, z przewagą czynności theta 6 Hz o amplitudzie 20—40 μV. Okresowo czynność bioelektryczna zanikała, zwłaszcza po stronie lewej. Ponadto nad półkulami mózgu występowała polimorficzna czynność fal 5 Hz o amplitudzie do 50 μV.

Rozpoznanie kliniczne: *Dyskinesia oro-mandibularis probabiliter vasogenes (focus organicus in regione nucleorum basalem susp.)*. *Ischaemia cerebri reversibilis in reg. vasc. a. cerebri mediae sin. subs. hemiparesi dextra cum aphasia transitoria recidivans. Status post operationem mammae sinistrae. Morbus neoplasmaticus generalisatus susp. Ascites. Myocardopathia arteriosclerotica in stadio insufficientiae circulatoriae.*

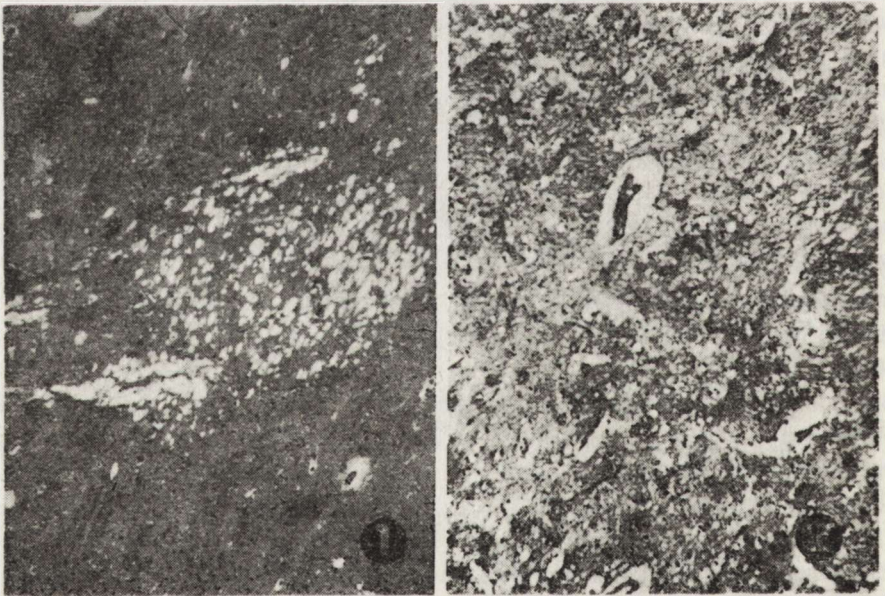
Sekcja ogólna wykazała: miażdżycę uogólnioną dużego stopnia, zapalenie płuc i oskrzeli oraz liczne ropnie wątroby. W badaniu histopatologicznym nie stwierdzono ropni wątroby, stwierdzono natomiast obecność w wątrobie ognisk raka przerzutowego, z punktem wyjścia prawdopodobnie z usuniętego sutka (dr K. Filipowicz).

BADANIE NEUROPATHOLOGICZNE

Mózg po utrwaleniu w formalinie ważył 1410 g. Sekcja makroskopowa mózgu wykazała dyskretnie wyrażone cechy zaniku mózgu przy jednocześnie niepogrubiałych, spadniętych naczyniach podstawy zawierających jedynie pojedyncze blaszki miażdżycowe.

Do badania mikroskopowego pobrano skrawki z płata czołowego, ciemieniowego, skroniowego, obustronnie zwoje podstawy na wysokości głowy jądra ogoniastego oraz rozwinięte zwoje podstawy ze wzgórzem, śródmózgowie, most, opuszkę i mózdzek. Zastosowano barwienia: H—E, Klüvera—Barrery, PAS, PAS-dimedon, Bielschowsky'ego, Perlssa, Cajala.

Badanie mikroskopowe mózgu wykazało obecność rozległych zmian zwyrodnieniowych i opustoszeń komórkowych w zwojach podstawy. W części grzbietowo-boczno-tylnej prawej skorupy stwierdzono obecność pól martwiczych o charakterze martwicy gąbczastej bez odczynu glejowego (ryc. 1), natomiast z bardzo dyskretną proliferacją włócniczek na



Ryc. 1. Ognisko martwicy gąbczastej w prawej skorupie. H—E. Pow. 25 ×

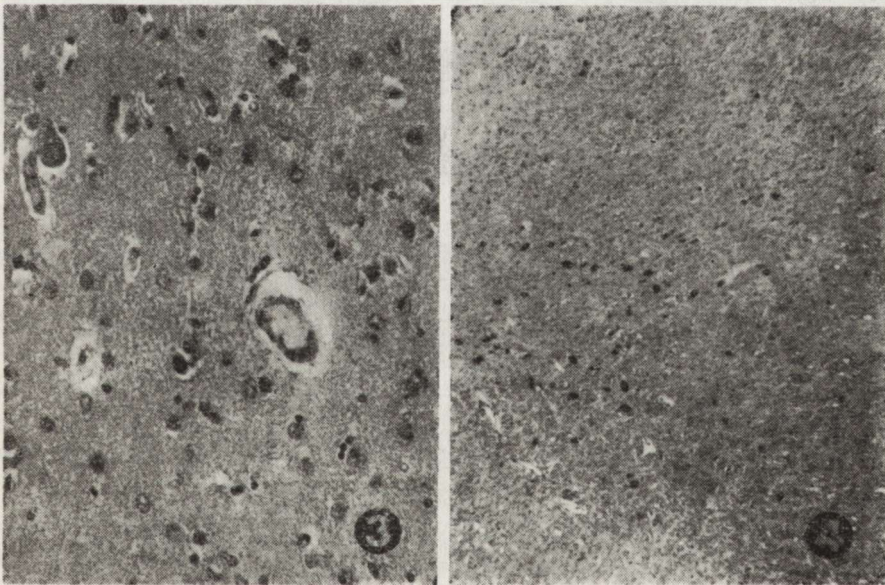
Fig. 1. Spongiotic necrosis in the right putamen. H—E. × 25

Ryc. 2. Pole martwicy niezupełnej w prawej skorupie. Klüver—Barrera. Pow. 100 ×

Fig. 2. Focus of uncompleted necrosis in the right putamen. Klüver—Barrera. × 100

obwodzie ogniska. Drobne, rozsiane martwice o podobnym charakterze stwierdzono w gałce bladej. W części przedniej prawej skorupy stwierdzono pole martwicy zawierające astrocyty odczynowe wśród bladej tkanki pozbawionej komórek nerwowych, z częściowo zachowanymi, uszkodzonymi pęczkami włókien mielinowych (ryc. 2). W pozostałych fragmentach zwojów podstawy obserwowano znacznego stopnia rozsiane opustoszenia komórkowe oraz znacznie nasilone zmiany zwyrodnieniowe komórek nerwowych o charakterze głównie zmian przewlekłych, rzadziej ischemicznych. Zmiany zwyrodnieniowe obserwowano głównie w skorupie, mniejsze nasilenie zmian występowało w gałce bladej i jądrze ogoniastym. Podobne zmiany zwyrodnieniowe, z przewagą stłuszczenia komórek, występowały w poszczególnych jądrach wzgórze. W przeciwieństwie do nasilenia zmian komórek nerwowych w zwojach podstawy glejoza była niewielka z obecnością nielicznych komórek gleju przejściowego i „nagich” jąder (ryc. 3).

Wokół wielu naczyń dochodziło do tworzenia mniej lub bardziej rozległych martwic i pustych jamek poroziękniennych. Drobne naczynia zwojów podstawy wykazywały pogrubienie ścian i ich zeszkliwienie, natomiast naczynia większe, a więc drobne tętniczki, nie miały nasilonych zmian przerostowych ścian.



Ryc. 3. Skorupa. Zmiany zwyrodnieniowe neurocytów oraz nieliczne komórki Alzheimer'a typ II. H—E. Pow. 200 ×

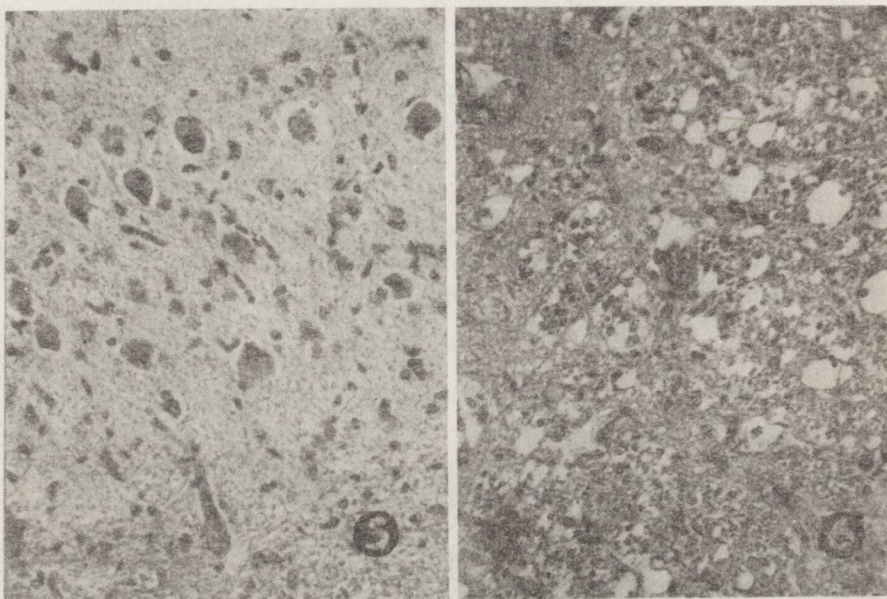
Fig. 3. Putamen. Degenerative changes of neurons and a few Alzheimer's cells type II. H—E. × 200

Ryc. 4. Ubytki komórkowe w j. miejsca sinawego oraz glejoza okołokomorowa H—E. Pow. 60 ×

Fig. 4. Loss of the cells in locus coeruleus and cellular gliosis around the ventricle. H—E. × 60

W śródmózgowiu istota czarna była prawidłowo zachowana z obecnością znacznej ilości zachowanej melaniny w neurocytach. W moście, w jądrze miejsca sinawego obecne były obustronnie ubytki komórkowe, drobne jamki z proliferacją astrocytów oraz pojedyncze skupienia barwnika leżącego pozakomórkowo (ryc. 4).

W opuszce jądra nerwów czaszkowych nie były uszkodzone, natomiast obserwowano znaczne stłuszczenie komórek nerwowych oliw dolnych z wyraźną glejozą astrocytarną i mikroglejową podścieliska (ryc. 5).



Ryc. 5. Zmiany zwyrodnieniowe neurocytów oraz pomnożenie komórek glejowych w oliwie dolnej. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 5. Degenerative changes of neurons and enhanced number of glial cells in the inferior olive. H—E. × 200

Ryc. 6. Martwica gąbczasta w rogu Amona, zmiany zwyrodnieniowe neuronów, glejoza komórkowa. H—E. Pow. 200 ×

Fig. 6. Spongiotic necrosis in the Ammon's horn, degenerative changes of neurons and cellular gliosis. H—E. × 200

W korze, zwłaszcza okolic centralnych, stwierdzono rozlane opustoszenia komórkowe oraz zmiany ischemiczne i przewlekłe zachowanych neuronów. W impregnacji srebrowej metodą Bielschowsky'ego uwidoczniły się pojedyncze płytki starcze w powierzchniowych warstwach kory mózgu oraz znaczne nagromadzenie neurofibrylli w neuronach.

W głębokich warstwach kory czołowej i ciemieniowej oraz na złączy korowo-podkorowym obserwowano niewielkie pola zgąbczenia tkanki bez wyraźnego odczynu glejowego. W poszczególnych okolicach kory mózgu występowała nieznaczna proliferacja gleju astrocytarnego, który w głębszych warstwach kory przybierał postać gleju przejściowego Stadlera

z niedużą domieszką komórek Alzheimerera typu II. Obserwowano też drobne pasma martwicy warstwowej w korze wyspy i w rogu Amona (ryc. 6). W istocie białej podkorowej stwierdzono obecność zmian obrzękowych, głównie okołonaczyniowych z pojawianiem się niekiedy odczynu astrocytarnego, bądź też barwnika krwiopochodnego.

W mózdku stwierdzono niewielkie ubytki komórkowe i zmiany zwyrodnieniowe w warstwie komórek Purkinjego z towarzyszącą nasiloną proliferacją warstwy gleju Bergmanna.

OMÓWIENIE

Głównym punktem zainteresowań klinicznych, jak też bodźcem do przeprowadzenia szczegółowych badań neuropatologicznych w powyższym przypadku, były obserwowane ruchy mimowolne języka, a następnie zuchwy, których uporczywość doprowadziła do głębokich zaburzeń artykulacji i przyjmowania pokarmów. Nie obserwowano przy tym żadnych ruchów mimowolnych w obrębie górnej części twarzy czy też kończyn.

W poszukiwaniu patogennego czynnika dyskinezy u opisywanej chorej należy wziąć pod uwagę zarówno encefalopatię wątrobową w przebiegu przerzutów raka do wątroby, jak i możliwość samoistnej dyskinezy wieku podeszłego. Na podstawie obrazu klinicznego należy przyjąć, że typ ruchów występujących w tym przypadku różni się od dyskinez opisywanych w encefalopatiach wątrobowych, które krótko scharakteryzowano we wstępie pracy. Jako czynnik patogenny można także odrzucić krótkotrwałe przyjmowanie małych dawek fenytoiny.

W obrazie klinicznym zwraca uwagę, że zarówno ruchy języka, jak i zuchwy były wybitnie zlateralizowane i stereotypowe, co mogło sugerować większe lub wybiórcze uszkodzenie struktur OUN po jednej stronie. Znalazło to potwierdzenie w obrazie zmian morfologicznych stwierdzonych badaniem mikroskopowym. Zarówno bowiem ognisko martwicy gąbczastej, jak i martwicy niezupełnej, naczyniopochodnej występuje w obrębie skorupy prawej, przy czym jedno z nich w części grzbietowo-boczno-tylnej, drugie natomiast w części przedniej. Ta lokalizacja zmian morfologicznych i ich jednostronność sugerują związek uszkodzeń strukturalnych z charakterem oraz wystąpieniem ruchów mimowolnych.

Korelacja zmian strukturalnych z objawami klinicznymi poszczególnych postaci dyskinez nie zawsze daje wyniki potwierdzające zależność objawów klinicznych od uszkodzeń strukturalnych w mózgu. W encefalopatii wątrobowej, w której zwrócono uwagę na związek pojawienia się ruchów mimowolnych z uszkodzeniem zwojów podstawy, podkreślano występującą często trudność w przeprowadzeniu takiej korelacji (Victor i wsp. 1965). Finlayson i Superville (1981) usiłują wytłumaczyć ten fakt tym, że być może za dyskinezę odpowiedzialne są już pierwsze zmiany

czynnościowe neuronów mające później swój wykładnik morfologiczny w postaci zmian zwyrodnieniowych. Zmniejszenie się nasilenia dyskinez po lekach blokujących układ dopaminergiczny lub w mniejszym stopniu cholinergiczny przemawia za istotną rolą czynnościową neuroprzekazników (Pakkenberg, Fog 1974, Tolosa, Chi-Wan Lai 1979). Ostatnio opisano również korzystny wpływ leczniczy bromokryptyny podawanej w małych dawkach (Delwaide, Hurllet 1980). Można więc przypuszczać, że w początkowym okresie procesu patologicznego dochodzi do zaburzeń funkcjonalnych w obrębie prążkowie, tak jak to sugerują w chorobie Meige'a Tolosa i Chi-Wan Lai (1979). Do chwili obecnej nie jest jeszcze znany obraz neuropatologiczny tej choroby, stąd brak danych morfologicznych na potwierdzenie tego przypuszczenia.

Podobne trudności w skorelowaniu objawów klinicznych z obrazem morfologicznym stwierdzono w neuropatologicznych badaniach dyskinez polekowych, gdzie nawet przy nasilonych ruchach mimowolnych nie znaleziono istotnych uszkodzeń strukturalnych w mózgu (Hunter i wsp. 1968). Christensen i wsp. (1970) w grupie dyskinez polekowych i spontanicznych stwierdzili uszkodzenie istoty czarnej, współistniejące często z ogniskami rozmiękania w zwojach podstawy. Autorzy podkreślają jednak, że naczyniopochodne uszkodzenia zarówno j. ogonistego, jak i skorupy obecne były również w grupie kontrolnej u chorych bez dyskinez, a więc trudno tak zlokalizowane naczyniopochodne ognisko łączyć przyczynowo z klinicznymi objawami ruchów mimowolnych. Ponadto ocena i interpretacja zmian w istocie czarnej u osób starszych jest możliwa tylko przy znacznie nasilonych, ogniskowych bądź charakterystycznych zmianach patologicznych.

Kameyama i wsp. (1974) oraz Narabayashi i wsp. (1979) w przebadanych przez siebie przypadkach dyskinez starczych — stwierdzili obecność drobnych, naczyniopochodnych ognisk martwicy w głowie jądra ogonistego lub jego bliskim otoczeniu. Natomiast Appenzeller i Biehl (1968) wiążą pojawienie się ruchów mimowolnych nie z uszkodzeniem zwojów podstawy, ale z zaobserwowanymi przez siebie zmianami w robaku i przylegających strukturach środkowych mózdzku.

Na podstawie powyższych rozbieżnych danych co do lokalizacji uszkodzeń w mózgu w dyskinezach najśluszniesze wydaje się przyjęcie hipotezy, że za dyskinezy odpowiedzialne są uszkodzenia morfologiczne i czynnościowe struktur prążkowie i dróg łączących prążkowie z innymi strukturami mózgu, co może z kolei modyfikować obraz kliniczny. Wytłumaczenie wzajemnych połączeń morfologicznych i czynnościowych można znaleźć w wynikach badań doświadczalnych prowadzonych na zwierzętach. Wiadomo bowiem, że w obrębie poszczególnych struktur zaliczanych do zwojów podstawy prześledzić można podobną organizację somatotopową, jaka występuje w obrębie kory mózgu (DeLong 1972, Künzle

1975). Prawdopodobnie w przypadkach masywnego uszkodzenia zwojów podstawy w ogniskach naczyńopochodnych w mózgu nie występują ruchy mimowolne, nie dochodzi bowiem do wybiórczego uszkodzenia tych jąder i dróg nerwowych, od których zależy pojawienie się dyskinez. Z kolei częste uszkodzenia kory mózgowej i prawdopodobnie uszkodzenie dróg korowo-prążkowiowych obserwowane w encefalopatiach wątrobowych czy w mózгах ludzi starych może mieć decydujące znaczenie dla wystąpienia dyskinez.

Na podstawie objawów klinicznych i badania mikroskopowego można uważać, że bezpośrednią przyczyną powstania dyskinezy u opisanej chorej było uszkodzenie strukturalne w obrębie prawej skorupy, na które dodatkowo nałożyły się niewielkie zmiany morfologiczne o typie encefalopatii wątrobowej. Obserwowane ponadto zmiany, takie jak martwica warstwowa kory Amona czy uszkodzenie oliw dolnych łączyć można z wtórnie istniejącą hipoksją i hipoglikemią. Zwraca przy tym uwagę niewielki stopień zaawansowania zmian starczych oraz prawidłowy obraz morfologiczny istoty czarnej, przy jednoczesnym uszkodzeniu jądra miejsca sinawego. Być może również te czynniki dodatkowo modyfikowały przebieg choroby i obserwowaną symptomatologię.

НЕВРОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТИНА УСИЛЕННОЙ ЯЗЫКО-ЛИЦЕВОЙ ДИСКИНЕЗИИ

Резюме

Авторы приводят случай 75-летней больной с симптомами усиленной языко-лицевой dyskinezii и сопровождающей ее энцефалопатией при метастазе новообразования печени. В нейропатологическом исследовании было обнаружено наличие очагов некрозов в правой скорлупе и слабо выраженные, типичные для печеночной энцефалопатии, морфологические изменения. Обсуждается причинная связь между морфологическим повреждением отдельных структур ЦНС и симптомами языко-лицевой dyskinezii.

NEUROPATHOLOGICAL PICTURE OF INTENSIVE LINGUO-FACIAL DYSKINESIA

Summary

The authors described the case of a 75-year-old woman with symptoms of linguo-facial dyskinesia and liver dysfunction caused by cancer metastases.

Neuropathological study revealed the necrotic foci and degenerative changes in the basal ganglia. Moreover, slightly expressed morphological changes, typical of hepatic encephalopathy were observed too. Interrelation between the morphological damage of particular structures in the CNS and the clinical dyskinesic symptoms is discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. Altrocchi P. H., Alto P.: Spontaneous oral-facial dyskinesia. *Arch. Neurol.*, 1972, 26, 506—512.
2. Appenzeller O., Biehl J. P.: Mouthing in the elderly: a cerebellar sign. *J. neurol. Sci.*, 1968, 6, 249—260.
3. Bruyn G. W.: Huntington's chorea. W: *Handbook of Clinical Neurology*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn. Amsterdam 1968, vol. 6, 298—378.
4. Chase T. N., Tamminga C. A.: Dopamine and GABA agonists in the treatment of hyperkinetic extrapyramidal disorders. W: *Advances in Neurology*. Red. L. J. Poirier, T. L. Sourkes, P. J. Bédard. Raven Press, New York 1979, vol. 24, 379—386.
5. Christensen E., Møller J. E., Faurbye A.: Neuropathological investigation of 28 brains from patients with dyskinesia. *Acta psychiat. scand.*, 1970, 46, 14—23.
6. De Long M. R.: Activity of basal ganglia neurons during movement. *Brain Res.*, 1972, 40, 127—135.
7. Delwaide P. J., Desseilles M.: Spontaneous buccolinguofacial dyskinesia in the elderly. *Acta neurol. scand.*, 1977, 56, 256—262.
8. Delwaide P. J., Hurlet A.: Bromocriptine and buccolinguofacial dyskinesias in patients with senile dementia. *Arch. Neurol.*, 1980, 37, 441—443.
9. Faurbye A.: The structural and biochemical basis of movement disorders in treatment with neuroleptic drugs and in extrapyramidal diseases. *Comprehensive Psychiat.*, 1970, 11, 205—225.
10. Finlayson M. H., Superville B.: Distribution of cerebral lesions in acquired hepatocerebral degeneration. *Brain*, 1981, 104, 79—95.
11. Hunter R., Blackwood W., Smith M. C., Cumings J. N.: Neuropathological findings in three cases of persistent dyskinesia following phenothiazine medication. *J. neurol. sci.*, 1968, 7, 763—773.
12. Hurwitz L. J., Montgomery A. D.: Persistent choreo-athetotic movements in liver disease. *Arch. Neurol.*, 1965, 13, 421—426.
13. Kameyama M., Yamanouchi H., Suda E., Togi H., Inoue S.: Oral dyskinesia in the aged. *Saishin Igaku (Modern Med.)*, 1974, 29, 290—298.
14. Klawans H. L.: Therapeutic approaches to neuroleptic-induced tardive dyskinesias. W: *The Basal Ganglia*. Red. M. D. Yahr. Raven Press, 1976, 447—457.
15. Künzle H.: Bilateral projections from precentral motor cortex to the putamen and other parts of the basal ganglia. An autoradiographic study in *Maccaca fascicularis*. *Brain Res.*, 1975, 88, 195—209.
16. McLellan D. L., Swash M.: Choreo-atherosis and encephalopathy induced by phenytoin. *Brit. med. J.*, 1974, 2, 204—205.
17. Narabayashi H., Chida T., Kondo T.: Analysis of two factors influencing involuntary movement: psychological stress effect and motor effect. W: *Advances in Neurology*. Red. L. J. Poirier, T. L. Sourkes, P. J. Bédard. Raven Press, New York, 1979, vol. 24, 361—371.
18. Nielubowiczowa H., Tarnawska S.: Problemy kliniczne encefalopatii po zespoleniu żyły wrotnej z żyłą główną dolną. *Neurol. Neurochir. Pol.*, 1973, 7, 171—176.
19. Pakkenberg H., Fog R.: Spontaneous oral dyskinesia. *Arch. Neurol.*, 1974, 31, 352—353.
20. Simpson G. M., Kline N. S.: Tardive dyskinesia: manifestations, incidence,

etiology and treatment. W: The Basal Ganglia. Red. M. D. Yahr. Raven Press, New York, 1976, 427—432.

21. Tolosa E. S.: Clinical features of Meige's Disease (Idiopathic orofacial dystonia). Arch. Neurol., 1981, 38, 147—151.
22. Tolosa E., Chi-Wan Lai: Meige disease: striatal dopaminergic preponderance. Neurology, 1979, 29, 1126—1130.
23. Victor M., Adams R. D., Cole M.: The acquired (non-Wilsonian) type of chronic hepatocerebral degeneration. Medicine, 1965, 44, 345—396.

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

LESŁAW J. MAZIARZ, JÓZEF SZCZECH

ZMIANY MORFOLOGICZNE I HISTOENZYMATYCZNE W MÓZGU
MŁODYCH I DOJRZAŁYCH SZCZURÓW
PO PODAWANIU CCNU (LOMUSTINE) *

Zakład Neuropatologii Akademii Medycznej, Poznań

CCNU (1-/2-chloroetylo/-3-cykloheksylo-1-nitrozomocznik) jest cytostatykiem, który wskutek właściwości alkilujących zaburza syntezę DNA (Goth, Rajewsky 1972; Jensen, Reed 1978) oraz syntezę białek (Cheng i wsp. 1972; Abakumowa i wsp. 1974). Podobnie jak inne pochodne nitrozomocznika, związek ten łatwo rozpuszcza się w lipidach i łatwo przechodzi do płynu mózgowo-rdzeniowego (Walker, Hilton 1976), dlatego coraz powszechniej stosowany jest w chemioterapii nowotworów mózgu (Heiss i wsp. 1978; Hochberg i wsp. 1979; Cianfriglia i wsp. 1980).

Badania doświadczalne nad toksycznym działaniem leku (Carter, Newman 1968) dowiodły dużej wrażliwości wątroby, tkanek krwiotwórczych i przewodu pokarmowego na CCNU. Nie obserwowano natomiast oddziaływania neurotoksycznego, pomimo podawania dużych dawek leku.

Chociaż lek uważa się za nieszkodliwy dla układu nerwowego (Young, Posner 1979), właściwości biochemiczne, a zwłaszcza szczególne powinowactwo tego związku do lipidów, zadecydowały o podjęciu niniejszej pracy.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na młodych i dojrzałych szczurach rasy Wistar obojga płci. Zwierzętom podawano lek w zawieszynie olejowej, dożołądkowo za pomocą zgłębnika.

Wielkość pojedynczych dawek cytostatyku obliczano proporcjonalnie do wielkości powierzchni ciała na podstawie dawek stosowanych u ludzi (Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska 1978).

Pierwszą grupę doświadczalną stanowiły młode szczury masy około 20 g, którym podawano cytostatyk w dawce 0,25 mg dwukrotnie, tj. w 5 i 12 dniu życia. W 19 dniu życia zwierzęta uśmiercano w narkozie eterowej przez przecięcie serca i wykrwawienie.

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4.05.3.3.

Drugą grupę doświadczalną stanowiły szczury dojrzałe o masie ciała około 360 g, którym podawano CCNU czterokrotnie w odstępach 7-dniowych ($3 \times 2,5$ mg; $1 \times 5,0$ mg). Po upływie 7 dni od zakończenia podawania CCNU zwierzęta uśmiercano w sposób analogiczny jak szczury z grupy I.

Materiałem do badań były mózgowia utrwalane w płynie Bakera przez 16 godz. w temperaturze 4°C . Mózgowia przeznaczone do badań morfologicznych zatapiano w parafinie, cięto na skrawki grubości 7 mikronów i barwiono według metody Nissla oraz hematoksyliną i eozyną. Mózgowia przeznaczone do badań histoenzymatycznych cięto na mikrotomie mroźeniowym i na skrawkach oznaczano aktywność następujących enzymów: hydrolazy estrów karboksylowych (nieswoistej esterazy — NsE) (E.L. * 3.1.1.1.), według metody Nachlasy i Seligmanna (1949), inkubacja 15 min w temperaturze 37°C ; hydrolazy acetylocholinyl (acetylocholinoesterazy — AChE) (E.L. 3.1.1.7), według metody Gerebtzoffa (1953), inkubacja 120 min w temperaturze 37°C ; acetylohydrolazy acylocholinyl (cholinoesterazy — ChE) (E.L. 3.1.1.8.), według metody Gerebtzoffa (1953), inkubacja 180 min w temperaturze 37°C ; fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych (fosfatazy zasadowej — FZ) (E.L. 3.1.3.1.), według metody Gomoriego (1953), inkubacja 30 min w temperaturze 37°C ; fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych (fosfatazy kwaśnej — FK) (E.L. 3.1.3.2.), według metody Gomoriego (1953), inkubacja 50 min w temperaturze 37°C ; fosfohydrolazy ATP (ATPazy) (E.L. 3.6.1.3.), według metody Wachsteina i Meisela (1957), inkubacja 45 min w temperaturze 37°C ; fosfohydrolazy pirofosforanu tiaminy (TPPazy) (E.L. 3.6.1.6.), według metody Novikoffa i Goldfischera (1961), inkubacja 30 min w temperaturze pokojowej.

W I grupie doświadczalnej (szczury młode) nie oznaczano aktywności NsE, AChE, ChE i FZ z powodu bardzo słabej reakcji enzymatycznej w odpowiedniej wiekowo grupie kontrolnej.

Jako zwierzęta kontrolne służyły szczury odpowiadające wiekiem zwierzętom doświadczalnym. Podawano im dożołądkowo olej jadalny. Mózgowia zwierząt kontrolnych poddawano takiej samej procedurze, jak mózgowia zwierząt doświadczalnych.

WYNIKI

Zmiany morfologiczne

I Grupa doświadczalna

Na wszystkich ocenianych przekrojach mózgowia obserwuje się zmiany neuronalne zwyrodnieniowe lub martwicze, o zróżnicowanym nasileniu. Zmiany zwyrodnieniowe polegają przede wszystkim na obkurczeniu i ciemnym wybarwianiu się neuronów z charakterystycznym pofał-

* E.L. — enzyme list (Florin, Stotz 1973)

dowaniem ich dendrytów (ryc. 1). Obok zmian zwyrodnieniowych typu schorzenia przewlekłego Nissla obserwuje się także komórki nerwowe z cechami obrzmienia, o zaokrąglonym kształcie z drobnoziarnistym rozpadem i rozproszeniem substancji Nissla. Poza zmianami neuronalnymi typu schorzenia przewlekłego i obrzmienia, w niektórych neurocytach obserwuje się wodniczki i niekiedy cechy neuronolizy.

W niektórych okolicach mózgu wokół tak zmienionych neurocytów spotyka się rozrost komórek glejowych o charakterze satelitozy (ryc. 2). Zmiany neurocytów o typie schorzenia przewlekłego Nissla występują w korze czołowej, ciemieniowej, skroniowej, jądrze migdałowatym i jądrze siatkowatym wzgórza. Natomiast wakuolizacja neurocytów i zmiany rozplywne najsilniej wyrażone są w korze węchomózgowia, w polu CA₂ i CA₃ kory amonalnej oraz w jądrach wzgórza przednim grzbietowym i środkowym. Rozplem oligodendrogleju jest największy w korze węchomózgowia.

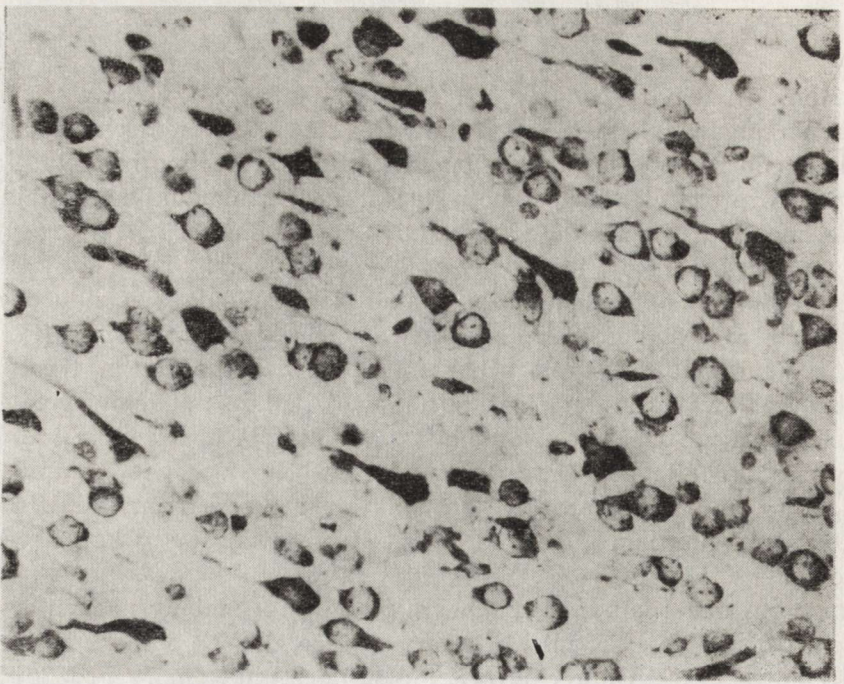
Zmianom neuronalnym i glejowym towarzyszą zmiany naczyniowe — rozplem i obrzmienie śródbłonek oraz świeże, drobne ogniska wynacynienia w korze zakrętu obręczy (ryc. 3), w otoczeniu komory bocznej i we wzgórzu.

W korze mózdzku zwracają uwagę liczne, wyraźnie obkurczone, ciemno wybarwiający się komórki Purkinjego, obok rzadziej występujących zmian homogenizacyjnych. Między tak zmienionymi komórkami Purkinjego widoczny jest umiarkowany wzrost liczby komórek gleju Bergmanna. Należy podkreślić, że patologicznie zmienione komórki Purkinjego występują w większości zakrętów mózdzku. W korze mózdzku obecne są również naczynia krwionośne, których śródbłonek wykazuje cechy rozplemu i obrzmienia. W niektórych zakrętach, w warstwie drobinowej lub ziarnistej, jak również w istocie białej widać drobne ogniska krwotoczne (ryc. 4).

II Grupa doświadczalna

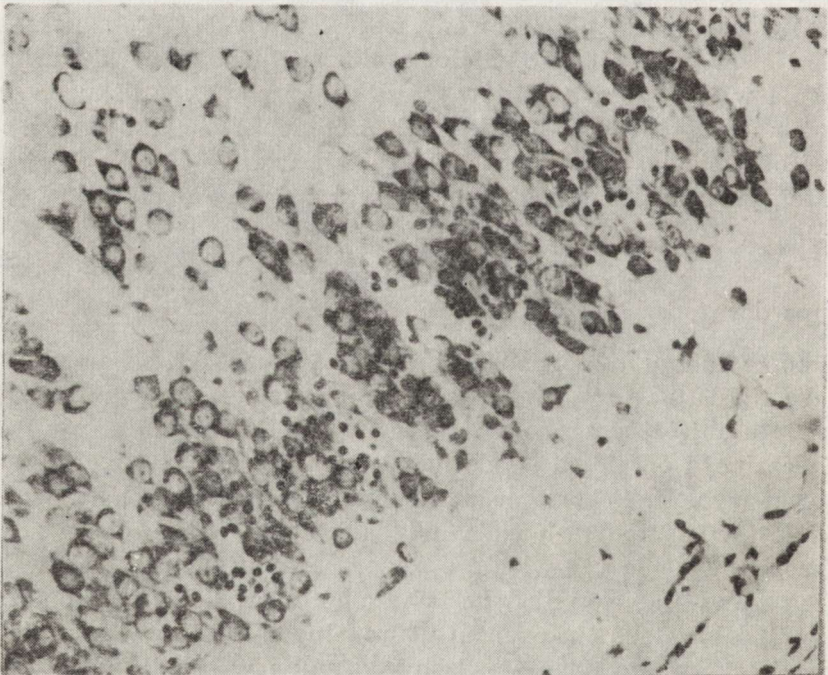
W korze mózgu część neurocytów wykazuje cechy schorzenia przewlekłego Nissla, najsilniej wyrażone w komórkach piramidowych. Obszar kory mózgu objętej tym schorzeniem jest znacznie mniejszy niż w I grupie doświadczalnej i ogranicza się do niewielkich pól kory czołowej oraz ciemieniowej (ryc. 5). Schorzenie neuronalne o podobnym charakterze widoczne jest w neurocytach ciała migdałowatego, gdzie obok komórek o cechach schorzenia przewlekłego widoczne są w neurocytach wakuole, a także rozplywanie się pojedynczych komórek. W korze węchomózgowia i ciała migdałowatego obok zmian neuronalnych widać zwiększenie ilości oligodendrocytów. Podobne zjawisko występuje w spidle wielkim.

Zmiany naczyniowe w postaci rozplemu i obrzmienia śródbłonek występują tylko w niektórych naczyniach krwionośnych kory i istoty białej mózgu w płatach czołowych i ciemieniowych.



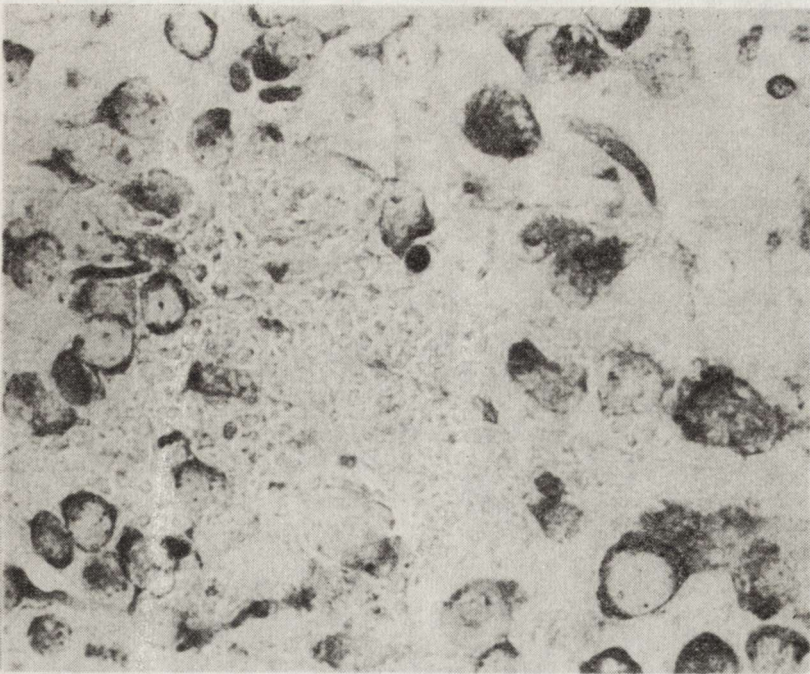
Ryc. 1. I grupa doświadczalna. Kora skroniowa. Neurocyty o cechach schorzenia ischemicznego i przewlekłego. Fiolet krezyłu. Pow. 300 ×

Fig. 1. I experimental group. Temporal cortex. Ischemic and chronic neurocytopathy. Cresyl violet. × 300



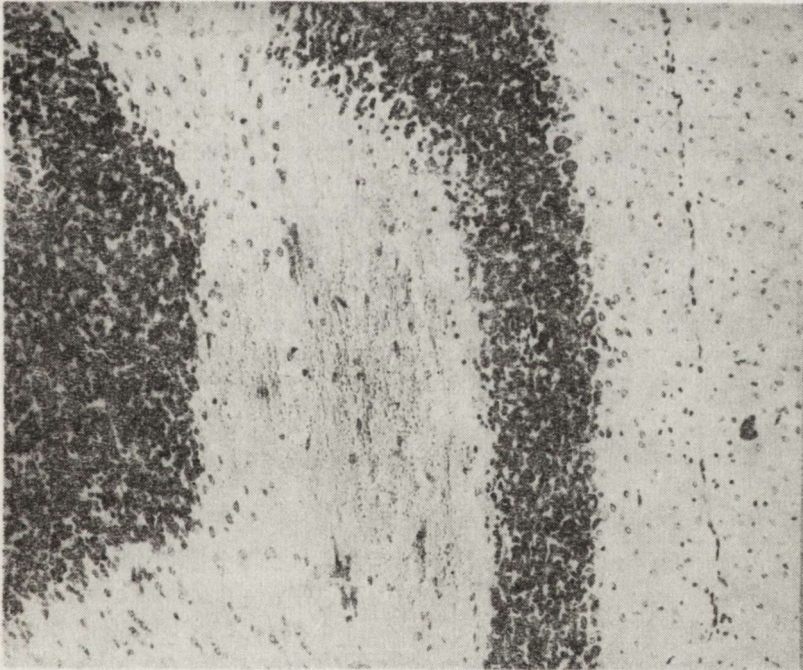
Ryc. 2. I grupa doświadczalna. Kora węchomózgowa. Rozrost oligodendrogleju o charakterze satelitozy. Fiolet krezyłu. Pow. 300 ×

Fig. 2. I experimental group. Entorhinal cortex. Satellitosis of oligodendroglia. Cresyl violet. × 300



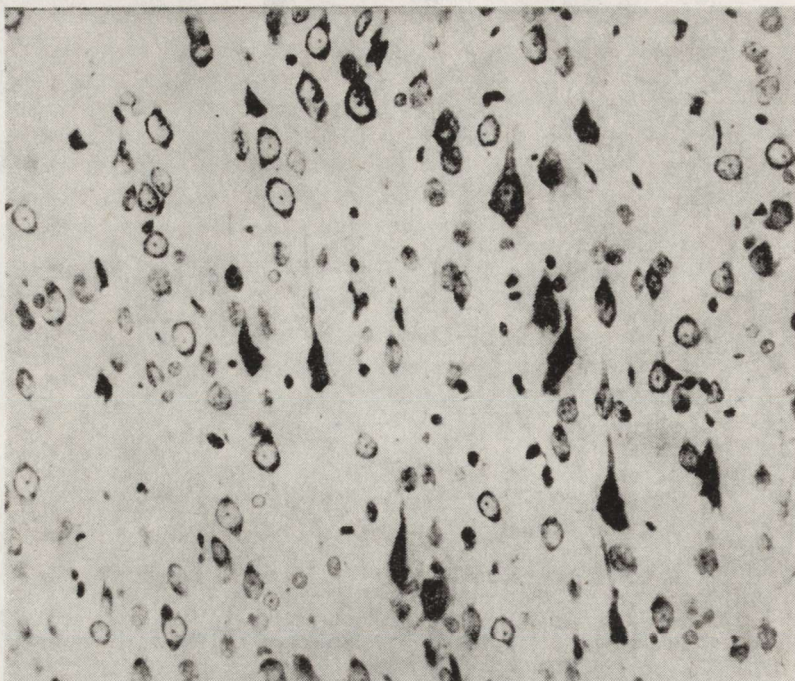
Ryc. 3. I grupa doświadczalna. Kora zakrętu obręczy. Ognisko krwotoczne. W otoczeniu ogniska neurocyty ze zmianami wodniczkowymi i rozplywnymi. Fiolet krezyłu. Pow. 750 ×

Fig. 3. I experimental group. Cingular cortex. Hemorrhagic focus and vacuolisation and liquefaction of neurocytes. Cresyl violet. × 750



Ryc. 4. I grupa doświadczalna. Ognisko krwotoczne w istocie białej mózdzku. Fiolet krezyłu. Pow. 38 ×

Fig. 4. I experimental group. Hemorrhagic focus in the white matter of cerebellum. Cresyl violet. × 38



Ryc. 5. II grupa doświadczalna. Kora ciemieniowa. Obkurczone neurocyty i opustoszenia neuronalne. Fiolet krezyłu. Pow. 240 ×

Fig. 5. II experimental group. Parietal cortex. Shrinkage and loss of some neurocytes. Cresyl violet. × 240

W korze mózdzku zdecydowana większość komórek Purkiniego wykazuje cechy schorzenia homogenizacyjnego, a tylko pojedyncze komórki są obkurczone. Zmianom zwyrodnieniowym komórek Purkiniego towarzyszy silnie wyrażony rozplem gleju Bergmanna.

Podsumowując opisane powyżej zmiany patologiczne można stwierdzić, że w I grupie doświadczalnej (szczury młode) przeważają zmiany rozplywne neuronów, podczas gdy w grupie szczurów dojrzałych dominują zmiany o charakterze schorzenia przewlekłego. Odczyn oligodendrogleju i zmiany naczyniowe są silniej wyrażone u szczurów młodych niż dojrzałych.

Zmiany histoenzymatyczne

I Grupa doświadczalna

Fosfataza kwaśna (FK). U zwierząt poddanych działaniu CCNU stwierdza się uogólniony spadek aktywności FK. W większości komórek piramidowych rogu Amona występuje obniżenie aktywności FK, jedynie w polu CA₁ obserwuje się pojedyncze komórki wykazujące wysoką aktywność enzymu. W preparatach barwionych metodą Nissla komórki te wykazują cechy schorzenia przewlekłego. Również w splotach naczyniówkowych aktywność FK jest mniejsza niż w grupie kontrolnej.

Adenozynotrójfosfataza (ATPaza). Bardzo silna aktywność w grupie kontrolnej widoczna jest przede wszystkim w splotach naczyńkowych. Umiarkowaną aktywność enzymatyczną przejawiają wszystkie naczynia krwionośne, zarówno w korze, jak i w zwojach podstawy. W rogu Amona i w zwojach podstawy, obok aktywności w ścianach naczyń krwionośnych, silnie dyfuzyjny odczyn występuje w przynaczyniowych wypustkach astrocytów. Pod wpływem podawanego cytostatyku dochodzi do spadku aktywności ATPazy w ścianach naczyń. W astrogleju nie obserwuje się odczynu enzymatycznego.

Fosfohydrolaza pirofosforanu tiaminy (TPPaza). W grupie kontrolnej umiarkowaną aktywność enzymatyczną TPPazy stwierdza się głównie w ścianach naczyń, w komórkach piramidowych kory mózgu (ryc. 6) i w warstwie komórek piramidowych kory amonalnej. W obu grupach doświadczalnych obserwuje się delikatny wzrost aktywności TPPazy w neurocytach (ryc. 7) i w gleju kory mózgu, jak również w komórkach piramidowych pól CA₂ i CA₃ kory amonalnej.

II Grupa doświadczalna

Esteraza nieswoista (NsE). W grupie kontrolnej silną reakcję obserwuje się w perycytach naczyń krwionośnych i słabą aktywność w perykarionach neurocytów kory (ryc. 8). Silny odczyn wykazują sploty naczyńkowe. Oligodendroglej spoidła wielkiego wykazuje średnią aktywność. W korze amonalnej zarówno w komórkach piramidowych, jak i w opasce zębatej, widać delikatny odczyn w postaci drobnych ziarenek. Wyraźną aktywność enzymatyczną przejawiają komórki Purkiniego kory mózdzku, przy średniej aktywności w komórkach ziarnistych.

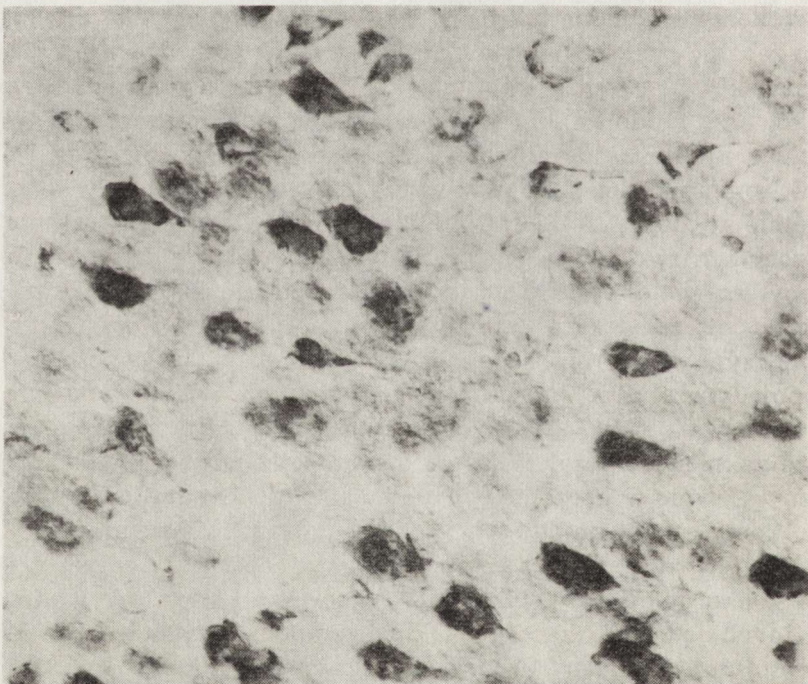
U zwierząt doświadczalnych dochodzi do wyraźnego wzrostu aktywności w komórkach piramidowych kory mózgu (ryc. 9) i kory amonalnej, szczególnie w polu CA₂ i CA₃, płycie końcowej i opasce zębatej oraz w neurocytach zwojów podstawy. Zwiększa się nieco aktywność w oligodendrocytach spoidła wielkiego i w komórkach Purkiniego kory mózdzku.

Acetylocholinoesteraza (AChE). W grupie kontrolnej występuje dyfuzyjny odczyn w neuropilu kory mózgu. Wyraźną aktywność wykazują tylko pojedyncze tzw. hiperaktywne neurocyty. Nieco większą aktywność, aczkolwiek również o charakterze dyfuzyjnym, obserwuje się w korze zakrętu obręczy. W korze amonalnej odczyn enzymatyczny jest widoczny głównie w początkowych odcinkach dendrytów, częściowo w aksonach komórek piramidowych, podczas gdy perykarion nie wykazuje aktywności. W zwojach podstawy silną aktywność enzymatyczną stwierdza się w skorupie i gałce bladej. Zróznicowany odczyn występuje w poszczególnych jądrach wzgórza i jądrach zespołu migdałowatego. W mózdzku obserwuje się słaby dyfuzyjny odczyn w warstwie ziarnistej i niekiedy w delikatnych wypustkach otaczających komórki Purkiniego, których perykariony nie wykazują aktywności. Słaby dyfuzyjny odczyn występuje również w blaszkach rdzennych istoty białej. W moście silną



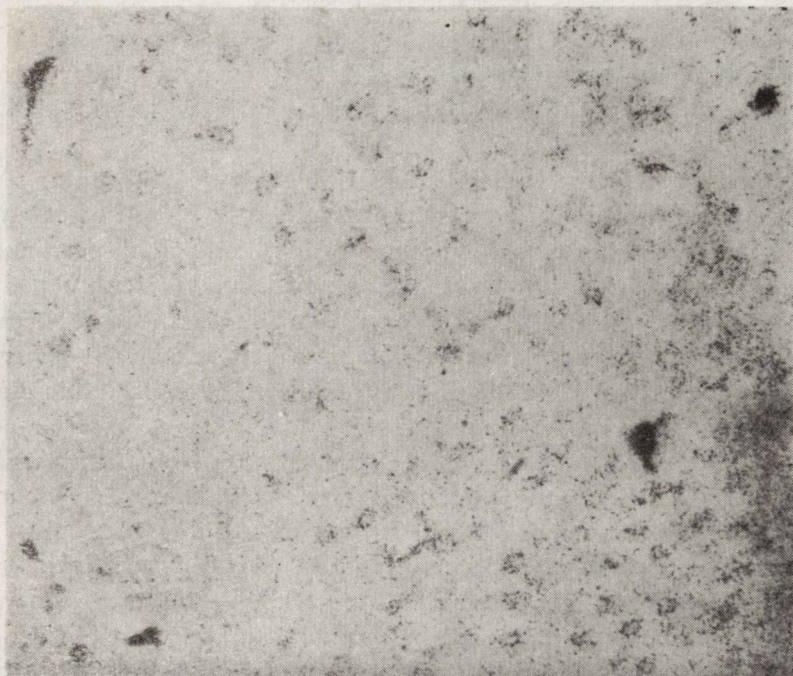
Ryc. 6. Grupa kontrolna. Kora ciemieniowa. Umiarkowana aktywność TPPazy w cytoplazmie neurocytów III warstwy kory. Pow. 470 ×

Fig. 6. Control group. Parietal cortex. Moderate TPPase activity in cytoplasm of neurocytes from III-rd cortex layer. × 470

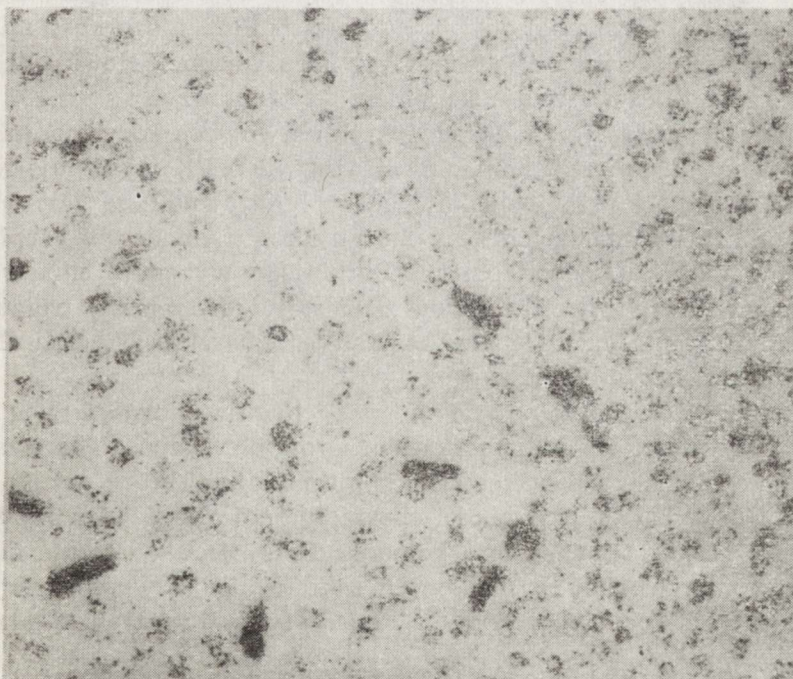


Ryc. 7. I grupa doświadczalna. Kora ciemieniowa. Nieznaczne zwiększenie aktywności TPPazy w cytoplazmie neurocytów III warstwy kory. Pow. 470 ×

Fig. 7. I experimental group. The increase of TPPase activity in cytoplasm of neurocytes from III cortex layer. × 470



Ryc. 8. Grupa kontrolna. Kora ciemieniowa. Widoczna silna aktywność NsE w pericytach oraz słaba aktywność w neurocytach II i III warstwy kory. Pow. 140 ×
Fig. 8. Control group. Parietal cortex. Strong nonspecific esterase activity in pericytes of II and III cortex layers. × 140



Ryc. 9. II grupa doświadczalna. Kora ciemieniowa. Wzrost aktywności NsE w neurocytach wszystkich warstw kory. Pow. 140 ×
Fig. 9. II experimental group. Parietal cortex. The increase of nonspecific esterase activity in neurocytes of all cortex layers. × 140

aktywność enzymatyczną wykazują niektóre neurocyty jąder przedśionkowych, podobnie intensywny odczyn występuje w istocie siatkowatej mostu.

W grupie poddanej działaniu CCNU obserwuje się znaczny spadek aktywności enzymatycznej na całym obszarze kory mózgu i kory amonalnej. W spoidle wielkim, podobnie jak w grupie kontrolnej, poza naczyniami brak aktywności enzymatycznej. W mózdzku, w wyniku podawania cytostatyku, stwierdza się brak odczynu enzymatycznego w komórkach II warstwy, a w warstwie ziarnistej i blaszkach rdzennych istoty białej występuje odczyn bardzo delikatny, dyfuzyjny. Podobnie w moście zwraca uwagę spadek aktywności enzymatycznej.

Cholinoesteraza (ChE). U zwierząt z grupy kontrolnej aktywność enzymatyczna ChE występuje głównie w ścianach naczyń krwionośnych; słabą, dyfuzyjną aktywność stwierdza się ponadto w neuropilu i pojedynczych neurocytach w jądrach przyśrodkowych i bocznych wzgórza. Również słaby dyfuzyjny odczyn wykazują komórki Purkiniego w korze mózdzku, a w moście neurocyty jądra nerwu twarzewego. Podawanie CCNU nie powoduje zmian w umiejscowieniu i nasileniu odczynu enzymatycznego.

Fosfataza zasadowa (FZ). W grupie kontrolnej najsilniejszy odczyn enzymatyczny obserwuje się w ścianach naczyńiowych. Wyraźny, aczkolwiek dyfuzyjny odczyn FZ, występuje w komórkach piramidowych kory amonalnej i czołowej oraz w komórkach Purkiniego kory mózdzku. Słabszą aktywność wykazują neurocyty kory wężomózgowia. W grupie doświadczalnej nie obserwuje się zmian aktywności FZ.

Fosfataza kwaśna (FK). W komórkach nerwowych kory mózgu i zwojów podstawy u zwierząt kontrolnych aktywność FK występuje w cytoplazmie w postaci różnej wielkości ziaren. Aktywność ta jest wyraźna w komórkach piramidowych kory mózgu i rogu Amona. W grupie kontrolnej w mózdzku tylko komórki Purkiniego wykazują silną reakcję, podczas gdy na obszarze warstwy ziarnistej i drobinowej widać słaby odczyn dyfuzyjny. Podobnie silna reakcja jest charakterystyczna dla neurocytów jądra nerwu twarzewego.

W grupie doświadczalnej na pierwszy plan wysuwa się uogólniony spadek aktywności FK w komórkach nerwowych. Zjawisko to występuje szczególnie intensywnie w komórkach piramidowych kory mózgu i rogu Amona. Nie wykazują aktywności enzymatycznej oligodendrocyty spoidła wielkiego. Natomiast większość komórek Purkiniego wykazuje dość intensywny odczyn, choć w niektórych zakrętach obserwuje się wyraźny spadek aktywności enzymatycznej. Neurocyty jądra nerwu twarzewego wykazują słabą aktywność.

Adenozynotrójfosfataza (ATPaza). W grupie kontrolnej aktywność enzymatyczna występuje głównie w ścianach naczyń, w przynaczyniowych

wypustkach astrocytów (ryc. 10), w niektórych oligodendrocytach spoidła wielkiego oraz w komórkach Purkiniego kory mózdzku.

Podawanie zwierzętom CCNU powoduje osłabienie aktywności tego enzymu w ścianach naczyń, w neurocytach kory i zwojów podstawy oraz w astrocytach (ryc. 11).

Pirofosfataza tiaminowa (TPPaza). W porównaniu z grupą kontrolną obserwuje się niewielki wzrost aktywności enzymatycznej zarówno w komórkach piramidowych kory mózgu, w polach CA₂ i CA₃ kory amonalnej, jak i w komórkach Purkiniego kory mózdzku. Nieco większy wzrost aktywności występuje w oligodendrogleju spoidła. Natomiast aktywność enzymatyczna w naczyniach jest podobna jak w grupie kontrolnej.

Podsumowanie zmian histoenzymatycznych zawiera Tabela 1.

Tabela 1. Zmiany aktywności enzymatycznej w mózgu młodych i dojrzałych szczurów po podaniu CCNU

Table 1. Changes of enzymatic activity in the brain of young and adult rats after CCNU treatment

	Enzymy Enzymes	Neurocyty Neurocytes	Neuroglej Neuroglia	Naczynia krwionośne Blood vessels
Grupa kontrolna szczury młode	FK	+++	+	0
Control group young rats	ATPaza	±	+	++
	TPPaza	+	+	++
I grupa doświadczalna szczury młode	FK	+	±	0
I experimental group young rats	ATPaza	±	±	+
	TPPaza	++	++	++
Grupa kontrolna szczury dojrzałe	NsE	+	+	+++
Control group adult rats	AChE	+	+	+
	ChE	+	+	+
	FZ	+	+	++
	FK	++	+	0
	ATPaza	±	++	+++
	TPPaza	++	+	++
II grupa doświadczalna szczury dojrzałe	NsE	+++	++	+++
II experimental group adult rats	AChE	±	0	±
	ChE	+	+	+
	FZ	+	+	++
	FK	+	±	0
	ATPaza	±	+	++
	TPPaza	+++	++	++

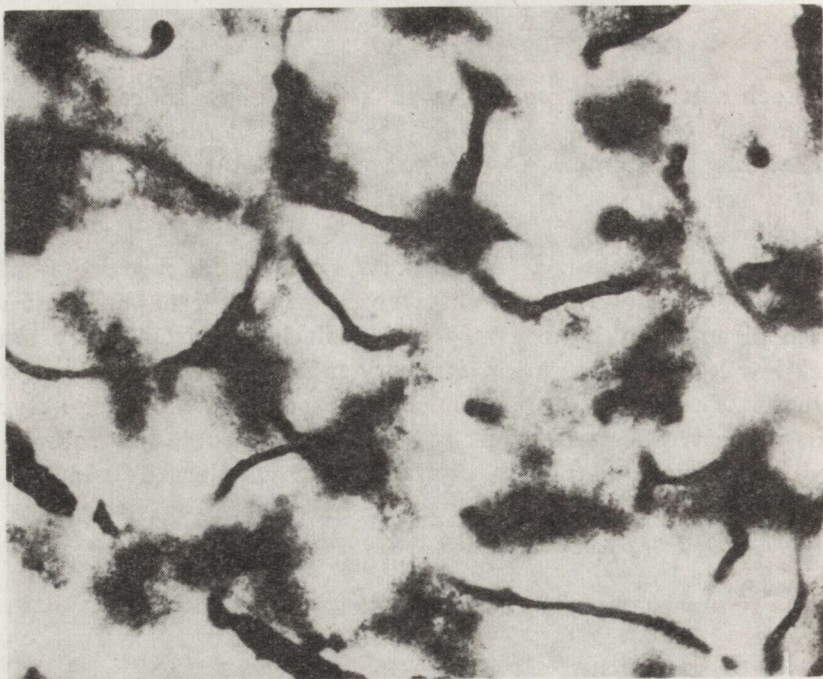
Objaśnienia: 0 = brak aktywności lack of activity

Expanations: ± = aktywność śladowa trace activity

+ = słaba weak

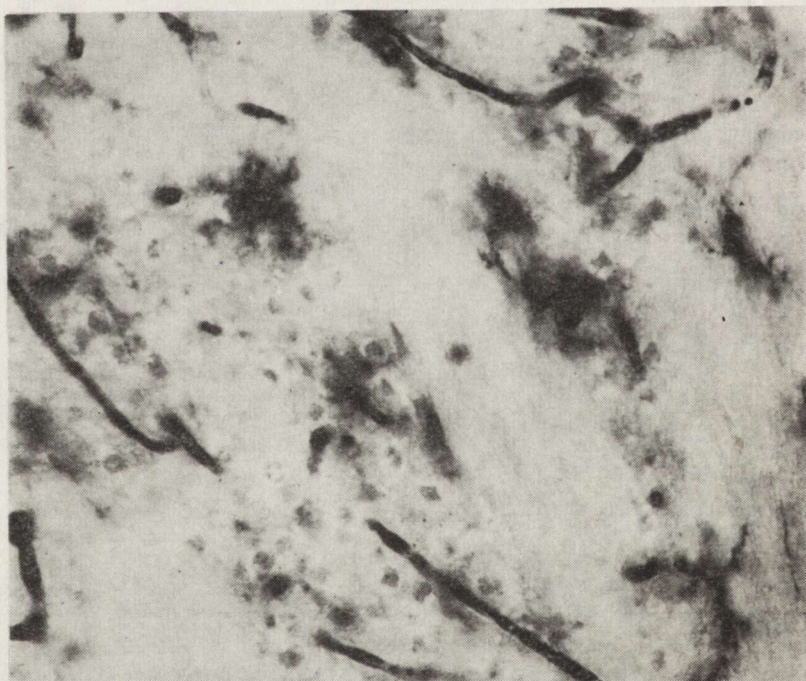
++ = umiarkowana moderate

+++ = silna strong



Ryc. 10. Grupa kontrolna. Jądro przednie grzbietowe wzgórza. Aktywność ATPazy w naczyniach krwionośnych i w gleju przynaczyniowym. Pow. 375 ×

Fig. 10. Control group. The anterior dorsal nucleus of the thalamus. ATPase activity in blood vessel walls and perivascular glia. × 375



Ryc. 11. II grupa doświadczalna. Jądro przednie grzbietowe wzgórza. Spadek aktywności enzymatycznej ATPazy w ścianach naczyń krwionośnych i w komórkach astrogleju. Pow. 375 ×

Fig. 11. II experimental group. The anterior dorsal nucleus of the thalamus. The decrease of ATPase activity in blood vessel walls and astroglial cells. × 375

OMÓWIENIE

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że dożołądkowe wprowadzanie CCNU prowadzi do zmian naczyniowych i do rozległych uszkodzeń komórek nerwowych.

Ze spostrzeżeń poczynionych w niniejszej pracy wynika, że zmiany patologiczne dotyczą przede wszystkim tkanki nerwowej młodych szczurów, które otrzymywały CCNU w 5 i 12 dniu życia. Zmiany te polegają na tigrolizie i wakuolizacji neuronów, odczynowym zwiększeniu liczby ligodendrocytów, rozplemie i obrzmieniu śródbłonek naczyń oraz wystąpieniu drobnych ognisk krwotocznych. Podobne zmiany, ale w odniesieniu do innych pochodnych nitrozomocznika, opisali De Wys i Fowler (1973) oraz Kraśnicka i Gajkowska (1981). Należy sądzić, że zmiany te stanowiące morfologiczny wykładnik obrzęku mózgu (Klatzo 1967) są spowodowane cytotoksycznym wpływem na tkankę nerwową CCNU lub aktywnych biologicznie produktów jego rozpadu.

Wyjaśnienie zjawiska szczególnej wrażliwości tkanki nerwowej u szczurów w okresie rozwoju pozapłodowego związane jest z patomechanizmem działania CCNU, który poprzez aktywne produkty rozpadu alkiluje nukleotydy wchodzące w skład kwasów nukleinowych (Nakamura i wsp. 1979). W ten sposób następuje zahamowanie syntezy RNA i DNA i zaburzenia w syntezie białek w dojrzewających komórkach nerwowych, co może prowadzić do zmian aktywności enzymatycznej. Ze względu na to, że alkilacja spowodowana cytostatykiem zachodzi we wszystkich typach komórek, włącznie z postmitotycznymi neuronami (Kleihues, Magee 1973; Bosch 1977; Szczech 1983), zmiany morfologiczne obserwuje się również u szczurów dorosłych, aczkolwiek w tej grupie zwierząt przeważają zmiany zwyrodnieniowe o charakterze schorzenia przewlekłego i o mniejszym topograficznie zasięgu.

Zmiany odczynów enzymatycznych mają podobny charakter i nasilenie w obu grupach doświadczalnych i polegają na zmniejszeniu aktywności fosfatazy kwaśnej i ATPazy oraz intensywniejszych odczynach na TPPazę. Może to wskazywać na podobny mechanizm działania CCNU lub jego metabolitów na układy enzymatyczne w strukturach komórkowych zarówno u młodych, jak i dojrzałych zwierząt. Należy podkreślić, że w przeprowadzonych doświadczeniach zmiany aktywności enzymatycznej są wyraźne, aczkolwiek mniejsze w porównaniu do zmian występujących w przebiegu innych intoksykacji (Katzman i wsp. 1963; Torack 1965; Wender i wsp. 1971; Kozik i wsp. 1977; Kozik, Wigowska-Sowińska 1978).

Uzyskane wyniki są zgodne ze spostrzeżeniami innych autorów (Magee, Farber 1962; Wender i wsp. 1981), którzy oddziaływanie środków alkilujących na enzymy cytoplazmatyczne uważają za efekt dodatkowy i drugorzędny. Najsilniej wyrażony jest spadek aktywności ATPazy w naczyniach krwionośnych i w przynaczyniowych wypustkach astrocytów, co wymaga oddzielnego omówienia.

Z dotychczasowych badań Wendera i wsp. (1969) wiadomo, że w okresie rozwoju ontogenetycznego obserwuje się narastanie w całym mózgowiu okołonaczyniowej aktywności ATPazy, równoległe do rozwoju wypustek okołonaczyniowych astrogleju; wysoka aktywność enzymu utrzymuje się również w dojrzałym mózgu. Spadek aktywności ATPazy w obu grupach doświadczalnych może być wynikiem bezpośredniego toksycznego oddziaływania cytostatyku na śródbłonki naczyniowe, co z kolei może powodować zwiększenie przepuszczalności ściany naczyniowej, a w dalszej konsekwencji doprowadzić do obserwowanych zmian neuronalnych. Za takim mechanizmem oddziaływania CCNU w przedstawionym modelu doświadczalnym przemawia nasilenie zmian u zwierząt młodych, u których układy enzymatyczne nie są w pełni dojrzałe.

WNIOSKI

1) Pod wpływem wielokrotnego podawania CCNU dochodzi do znacznych zmian morfologicznych i histoenzymatycznych w komórkach nerwowych.

2) Charakter morfologicznych zmian w komórkach nerwowych zależy od stopnia dojrzałości mózgowia — w grupie szczurów młodych przeważają zmiany rozplwne, zmiany neuronów i ich obrzmienie, a w grupie szczurów dojrzałych zmiany zwyrodnieniowe o typie schorzenia przewlekłego.

3) Po podaniu CCNU dochodzi do rozplemu oligodendrogleju i obrzmienia śródbłonek naczyń włosowatych. Zmiany te są wyraźniejsze w grupie szczurów młodych.

4) Zmianom neuronalnym i glejowym w mózgowiu młodych szczurów towarzyszą drobne ogniska krwotoczne.

5) CCNU powoduje wzrost aktywności enzymatycznej TPPazy oraz spadek aktywności enzymatycznej ATPazy, NsE, FK i AChE. Stopień nasilenia tych zmian jest niezależny od wieku zwierząt doświadczalnych.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В МОЗГЕ МОЛОДЫХ И ЗРЕЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ CCNU (LOMUSTINE)

Резюме

Исследования проводились на крысах породы Вистар, которым внутривенно вводили CCNU. Молодые крысы получали цитостатик в дозе 0,25 мг. двукратно, на 7 и 12 день жизни, а зрелые крысы — четырехкратно с семидневными интервалами (трехкратно по 2,5 и один раз 5,0 мг.). По истечении 7 дней после введения CCNU животных убивали и препаровали головной мозг для морфологических и гистоэнзиматических исследований.

Было обнаружено, что морфологические изменения были сильнее выражены в группе молодых крыс. Параллельно морфологическим изменениям наблюдался рост энзиматической активности ТПФазы и падение активности АТФазы, НЭ, КФ и АХЭ — величина изменений энзиматической активности была сходной в обеих исследуемых группах.

MORPHOLOGICAL AND HISTOENZYMATIC CHANGES IN THE BRAIN
OF YOUNG AND ADULT RATS AFTER CCNU (LOMUSTINE)
ADMINISTRATION

Summary

The studies were performed on young and adult rats treated intragastrically with CCNU suspended in olive oil.

Young rats received CCNU twice in 0.25 mg dose on the 7th and 12th day. Adult rats were given the drug in four doses at one-week intervals; the total dose was 12.5 mg. After 7 days from the end of the experiment the animals were killed and their brains removed and subjected to morphological and histoenzymatic investigations. CCNU caused changes in vascular walls, neurocytes and glial cells. Many hemorrhagic foci were visible in cerebral cortex, thalamus and cerebellum. The changes were more pronounced in the group of young rats.

An increase of TPPase activity and a decrease of nonspecific esterase, acid phosphatase and AChE activities were the major effects of CCNU action on the brain tissue. The histoenzymatic changes were similar in both experimental groups.

PIŚMIENNICTWO

1. Abakumova O. V., Igarova T. Y., Gorbacheva L.: Effect of N-methyl-N-nitrosourea on protein-synthesizing system in mouse liver and hepatoma 22 a cells. *Cancer Res.*, 1974, 34, 1592—1599.
2. Bosch D. A.: Short and long term effects of methyl- and ethylnitrosourea (MNU and ENU) on the developing nervous system of the rat. *Acta Neurol. Scand.*, 1977, 55, 85—105.
3. Carter S. K., Newman J. W.: Nitrosoureas: 1,3-bis-/2-chloroethyl/-1-nitrosourea (NSC-409962; BCNU) and 1-/2-chloroethyl/-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (NSC-79037; CCNU) — clinical brochure. *Cancer Chemother. Rep.*, 1968, 1, 115—151.
4. Cheng C. J., Fujimura S., Grunberger D., Weiwstein I. B.: Interaction of 1-/2-chloroethyl/-3-cyclohexyl-1-nitrosourea (NSC 79037) with nucleic acids and proteins *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.*, 1972, 32, 22—27.
5. Cianfriglia F., Pompili A., Riccio A., Grassi A.: CCNU-chemotherapy for hemispheric supratentorial glioblastoma multiforme. *Cancer Res.*, 1980, 45, 1289—1299.
6. De Wys W. A., Fowler E. H.: Vasculitis and blindness after intracarotid injection of 1,3-bis/2-chloroethyl-1-nitrosourea (BCNU) in dogs. *Cancer Chemother. Rep.*, 1973, 57, 33—40.
7. Goth R., Rajewsky M.: Ethylation of nucleic acids by ethylnitrosourea-1-¹⁴C in the fetal and adult rat. *Cancer Res.*, 1972, 32, 1501—1505.
8. Heiss W. D., Turnheim M., Mamoli B.: Combination chemotherapy of malignant glioma. Effect of postoperative treatment with CCNU, vincristine, amethopterin and procarbazine. *Eur. J. Cancer*, 1978, 14, 1191—1202.

9. Hochberg F. H., Linggood R., Wolfson L., Baker W. H., Kornblith P.: Quality and duration of survival in glioblastoma multiforme. Combined surgical radiation and Lomustine therapy. *JAMA*, 1979, 241—1016—1018.
10. Jensen D. E., Reed D. J.: Reaction of DNA with alkylating agents. Quantitation of alkylation by ethylnitrosourea of oxygen and nitrogen sites on poly (dA-aT) including phosphotriester formation. *Biochemistry*, 1978, 17, 5098—5107.
11. Katzman R., Alen F., Eilson C.: Further observations on triethyltin edema. *Arch. Neurol.*, 1963, 9, 178—184.
12. Klatzo I.: Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1967, 26, 1—14.
13. Kozik M. B., Szczech J., Sosiński E.: Zmiany histoenzymatyczne w mózgu w przebiegu doświadczalnej intoksykacji kalomelem. *Neuropat. Pol.*, 1977, 2, 239—253.
14. Kozik M. B., Wigowska-Sowińska J.: Cerebral changes in the course of intoxication with mercury phenylacetate. *Exper. Pathol.*, 1978, 16, 267—275.
15. Kleihues P., Magee P.: Inhibition of protein synthesis by n-methyl-n-nitrosourea *in vitro*. *Biochem. J.*, 1973, 136, 303—309.
16. Kraśnicka Z., Gajkowska B.: Obraz histologiczny i ultrastrukturalny organotypowej hodowli tkanki nerwowej po działaniu metylnitrozomocznika. *Neuropat. Pol.*, 1981, 1, 75—89.
17. Magee P., Farber E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat liver nucleic acids by dimethylnitrosoamine *in vivo*. *Biochem. J.*, 1962, 83, 114—124.
18. Nakamura K., Asami M., Orita S., Kawada K.: Chromatographic studies on chemical degradation of carcinostatic nitrosourea. *J. Chromatogr.*, 1979, 168, 221—226.
19. Podlewski J. K., Chwalibogowska-Podlewska A.: *Leki współczesnej terapii*. PZWL, Warszawa 1978, 352.
20. Szczech J.: Kariometric, cytophotometric and histoenzymatic studies of rat neuroglia after CCNU (Lomustine) administration. *Exp. Pathol.*, 1983, (w druku).
21. Torack R.: The relationship between adenosinetriphosphatase activity and triethyltin toxicity in the production of cerebral edema of the rat. *Am. J. Pathol.*, 1965, 46, 245—251.
22. Walker M. D., Hilton J.: Nitrosourea pharmacodynamics in relation to the central nervous system. *Cancer Treat. Rep.*, 1976, 60, 725—728.
23. Wender M., Kozik M. B.: Histochemia enzymów rozwijającego się neurogleju. *Folia Morphol.*, 1969, 1, 9—17.
24. Wender M., Kozik M. B., Piechowski A.: Enzymomorphological studies of the brain oedema produced with triethyl tin. *Folia Histochem. Cytochem.*, 1971, 2, 217—226.
25. Wender M., Żórawski A., Adamczewska-Goncerzewicz Z., Mularek O.: Wpływ zatrucia etylnitrozomocznikiem na obraz kwasów tłuszczowych lipidów mieliny. *Neuropat. Pol.*, 1981, 1, 91—106.
26. Young D. F., Posner J. B.: Nervous system toxicity of the chemotherapeutic agents. W: *Handbook of clinical neurology*. Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn, Elsevier North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979, 36, 91—126.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii AM, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań

ANTONI GODLEWSKI, JÓZEF SZCZECH

ZMIANY HISTOENZYMATYCZNE ISTOTY BIAŁEJ MÓZGU
MŁODYCH SZCZURÓW ZACHODZĄCE POD WPŁYWEM
WINKRYSTYNY PODAWANEJ W DRUGIEJ POŁOWIE ŻYCIA
PŁODOWEGO *

Zakład Neuropatologii Akademii Medycznej, Poznań

Winkrystyna, alkaloid szeroko stosowany ze względu na swoją aktywność antymitotyczną w chemioterapii nowotworów, nie jest substancją obojętną dla układu nerwowego.

Znany jest teratogeny wpływ winkrystyny podawanej w dużych dawkach na rozwijający się ośrodkowy układ nerwowy (Ferm 1963; Courtney, Valerio 1968; Joneja, Ungthavorn 1969) oraz jej działanie uszkadzające komórki nerwowe *in vivo* (Schochet i wsp. 1968; Wiśniewski i wsp. 1970) oraz *in vitro* (Burdman 1966). Chociaż głównymi powikłaniami neurologicznymi w trakcie kuracji winkrystyną są objawy ze strony obwodowego układu nerwowego (Rosenthal, Kaufman 1974; Young, Posner 1979; Goldberg i wsp. 1982), wielokrotnie opisywano również uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego manifestujące się drgawkami, zaburzeniami świadomości i objawami ubytkowymi (Gröbe, Palm 1972; Dieterich 1979; Byrd i wsp. 1981).

Ponieważ nasze wcześniejsze badania wykazały, że podawanie winkrystyny nawet w niewielkich, zbliżonych do terapeutycznych, dawkach w okresie rozwoju embrionalnego, doprowadza do powstania szeregu zaburzeń w ośrodkowym układzie nerwowym, objawiających się przyspieszeniem mielinizacji i zmianami w zawartości DNA w oligodendrocytach spoidła wielkiego (Godlewski 1983; Kozik, Godlewski 1983), wydawało się celowe prześledzenie procesu „dojrzewania histoenzymatycznego” istoty białej mózgu szczurów poddanych działaniu różnych dawek tego antymitotyku w drugiej połowie życia płodowego.

* Praca wykonana w ramach problemu węzłowego 10.4.05.3.3.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na młodych szczurach, samicach i samcach, których matki w 11, 14, 17 i 20 dniu ciąży otrzymywały domięśniowe iniekcje winkrystyny rozpuszczonej w 0,9% NaCl. Zwierzęta podzielono na dwie grupy doświadczalne. Pierwsza grupa pochodziła od matek otrzymujących winkrystynę w jednorazowej dawce 0,01 mg/kg masy ciała. Matki szczurów z drugiej grupy otrzymywały winkrystynę w jednorazowej dawce 0,075 mg/kg masy ciała. Ciężarne samice i ich potomstwo przebywały przez cały czas doświadczenia w typowych warunkach hodowlanych i otrzymywały standardową paszę granulowaną. Młode szczury z obu grup doświadczalnych podzielono na 6 grup wiekowych, uśmiercając je odpowiednio w 1, 3, 7, 14, 21 i 28 dobie po urodzeniu. Materiał do badań stanowiły mózgowia, które utrwalano w płynie Bakera przez 16 godzin w temperaturze 4°C, a następnie cięto na mikrotomie mroźniowym w celu oznaczenia aktywności następujących enzymów: fosfohydrolazy pirofosforanu tiaminy (TPPazy) — E.L. * 3.6.1.6. według metody Novikoffa i Goldfischera (1961), czas inkubacji 30 min w temperaturze pokojowej; hydrolazy estrów karboksylowych (nieswoistej esterazy NsE) — E.L. 3.1.1.1. według metody Nachlasa i Seligmanna (1949), inkubacja w temperaturze 37°C przez 15 min; hydrolazy acetylocholinyl (acetylocholinesterazy — AChE) — E.L. 3.1.1.7. według metody Gerebtzoffa (1953), inkubacja w temperaturze 37°C przez 120 min; acylohydrolazy acylocholinyl (cholinoesterazy — ChE) — E.L. 3.1.1.8. według metody Gerebtzoffa (1953), inkubacja w temperaturze 37°C przez 180 min; fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych (fosfatazy zasadowej — FZ) — E.L. 3.1.3.1. według metody Gomoriego (1953), inkubacja w temperaturze 37°C przez 30 min; fosfohydrolazy monoestrów ortofosforanowych (fosfatazy kwaśnej — FK) — E.L. 3.1.3.2. według metody Gomoriego (1953), inkubacja w temperaturze 37°C przez 50 min; fosfohydrolazy ATP (ATPazy) — E.L. 3.6.1.3. według metody Wachsteina i Meisela (1957), inkubacja w temperaturze 37°C przez 45 min.

WYNIKI

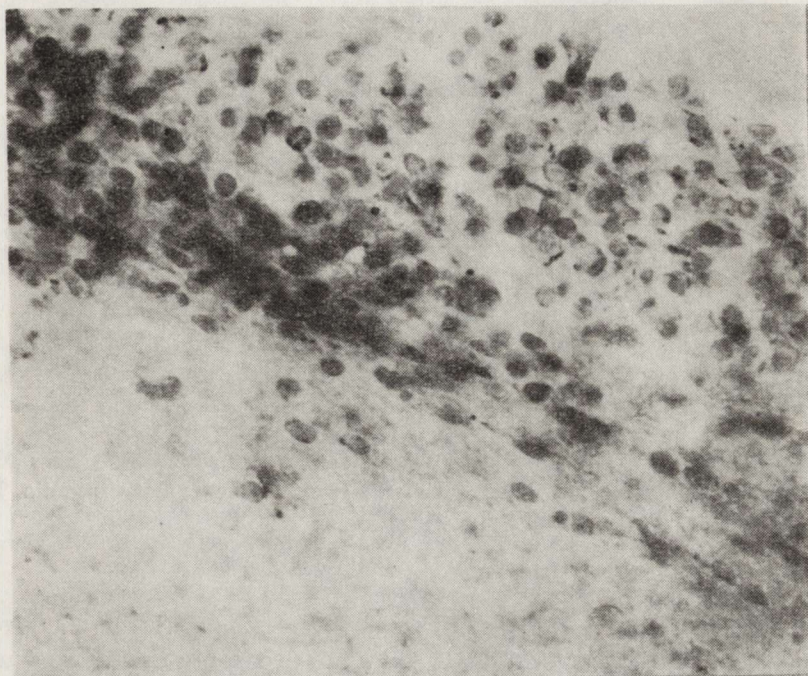
Fosfohydrolaza pirofosforanu tiaminy (TPPaza)

Grupa kontrolna

W pierwszej dobie życia pozapłodowego odczyn enzymatyczny obserwuje się w komórkach niezróżnicowanego gleju podwyściółkowego, w komórkach migrujących z warstwy okołokomorowej macierzy, w komórkach gniazd rozrodczych i w ścianach naczyń. Niewielka

* E.L. — enzyme list (Florkin, Stotz 1973)

aktywność widoczna jest w pojedynczych komórkach glejowych istoty białej półkul mózgowych. Podobną lokalizację odczynu enzymatycznego obserwuje się u zwierząt 3-dniowych (ryc. 1) i 7-dniowych. Zmniejsza się stopniowo aktywność w gleju podwysięółkowym, wyraźny odczyn przejawiają komórki glejozy mielinizacyjnej.



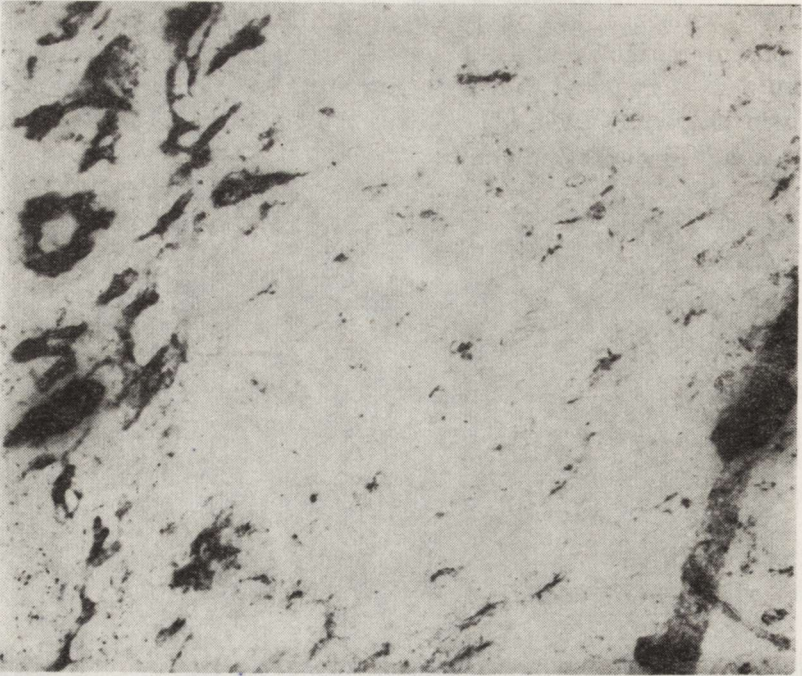
Ryc. 1. Grupa kontrolna. 3 dzień życia. Umiarkowana aktywność enzymatyczna TPPazy w nie zróżnicowanym gleju podwysięółkowym. Pow. 480 ×

Fig. 1. Control group. 3rd day of life. Moderate TPPase activity in the cells of the matrix layer. × 480

U szczurów 14-dniowych i starszych odczyn na TPPazę występuje w licznych komórkach oligodendrogleju (ryc. 2) oraz w przynaczyniowym astrogleju. Utrzymuje się nadal wyraźna aktywność enzymatyczna w ścianach naczyńowych.

I grupa doświadczalna

Lokalizacja odczynu enzymatycznego u szczurów 1-dniowych poddanych działaniu małych dawek wnikrystyny w drugiej połowie życia płodowego jest podobna jak u zwierząt kontrolnych. Zwiększa się nieco w porównaniu z grupą kontrolną intensywność reakcji enzymatycznej na TPPazę w nie zróżnicowanym gleju podwysięółkowym. U zwierząt 3- i 7-dniowych, w porównaniu ze szczurami kontrolnymi dochodzi do wzrostu aktywności w komórkach glejozy mielinizacyjnej i do zmniejszenia intensywności odczynu enzymatycznego w warstwie okołokomorowej ma-



Ryc. 2. Grupa kontrolna. 14 dzień życia. Słaby odczyn enzymatyczny dla TPPazy w oligodendrogleju i naczyniach krwionośnych strzępka hipokampu. Pow. 225 ×
 Fig. 2. Control group. 14th day of life. Weak TPPase activity in oligodendroglia and in the blood vessels of *fimbria hippocampi*. × 225

cierzy. W istocie białej obserwuje się liczne komórki oligodendrogleju wykazujące słabą reakcję. Od 14 dnia po urodzeniu nie obserwuje się istotnych różnic w aktywności badanego enzymu pomiędzy zwierzętami kontrolnymi i doświadczalnymi (schemat 1). Odczyn enzymatyczny, poza naczyniami krwionośnymi, występuje w licznych oligodendrocytach i przynajmniej w położonych astrocytach istoty białej mózgu.

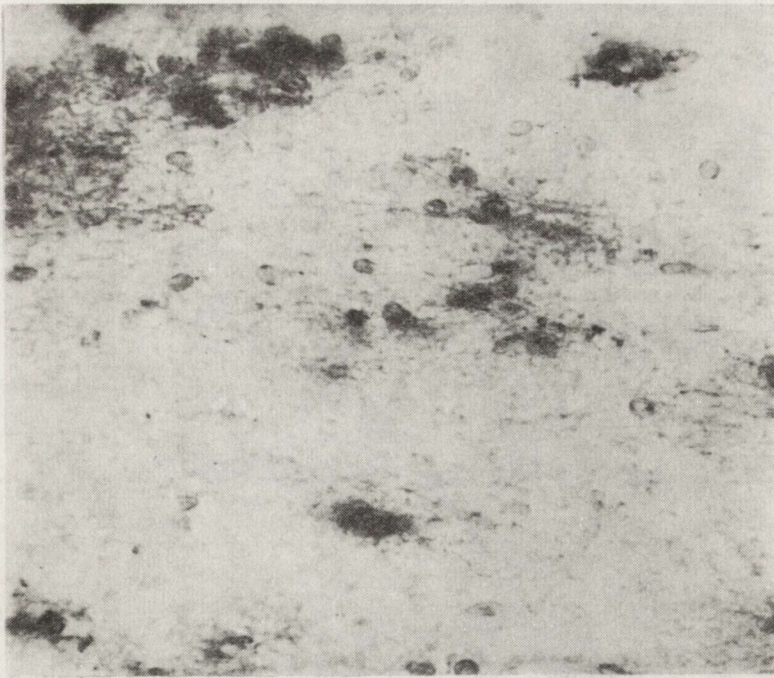
II grupa doświadczalna

W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, w pierwszym dniu życia pozapłodowego obserwuje się niewielki wzrost aktywności enzymatycznej w komórkach nieodróżnionego gleju podwysciółkowego i w migrujących komórkach macierzy. W pozostałych grupach wiekowych obserwuje się wzrost aktywności enzymu w komórkach glejowy mielinizacyjnej (zwierzęta 7- i 14-dniowe), w oligodendrogleju (ryc. 3, 4) i w naczyniach krwionośnych (schemat 1).

Hydrolaza estrów karboksylowych (NsE)

Grupa kontrolna

W grupie zwierząt 1-, 3- i 7-dniowych aktywność enzymatyczna NsE zlokalizowana jest w perycytach naczyń krwionośnych i komórkach wy-



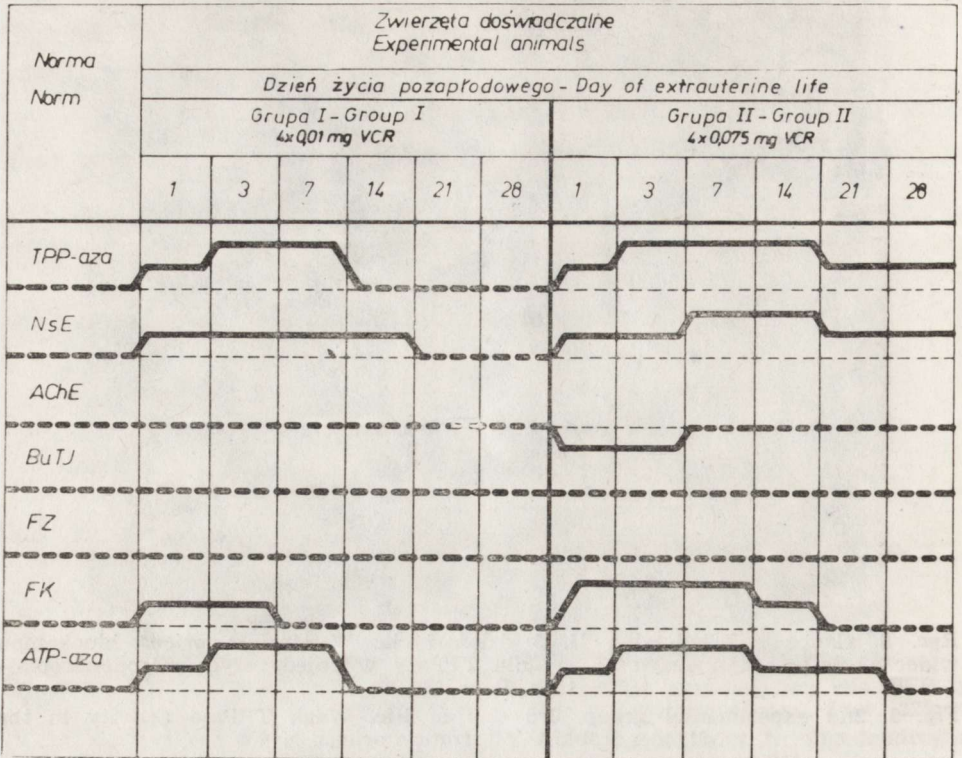
Ryc. 3. Grupa doświadczalna II. 3 dzień życia. W *stratum oriens* hipokampu widoczny jest odczyn enzymatyczny dla TPPazy w pojedynczych oligodendroblastach. Pow. 480 ×

Fig. 3. 2nd experimental group. 3rd day of life. Weak TPPase activity in the oligodendroblasts of *stratum oriens*. × 480



Ryc. 4. Grupa doświadczalna II. 14 dzień życia. Wzrost aktywności enzymatycznej TPPazy w oligodendrogleju strzępka hipokampu. Pow. 225 ×

Fig. 4. 2nd experimental group. 14th day of life. Increase TPPase activity in oligodendroglia of *fimbria hippocampi*. × 225



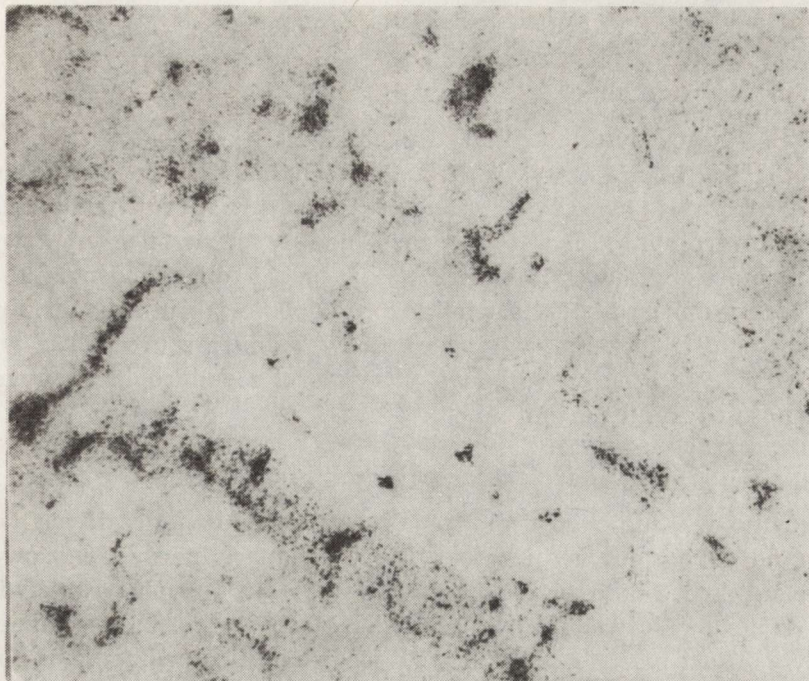
Schemat 1. Zmiany histoenzymatyczne w istocie białej mózgu młodych szczurów w następstwie podawania winkrystyny w drugiej połowie życia płodowego. Grupa kontrolna — linia przerywana; grupy doświadczalne — linia ciągła

Scheme 1. Histoenzymatic changes in the cerebral white matter of young rats after vincristine treatment in the second part of gestation. Control group — intermittent line; experimental groups — continuous line

ściółki. Rozsiany, drobnoziarnisty odczyn enzymatyczny obserwuje się w komórkach okołokomorowej macierzy, a u szczurów 7-dniowych pojawia się również w komórkach glejzoj mielinizacyjnej spoidła wielkiego (ryc. 5). W istocie białej zwierząt 14-, 21- i 28-dniowych poza perycytami naczyń krwionośnych i komórkami glejzoj mielinizacyjnej, odczyn enzymatyczny widoczny jest w niektórych oligodendrocytach, zwłaszcza w obrębie spoidła wielkiego.

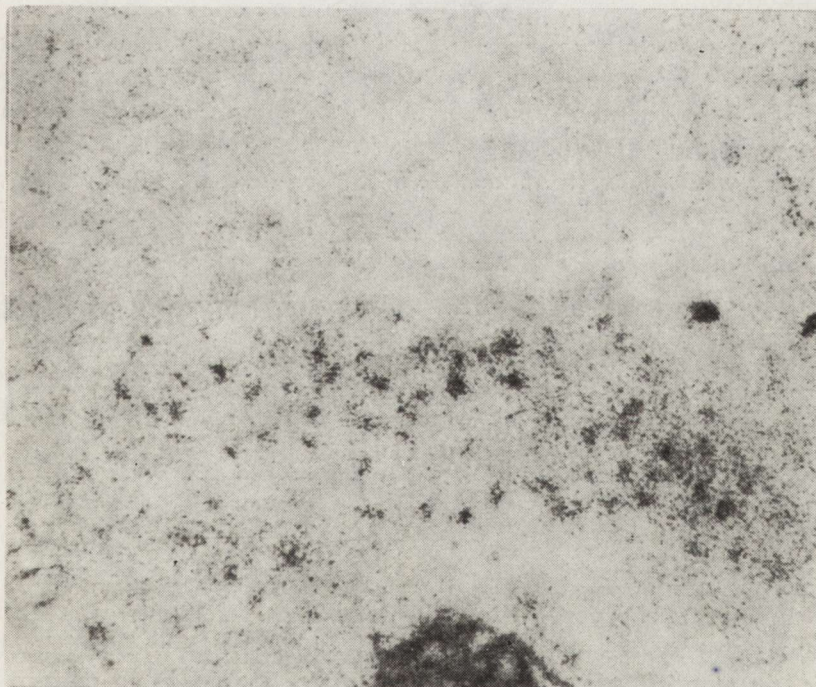
I Grupa doświadczalna

W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi u szczurów 1-, 3-, 7- i 14-dniowych obserwuje się wzrost aktywności enzymatycznej NsE w perycytach naczyń krwionośnych, komórkach macierzy i w komórkach glejzoj mielinizacyjnej (ryc. 6). Wcześniej niż w grupie kontrolnej, w 7 dniu po urodzeniu, pojawiają się pierwsze oligodendroblasty spoidła wielkiego wykazujące obecność enzymu. W dalszych okresach życia pozapłodowego nie obserwuje się różnic pomiędzy zwierzętami kontrolnymi i doświadczalnymi (schemat 1).



Ryc. 5. Grupa kontrolna. 7 dzień życia. Istota biała obręczy, aktywność enzymatyczna NsE w naczyniach krwionośnych, śladowa reakcja enzymatyczna w komórkach glejowy mielinizacyjnej. Pow. 140 ×

Fig. 5. Control group. 7th day of life. Weak NsE activity in the blood vessels of the cingulum white matter. Very weak enzymatic activity in the cells of myelination gliosis. × 140



Ryc. 6. Grupa doświadczalna I. 7 dzień życia. Wyraźny wzrost aktywności enzymatycznej NsE w komórkach glejowy mielinizacyjnej istoty białej obręczy. Pow. 140 ×

Fig. 6. 1st experimental group. 7th day of life. Considerable increase of NsE activity in myelination gliosis cells of cingulum. × 140

II Grupa doświadczalna

Lokalizacja odczynu enzymatycznego na NsE jest podobna jak u zwierząt kontrolnych. We wszystkich badanych okresach rozwoju pozapłodowego zaznacza się wzrost aktywności enzymu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, dotyczy to zarówno perycytów naczyń krwionośnych, komórek glejzoj mielinizacyjnej, jak i oligodendrogleju istoty białej półkul mózgu i spoidła wielkiego. Podobnie jak u zwierząt z pierwszej grupy doświadczalnej wcześniej, bo w 7 dniu po urodzeniu, widoczne są na terenie spoidła wielkiego pierwsze oligodendroblasty wykazujące obecność odczynu na ten enzym.

Hydrolaza acetylocholinoj (AChE)

Zarówno w grupie kontrolnej, jak i w obu doświadczalnych dodatni odczyn na AChE obserwuje się tylko w ścianach naczyń włosowatych. U zwierząt 1- i 3-dniowych poddanych działaniu dużych dawek winkrystyny (II grupa doświadczalna) aktywność enzymatyczna w ścianach naczyniowych jest nieznacznie niższa w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (schemat 1). Różnic tych nie obserwuje się u starszych szczurów z tej grupy.

Acylohydrolaza acylocholinoj (ChE)

Grupa kontrolna

Reakcja na ten enzym jest dodatnia już w 1 dobie po urodzeniu w naczyniach krwionośnych i spłotach naczyniastych, i systematycznie rośnie w całym badanym okresie. U zwierząt najmłodszych, 1-dniowych, odczyn występuje głównie w erytrocytach i niektórych komórkach śródbłonna, by w następnych grupach wiekowych pojawić się również w błonie podstawowej.

Grupy doświadczalne

W porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi u szczurów poddanych działaniu zarówno małych, jak i dużych dawek winkrystyny nie obserwuje się jakichkolwiek różnic w nasileniu i lokalizacji odczynu enzymatycznego na acylohydrolazę acylocholinoj. Aktywność występuje jedynie w naczyniach krwionośnych (schemat 1).

Fosfataza zasadowa (FZ)

Grupa kontrolna

W 1 dniu życia pozapłodowego aktywność enzymatyczna fosfatazy zasadowej występuje w naczyniach krwionośnych i w komórkach nie zróżnicowanego gleju podwysiciółkowego. Od 7 dnia życia odczyn enzymatyczny w gleju podwysiciółkowym wyraźnie spada, natomiast w na-

czyniach krwionośnych wzrasta powoli w całym okresie obserwacji. U zwierząt 7-dniowych obserwuje się nieznaczną aktywność w komórkach glejozy mielinizacyjnej, a u szczurów starszych, w nielicznych komórkach glejowych istoty białej.

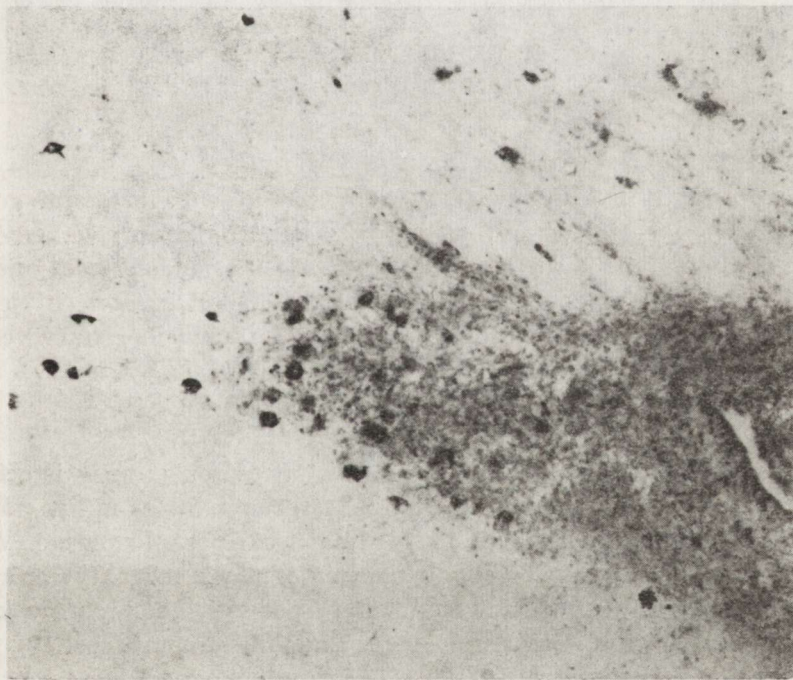
Grupy doświadczalne

W obydwu grupach doświadczalnych nie obserwuje się różnic w lokalizacji i intensywności odczynu enzymatycznego na fosfatazę zasadową w porównaniu do zwierząt kontrolnych (schemat 1).

Fosfataza kwaśna (FK)

Grupa kontrolna

W 1 i 3 dniu życia pozapłodowego aktywność enzymatyczna fosfatazy kwaśnej widoczna jest w niezróżnicowanym gleju podwyściółkowym pod postacią drobnych ziaren. Ponadto, silny odczyn obserwuje się w pasmach komórek migrujących z okolicy okołokomorowej (ryc. 7) i w naczyniach krwionośnych. Od 7 dnia po urodzeniu odczyn enzymatyczny występuje w gniazdach komórek glejozy mielinizacyjnej (ryc. 8), a w 14 dniu pojawia się w niektórych oligodendrocytach spoidła wielkiego i istoty białej półkul mózgu.



Ryc. 7. Grupa kontrolna. 3 dzień życia. Reakcja enzymatyczna dla FK w niezróżnicowanym gleju podwyściółkowym i w komórkach migrujących. Pow. 180 X
 Fig. 7. Control group. 3rd day of life. Strong acP activity in the undifferentiated matrix cells and in the migrated cells. X 180



Ryc. 8. Grupa kontrolna. 7 dzień życia. Odczyn enzymatyczny na FK w komórkach glejozy mielinizacyjnej. Pow. 350 ×

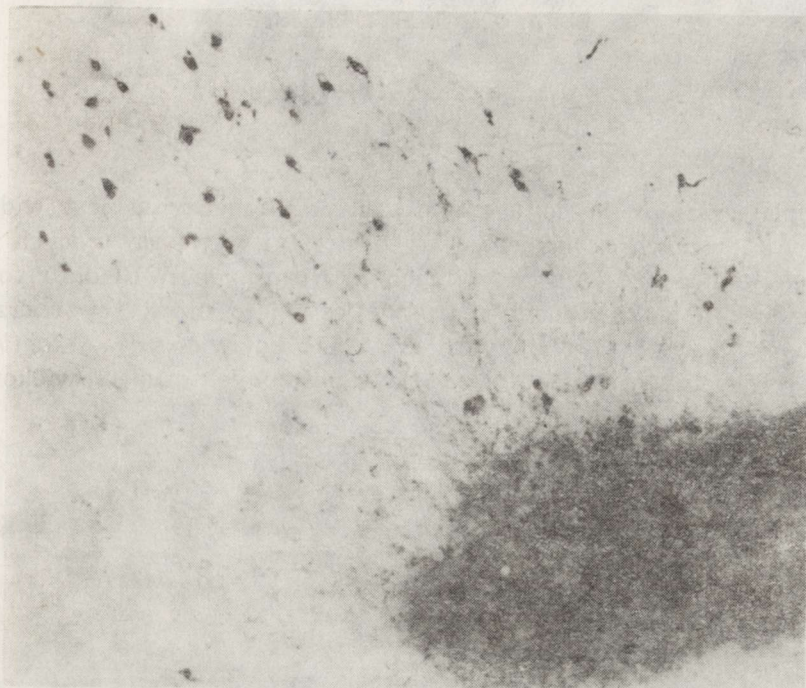
Fig. 8. Control group. 7th day of life. acP activity in myelination gliosis cells. × 350

I Grupa doświadczalna

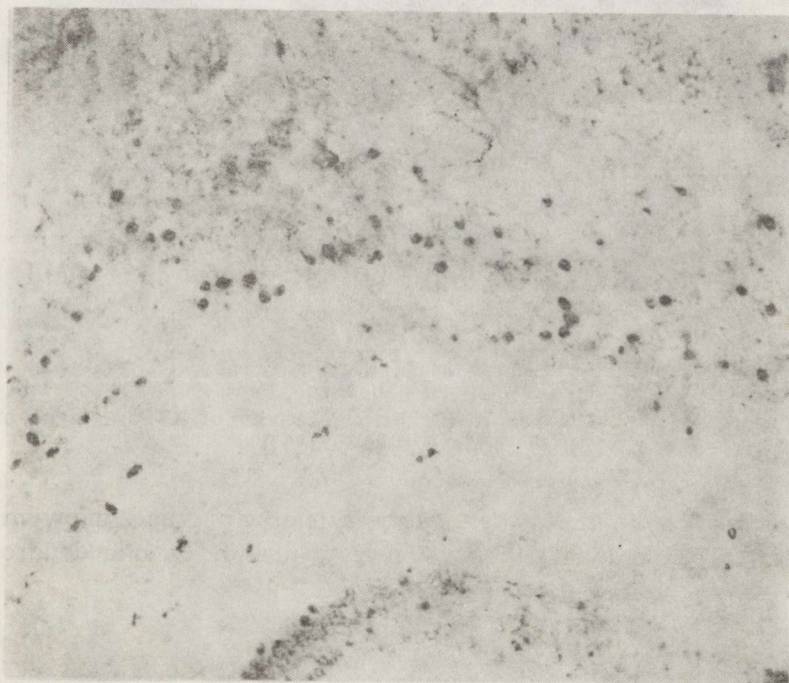
U szczurów 1- i 3-dniowych, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi, obserwuje się wzrost aktywności enzymatycznej w komórkach macierzy, komórkach migrujących (ryc. 9) i ścianach naczyńiowych. W warstwie nieodróżnionego gleju podwysciółkowego więcej jest komórek o wysokiej aktywności. U zwierząt 7-dniowych i starszych różnice te zanikają (schemat 1).

II Grupa doświadczalna

Wyższa niż u zwierząt kontrolnych aktywność enzymu w istocie białej mózgu utrzymuje się u szczurów z tej grupy dłużej niż w poprzedniej grupie doświadczalnej, aż do 14 dnia życia pozapłodowego. W tym okresie rozwoju pozapłodowego widoczny jest wzrost aktywności fosfatazy kwaśnej w nieodróżnionym gleju podwysciółkowym, w komórkach migrujących i w komórkach glejozy mielinizacyjnej (ryc. 10). W porównaniu do grupy kontrolnej większa liczba oligodendrocytów wykazuje dodatnią reakcję. W najstarszych grupach wiekowych, u zwierząt 21- i 28-dniowych, nie obserwuje się istotnych różnic w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi.



Ryc. 9. Grupa doświadczalna I. 3 dzień życia. Wzrost aktywności enzymatycznej FK w komórkach migrujących z warstwy okołokomorowej macierzy. Pow. 180 ×
 Fig. 9. 1st experimental group. 3rd day of life. Increase of acP activity in the migrated cells of the matrix layer. × 180

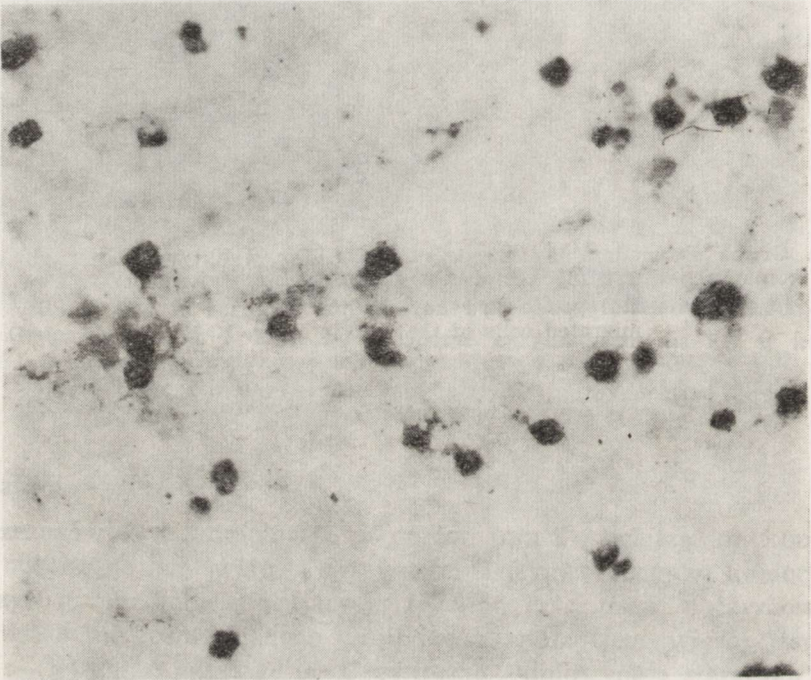


Ryc. 10. Grupa doświadczalna II. 7 dzień życia. Wzrost aktywności enzymatycznej FK w komórkach glejzozy mielinizacyjnej. Pow. 350 ×
 Fig. 10. 2nd experimental group. 7th day of life. Increase of acP activity in the cells of the myelination gliosis. × 350

Fosfohydrolaza ATP (ATPaza)

Grupa kontrolna

W pierwszej dobie po urodzeniu aktywność enzymu jest widoczna tylko w komórkach okołokomorowej macierzy i wywędrowujących z niej pasmach komórek oraz w naczyniach krwionośnych. W 3 dniu po urodzeniu odczyn w komórkach macierzy jest nieco niższy. U zwierząt 7-dniowych aktywność fosfohydrolazy ATP pojawia się w komórkach glejowych spoidła wielkiego (ryc. 11). W następnych grupach wiekowych,



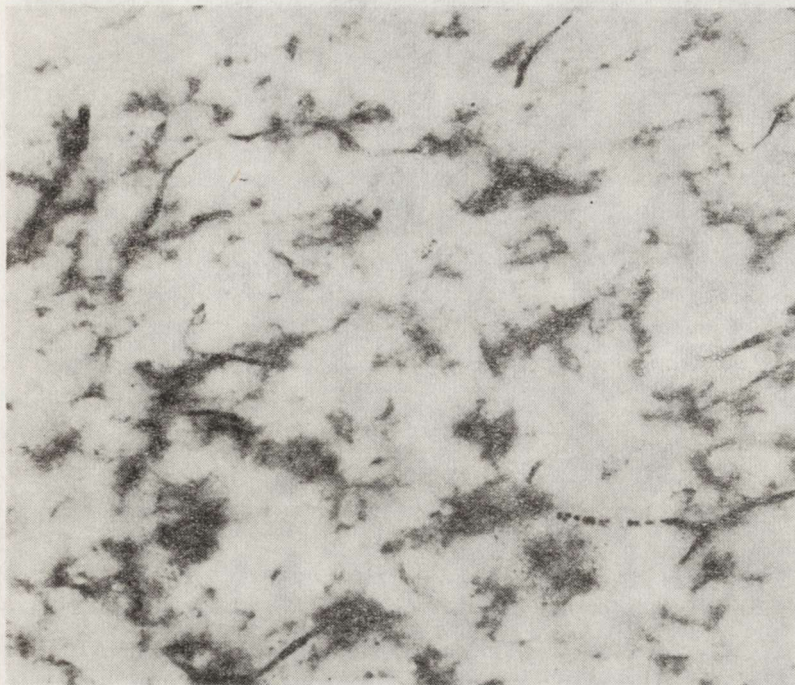
Ryc. 11. Grupa kontrolna. 7 dzień życia. Silna aktywność enzymatyczna ATPazy w neurogleju spoidła wielkiego. Pow. 400 ×

Fig. 11. Control group. 7th day of life. Strong activity of ATPase in neuroglia of the corpus callosum. × 400

poza systematycznie nasilającym się odczynem w przynaczyniowym astrogleju (ryc. 12), pojawia się on również w niektórych oligodendrocytach spoidła wielkiego.

I Grupa doświadczalna

U zwierząt poddanych działaniu niewielkich dawek winkrystyny w okresie płodowym dochodzi do wzrostu aktywności enzymatycznej



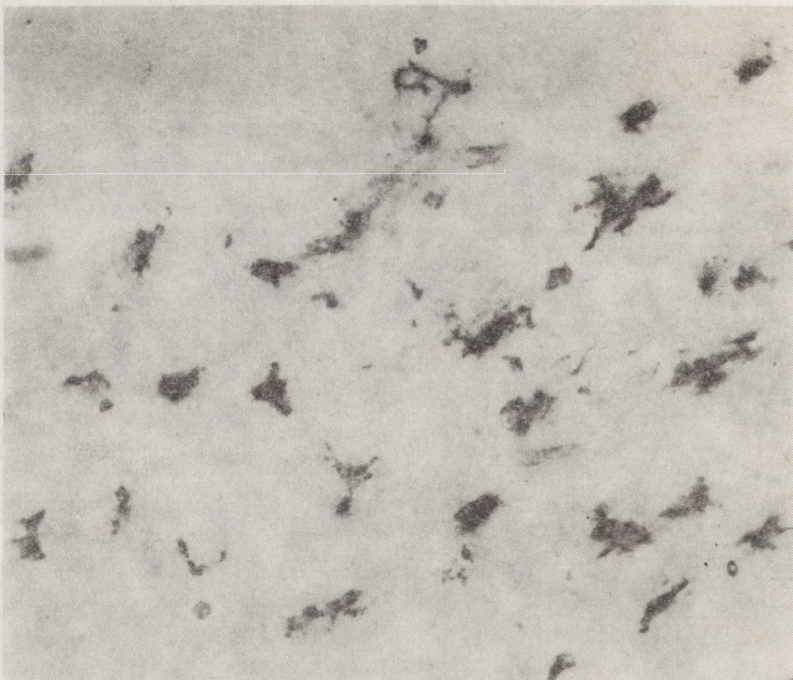
Ryc. 12. Grupa kontrolna. 14 dzień życia. Silna aktywność enzymatyczna ATPazy w astrogleju spoidła wielkiego. Pow. 300 ×

Fig. 12. Control group. 14 th day of life. Strong ATPase activity in astroglia of the corpus callosum. × 300

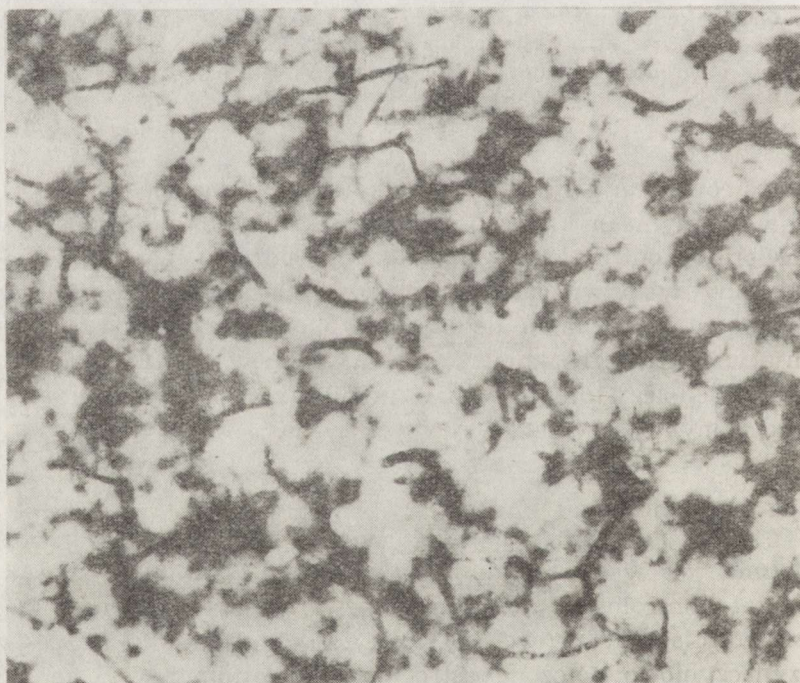
w niezróznicowanym gleju podwysciółkowym, w gniazdach gleju rozrodczego i w naczyniach krwionośnych w 1, 3 i 7 dniu życia. Wcześniej niż u zwierząt kontrolnych, w 3 dniu po urodzeniu, pojawia się odczyn enzymatyczny w przynaczyniowo położonych astrocytach. U zwierząt 7-dniowych, w porównaniu do szczurów kontrolnych, dodatnią reakcję wykazuje większa liczba komórek glejowych (ryc. 13). Od 14 dnia życia nie obserwuje się istotnych różnic pomiędzy zwierzętami kontrolnymi i doświadczalnymi (schemat 1).

II Grupa doświadczalna

Podobnie jak w poprzedniej grupie doświadczalnej, w porównaniu do zwierząt kontrolnych, obserwuje się wzrost aktywności enzymatycznej fosfohydrolazy ATP (ryc. 14). Już w 3 dniu życia widoczne są liczne, przynaczyniowo położone astrocyty z dodatnim odczynem. Jedynie u zwierząt 28-dniowych nie obserwuje się wyraźnych różnic pomiędzy szczurami kontrolnymi i doświadczalnymi.



Ryc. 13. Grupa doświadczalna I. 7 dzień życia. Odczyn enzymatyczny dla ATPazy widoczny jest w wypustkach neurogleju spoidła wielkiego. Pow. 400 ×
Fig. 13. 1st experimental group. 7th day of life. The appearance of ATPase activity in processes of the corpus callosum neuroglia. × 400



Ryc. 14. Grupa doświadczalna II. 14 dzień życia. Wzrost aktywności enzymatycznej ATPazy w astrocytach spoidła wielkiego. Pow. 300 ×
Fig. 14. 2nd experimental group. 14th day of life. Increase of ATPase activity in the astrocytes of the corpus callosum. × 300

OMÓWIENIE

W okresie ontogenezy pozapłodowej dochodzi do szeregu zmian w lokalizacji i nasileniu różnych odczynów histoenzymatycznych w ośrodkowym układzie nerwowym (Wender, Kozik 1968; Wender i wsp. 1971). Zjawisko to jest równoległe do szeregu innych zmian biochemicznych, takich jak: zmiana stopnia uwodnienia tkanki nerwowej, zmiany zawartości białek, kwasów nukleinowych, gangliozydów (Bass i wsp. 1969a), lipidów mieliny (Bass i wsp. 1969b), histonów i DNA w jądrach komórek nerwowych (Bregnard i wsp. 1979). W istocie białej mózgu intensywne zmiany histoenzymatyczne w okresie postembrionalnym towarzyszą mielinizacji włókien nerwowych (Wender, Kozik 1968; Wender i wsp. 1971).

Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że podawanie winkrystyny nawet w niewielkich dawkach (szczury I grupy doświadczalnej) w okresie rozwoju płodowego prowadzi do szeregu zmian w aktywności enzymatycznej fosfataz i esteraz w istocie białej mózgu w okresie pozapłodowym — dochodzi do przyspieszenia „dojrzewania histoenzymatycznego” istoty białej mózgu. Tak np. aktywność enzymatyczna TPPazy u szczurów kontrolnych pojawia się w niektórych oligo- i astrocytach w 14 dniu życia pozapłodowego, a odczyn enzymatyczny na ATPazę występuje w przynacyniowym astrogleju od 7 dnia. U zwierząt doświadczalnych natomiast odczyn enzymatyczny na TPPazę występuje w komórkach glejowych już w 7 dobie po urodzeniu, a aktywność ATPazy obecna jest w przynacyniowym astrogleju od 3 dnia życia. U zwierząt poddanych działaniu niewielkich dawek winkrystyny w okresie płodowym różnice w aktywności enzymatycznej zanikają po 14 dniu życia. U szczurów otrzymujących duże dawki winkrystyny różnice te utrzymują się dłużej, a dla TPPazy i NsE do końca badanego okresu, a więc do 28 dnia po urodzeniu. Różnice w aktywności enzymatycznej pomiędzy zwierzętami kontrolnymi i doświadczalnymi nie są jednakowe dla wszystkich badanych enzymów: największe są dla TPPazy, NsE, FK i ATPazy, minimalne, i to tylko u najmłodszych zwierząt otrzymujących duże dawki winkrystyny, w przypadku AChE. Nie obserwuje się różnic w aktywności enzymatycznej ChE i FZ.

Przedstawione zmiany aktywności histoenzymatycznej wywołane podawaniem winkrystyny w czasie ciąży dobrze korespondują z wcześniej opisanym przyspieszeniem mielinizacji spoidła wielkiego (Godlewski 1983) oraz zmianami morfologicznymi i zmianami w zawartości DNA w jądrach oligodendrocytów spoidła wielkiego (Kozik, Godlewski 1983), spowodowanymi również podawaniem tego antymitotyku w okresie płodowym. Jednak mechanizm prowadzący do powstania zaobserwowanych zmian nadal pozostaje niejasny.

Winkrystyna poza szeroko znanym i wykorzystywanym w chemioterapii nowotworów działaniem antymitotycznym, polegającym na blokowaniu podziału mitotycznego w stadium metafazy (Owells i wsp. 1976), wykazuje szereg innych właściwości. Alkaloid ten hamuje syntezę kwasów nukleinowych, białek, a nawet lipidów (Creasey 1979), a ostatnie doniesienia mówią o jego wpływie na metabolizm energetyczny tkanki nerwowej (Hoyer i wsp. 1980, 1981). W odniesieniu do układu nerwowego alkaloidy barwinka, a więc i winkrystyna, powodują obok zmian typu zwyrodnienia włóknkowego („neurofibrillary degeneration” — Wiśniewski i wsp. 1968, 1970) również zaburzenia transportu aksonalnego (Nöstrom i wsp. 1971; Johnson i wsp. 1979) i przewodnictwa włókien nerwowych.

Przedstawione spostrzeżenia świadczące o przyspieszeniu „dojrzwiania histoenzymatycznego” istoty białej mózgu pod wpływem podawania winkrystyny, warto porównać z innymi pracami mówiącymi o występowaniu w ośrodkowym układzie nerwowym pod wpływem tego antymitotyku zmian typowych dla procesu starzenia się, podobnych do tych jakie występują np. w przedstarczych zanikach mózgu (Hoyer i wsp. 1980, 1981).

WNIOSKI

1) Wielokrotne podawanie winkrystyny w drugiej połowie ciąży powoduje u potomstwa przyspieszenie zmian aktywności enzymatycznej charakterystycznych dla „dojrzwiania histoenzymatycznego” istoty białej mózgu szczura.

2) W badanych warunkach doświadczalnych największe zmiany histoenzymatyczne obserwuje się w odczynach na aktywność TPPazy, NsE, FK i ATPazy.

3) Nie obserwuje się zmian w aktywności enzymatycznej FZ i ChE.

4) Intensywność i czas trwania zmian histoenzymatycznych są zależne od wielkości dawki winkrystyny. Wyższe dawki cytostatyku powodują większe i utrzymujące się dłużej zmiany histoenzymatyczne.

HISTOENZYMATIC CHANGES OF BRAIN WHITE MATTER OF YOUNG RATS FROM MOTHERS TREATED BY VINCISTINE DURING THE SECOND PART OF GESTATION

Summary

Histoenzymatic investigations were performed on young rats, the offsprings of mothers treated by vincristine at the 11th, 14th, 17th and 20th days of gestation.

Experimental animals were divided in two groups: the first group was from mothers treated by vincristine at a dose of 0.01 mg/kg body weight and second from mothers treated by this drug at a dose of 0.075 mg/kg body weight.

The activity of TPPase, NsE, AChE, BuTJ, alkP, acP and ATPase was studied in both the vincristine treated and control rats aged 1, 3, 7, 14, 21 and 28 days.

As compare to control animals in both experimental groups we have found an advanced developmental changes of white matter histoenzymatic activity. This phenomenon was observed on brains in 1st animals group from 1st to 14th days of life and in 2nd group from birth to 28th day of life. The pronounced changes were observed with respect to TPPase, NsE, acP and ATPase activity. The enzymatic activity of alkP and BuTJ was unchanging.

ГИСТОЭНЗИМАТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ БЕЛОГО ВЕЩЕСТВА МОЛОДЫХ КРЫС ПРОИСХОДЯЩИЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ПОДАВАЕМОГО ВО ВТОРОЙ ПОЛОВИНЕ ВНУТРИУТРОБНОЙ ЖИЗНИ

Резюме

Были проведены гистоэнзиматические исследования на молодых крысах, потомстве матерей, получавшим винкрестин во второй половине беременности четырехкратно — на 11, 14, 17 и 20 день беременности. Экспериментальные животные были разделены на две группы: крысы из I группы происходили от матерей, получавших винкрестин в дозах по 0,01 мг/кг веса тела, крысы из II группы — от матерей, получавших винкрестин в дозах по 0,075 мг/кг веса тела. Крыс из всех групп убивали на 1, 3, 7, 14, 21 и 28 день от рождения. На срезах мозга определяли энзиматическую активность ТППазы, НЭ, АХЭ, АФ, БХЭ, КФ и АТФазы.

В обеих группах было обнаружено ускорение процесса „гистоэнзиматического созревания” белого вещества мозга, выражающиеся более сильными реакциями по сравнению с контрольными животными. Это явление наблюдалось у животных из I экспериментальной группы между 1 и 14 днем внеутробной жизни, а у крыс из II группы до 28 дня внеутробной жизни. Самые большие гистоэнзиматические изменения относились к энзиматическим реакциям на ТППазу, НЭ, КФ и АТФазу; не наблюдались изменения энзиматической активности АФ и БХЭ.

PIŚMIENNICTWO

1. Bass N. H., Netsky M. G., Young E.: Microchemical studies of postnatal development in rat cerebrum. I. Migration and differentiation of cells. *Neurology*, 1969a, 19, 258—268.
2. Bass N. H., Netsky M. G., Young E.: Microchemical studies of postnatal development in rat cerebrum. II. Formation of myelin. *Neurology*, 1969b, 19, 405—414.
3. Bregnard A., Ruch F., Lutz H., Kuenzle C. C.: Histones and DNA increase synchronously in neurons during early postnatal development of the rat forebrain cortex. *Histochemistry*, 1979, 61, 271—279.
4. Burdman J. A.: A note on the selective toxicity of Vincristine on chick-embryo sensory ganglia in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1966, 37, 331—332.
5. Byrd R. L., Rohrbough T. M., Raney R. B., Norris D. G.: Transient cortical blindness secondary to vincristine therapy in childhood malignancies. *Cancer*, 1981, 47, 37—40.
6. Courtney K. D., Valerio D. A.: Teratology in the macaca mulatta. *Teratology*, 1968, 1, 163—172.
7. Creasey W. A.: Vinca alkaloids. W: *Cancer Chemotherapy III. The Forty-*

- Sixth Hahnemann Symposium, Red. I. Brodsky, S. B. Kahn, J. F. Conroy. Grune et Stratton, New York, San Francisco, London 1979, 49—58.
8. Dieterich E.: Zur Frage der Encephalotoxizität des Vincristin. EEG Befunde bei Langzeitüberlebenden nach Leukemien und soliden Tumoren im Kindesalter, die mit Vincristin behandelt wurden. *Klin. Paediatr.*, 1979, 191, 145—147.
 9. Ferm V. H.: Congenital malformations in hamster embryos after treatment with vinblastine and vincristine. *Science*, 1963, 141, 426.
 10. Florin M., Stotz E. H.: Enzyme nomenclature. *W. Comprehensive biochemistry*, vol. 13, Elsevier, Amsterdam 1973.
 11. Gerebtzoff M.: Recherches histochimiques sur les acetylcholine et choline esterases. *Acta Anat. (Basel)*, 1953, 19, 366—379.
 12. Godlewski A.: Wpływ winkrystyny podawanej szczerom w drugiej połowie ciąży na mielinizację spoidła wielkiego. *Neuropat. Pol.*, 1983, 21, 233—241.
 13. Goldberg D. I., Bloomer W. D., Dawson D. M.: Nervous system toxic effects of cancer therapy. *JAMA*, 1982, 247, 1437—1441.
 14. Gomori G.: *Microscopic histochemistry*. University Press, Chicago 1953.
 15. Gröbe H., Palm D.: Vincristin-induzierte Encephalopathien unter der Behandlung kindlicher Leukosen. *Monatsch. Kinderheilk.*, 1972, 120, 23—27.
 16. Hoyer S., Frölich L., Hof M., Volk B.: First results on the effect of vincristine on brain glucose and energy metabolism in rats. *Mech. Ageing Dev.*, 1980, 14, 223—231.
 17. Hoyers Fr., Hof M.: Animal models in experimental gerontopsychiatry. *W: Animal models and hypoxia*. Red V. Stefanovich, Pergamon Press, Oxford, New York 1981, 35—45.
 18. Johnson E. M., Macia R. A., Andros R. Y., Bradshaw R. A.: The effects of drugs which destroy the symphatetic nervous system on the retrograde transport of nerve growth factor. *Brain Res.*, 1979, 171, 461—472.
 19. Joneja M., Ungthavorn S.: Teratogenic effects of vincristine in three lines of mice. *Teratology*, 1969, 2, 235—240.
 20. Kozik M. B., Godlewski A.: Karyometry and cytophotometry of oligodendroglial DNA in the corpus callosum of rats treated with vincristine during the second part of foetal life. *J. Hirnforsch.*, 1983, 24, 267—272.
 21. Nachlas M., Seligmann A.: The histochemical demonstration of esterase. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1949, 9, 415—425.
 22. Noström H., Hansson A., Sjöstrand J.: Effects of colchicine on axonal transport and ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Z. Zellforsch.*, 1971, 113, 271—293.
 23. Novikoff A., Goldfischer B. S.: Nucleoside diphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. nat. Acad. Sci.*, 1961, 9, 47—61.
 24. Owellen R. J., Hartke C. A., Dickerson R. M., Frederick O. H.: Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the Vinca alkaloids class. *Cancer Res.*, 1976, 36, 1499—1502.
 25. Rosenthal S., Kaufman S.: Vincristine neurotoxicity. *Ann. Inter. Med.*, 1974, 80, 733—737.
 26. Schochet S. S., Lampert P. W., Earlie K. M.: Neuronal changes induced by intrathecal Vincristine sulfate. *J. Neuropath. exp. Neurol.*, 1968, 27, 645—658.
 27. Wachstein M., Meisel E.: Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH with special reference to the demonstration of bili canaliculi. *Amer. J. Clin. Path.*, 1957, 27, 13—23

28. Wender M., Kozik M.: Histochemistry of cerebral white matter in relation to myelination of mouse brain. *J. Hirnforsch.*, 1968, 10, 79—88.
29. Wender M., Kozik M., Mularek O.: Histoenzymology of cerebral white matter in the developing rat brain. *J. Hirnforsch.*, 1971, 13, 223—230.
30. Wiśniewski H., Shelanski M. L., Terry R. D.: Effects of mitotic spindle inhibitors on neurotubules and neurofilaments of anterior horn cell. *J. Cell Biol.*, 1968, 38, 224—229.
31. Wiśniewski H., Terry R. D., Hirano A.: Neurofibrillary pathology. *J. Neuro-path. exp. Neurol.*, 1970, 29, 163—176.
32. Young D. F., Posner J. B.: Nervous system toxicity of the chemotherapeutic agents. W: *Handbook of clinical neurology*, Red. P. J. Vinken, G. W. Bruyn, vol. 36, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam 1979, 91—129.

Adres autorów: Zakład Neuropatologii, ul. Przebyszewskiego 49, 60-355 Poznań

RYSZARD PLUTA

ZMIANY TEMPERATURY MÓZGU I WYBRANYCH OKOLIC CIAŁA KRÓLIKA ORAZ JEGO ZACHOWANIA SIĘ W PODWYŻSZONEJ TEMPERATURZE OTOCZENIA

Zespół Neuropatologii Centrum Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN

Temperatura jest jednym z głównych czynników warunkujących przebieg procesów życiowych w komórkach roślin i zwierząt. Procesy te ustają w temperaturze zbliżonej do 0°C, chociaż często w sposób odwracalny (Hensel i wsp. 1973). Wzrost temperatury w określonych granicach zwiększa szybkość procesów metabolicznych. Przekroczenie temperatury 41°C rozpoczyna zaburzenia regulacji złożonych układów enzymatycznych, wynikiem czego są nieodwracalne zmiany strukturalno-czynnościowe (Gwóźdź i wsp. 1978; Heikkilä, Brown 1979).

Temperatura wnętrza ciała znacznej większości ssaków i ptaków regulowana jest w granicach od 36 do 43°C oraz wykazuje zróżnicowanie gatunkowe (Schmidt-Nielsen 1964). Podwyższona temperatura ciała zwierząt stałocieplnych umożliwia wzrost dynamiki procesów metabolicznych, których produktem ubocznym jest ciepło. Ta szybka produkcja ciepła jest koniecznym warunkiem regulacji temperatury ciała na poziomie 36—41°C. W celu jej zachowania wewnątrzustrojowe procesy produkcji ciepła pozostają w równowadze z rozpraszaniem ciepła do otoczenia. Oba procesy są stale wzajemnie dostosowywane, kompensując zakłócenia wywołane zmienną temperaturą otoczenia i różnym poziomem aktywności życiowej. Ich równowagę kontroluje ośrodek termoregulacji mieszczący się w podwzgórzu (Miętkiewski 1969).

Jednoczesne badania temperatury mózgu i wnętrza tułowia oraz zachowania się zwierząt w podwyższonej temperaturze otoczenia są dotychczas nieliczne. Mają one istotne znaczenie nie tylko dla zrozumienia przebiegu procesów termoregulacji, ale także dla wyjaśnienia mechanizmów zmian patologicznych rozwijających się w czasie hipertermii.

Celem pracy była ocena zmian temperatury podwzgórza i kory mózgu

oraz małżowiny usznej, mięśni karku i odbytu u królika i jego zachowania się w temperaturze otoczenia 38—39°C podczas trzygodzinnej ekspozycji.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na 30 albinotycznych królikach, obojga płci, o masie ciała 2,6—3,9 kg. Implantację termoelementów miedziowo-konstantanowych (Cu-Konst) przeprowadzono we wziewnej narkozie eterowej. Termoelementy implantowano w czterech punktach ciała: w podwzgórzu, korze mózgu, w mięśniach karku oraz na małżowinie usznej.

Termoelementy mózgowe w osłonkach szklanych, o średnicy zewnętrznej 0,5 mm, wprowadzono przez otwory trepanacyjne w sklepieniu czaszki w wywiercone wiertarką dentystyczną. Do kości czaszki przytwierdzano je przy pomocy somopolimeryzującej żywicy protetycznej Duracryl. Skórę, którą na sklepieniu czaszki przecinano w celu implantacji termoelementów, zszywano w ostatniej fazie zabiegu chirurgicznego. Miejsca i współrzędne stereotaktyczne implantowanych termoelementów określano względem BREGMA (skrzyżowanie szwu strzałkowego i wieńcowego). Termoelementy umieszczano w podwzgórzu tylnym — L-1, P-1, V-16 mm (centralny ośrodek termoregulacji) oraz w korze mózgu — L-1, P-1.

Ponadto jeden termoelement w osłonce szklanej wewnątrz cienkiej igły umieszczano w mięśniach karku w środkowym odcinku szyi na poziomie tętnicy kręgosłupowej — temperatura krwi płynącej do mózgu i zarazem temperatura wnętrza ciała. Mocowano go przy pomocy szwu z jedwabnej nitki oraz taśmy klejącej. Kolejny termoelement w osłonce szklanej mocowano na grzbietowej powierzchni małżowiny usznej nad główną tętnicą uszną (około 6 cm od końca) — miejsce intensywnej „suchej” wymiany ciepła z otoczeniem. Ponadto dokonywano pomiaru temperatury w odbycie na głębokości około 7 cm, z miejsca na ogół uważanego za reprezentujące temperaturę wnętrza ciała.

Zwierzęta z implantowanymi termoelementami umieszczano w komorze termicznej na 3 godziny, w temperaturze 38—39°C i wilgotności względnej powietrza wahającej się od 60 do 45%. Temperatura we wnętrzu komory mogła być regulowana na dowolnym poziomie w zakresie 4—60°C, natomiast wilgotność względna powietrza w zakresie 25—100%.

Czujniki termoelektryczne

Jako czujniki temperatury ciała użyte zostały termoelementy Cu-Konst w izolacji szklanej lub w izolacji szklanej i metalowej o średnicy zewnętrznej 0,5—1,0 mm. Do pomiaru temperatury odbytu zasto-

sowano termometr weterynaryjny. Termoelementy wykonywano z izolowanych drutów Cu-Konst o średnicy 0,1 mm przez skręcenie odizolowanych końców i zespawanie w łuku elektrycznym. Przed każdym doświadczeniem termoelementy kalibrowano w komorze termicznej (zawsze w tym samym miejscu) przez 1 godz., z użyciem wzorcowego termometru rtęciowego o podziałce 0,1°C.

Pomiar i rejestracja temperatury

Temperaturę rejestrowano na 12-miejscowym kompensacyjnym rejestratorze punktowym typu MKV/T12 (firmy VEB Messgerätewerk Erich Weinert, Magdeburg, NRD), wyposażonym w automatyczny przełącznik. Jego zakres pomiarowy wynosił 0—2 mV, a szerokość papieru rejestracyjnego 250 mm z podziałką 2,5 mm wyskalowaną w °C przy pomocy termoelementu Cu-Konst w komorze termicznej z termometrem wzorcowym z podziałką 0,1°C.

Zastosowanie specjalnie skonstruowanego przedwzmacniacza na wejściu rejestratora pozwalało przy stosowaniu termoelementów Cu-Konst na rejestrację temperatury z czułością 0,04°C/mm wychylenia pisaka i dokładnością około 0,05°C. Wymagało to jednak zawężenia zakresu pomiarowego do 10°C na całej skali. Zakres ten zamykał się w przedziale 35—45°C. W czasie rejestracji szybkość przesuwu papieru wynosiła 120 mm/godz.

Termoelementy umieszczone w ciele królików wyprowadzono na zewnątrz komory termicznej przez otwór wykonany w jej plastikowej przykrywie. Następnie łączono je z przedwzmacniaczem zespolonym z rejestratorem. Przedwzmacniacz podłączano do sieci co najmniej na 30 min przed rozpoczęciem rejestracji temperatury. Wyprowadzenie termoelementów w opisany sposób pozwalało królikom na swobodne poruszanie się wewnątrz komory.

Stosowano komorę termiczną o wymiarach 40 × 40 × 90 cm z regulacją temperatury i wilgotności powietrza, przedzieloną metalową kratką na dwie części. Temperaturę w komorze mierzono przy pomocy trzech termometrów rtęciowych i czujnika platynowego. Pierwszy termometr był umieszczony nad wlotem ciepłego powietrza, drugi na tej samej wysokości, na przeciwległej ścianie w odległości 90 cm. Trzeci termometr był umieszczony na dnie komory na poziomie pyszczka królika w odległości 20 cm od ścianki, w której znajdował się wlot ciepłego powietrza. Czujnik platynowy umieszczony był w odległości około 20 cm od trzeciego termometru (mniej więcej na środku komory). Pod wlotem ciepłego powietrza znajdował się higrometr włosowy. Zwierzę umieszczano w drugiej części komory z przykryciem wykonanym z przezroczystego plastiku, co pozwalało na obserwację zachowania się zwierząt.

Przebieg doświadczenia

Ogrzewanie komory włączano na godzinę przed rozpoczęciem doświadczenia. Różnica temperatur w czterech punktach komory wahała się od 0 do 3°C (średnio 1,5°C) i zależała od temperatury otoczenia. Króliki na około 2 godziny przed doświadczeniem pozbawiano pokarmu i wody. Zwierzęta umieszczano w komorze termicznej na 3 godz. W tym czasie wilgotność względna powietrza wahała się w granicach 60—45%.

Uwagi o zachowaniu się zwierząt zapisywano na papierze rejestracyjnym obok zapisów temperatury. Częstość oddechów oceniano na podstawie obserwacji wizualnej i pomiaru czasu za pomocą stopera. Wszystkie doświadczenia przeprowadzano na pojedynczych, swobodnych zwierzętach, o tej samej porze dnia i roku. Po zakończeniu doświadczeń lokalizację implantowanych termoelementów weryfikowano morfologicznie.

WYNIKI

Obserwacje kliniczne

Króliki reagowały na podwyższoną temperaturę otoczenia zmianą postawy ciała, aktywności ruchowej oraz innych przejawów zachowania się. W czasie przebywania w komorze termicznej zwierzęta przyjmowały trzy postawy ciała: normalną, spoczynkowo-aktywną (cechującą się występującymi na przemian okresami spoczynku i pobudzenia ruchowego) i wyciągniętą, z ułożeniem ciała na boku. Postawę normalną króliki przyjmowały w pierwszej godzinie przebywania w komorze; po upływie godziny zwierzęta zaczynały wykonywać ruchy obrotowe w obie strony w płaszczyźnie poziomej. Często zmieniały pozycję i podejmowały próby wydostania się z komory. Dosyć często unosiły głowę i przednimi łapami pocierały pyszczek, który w tym czasie stawał się wilgotny. W miarę narastania stresu cieplnego pojawiał się ślinotok, a zwierzęta zwilżały śliną sierść w okolicy pyszczka. Co pewien czas króliki wykonywały gwałtowne ruchy. Po upływie 1,5 godz. przyjmowały pozycję leżącą z głową uniesioną do góry i rozstawionymi uszami. Obserwowano bardzo silne przekrwienie uszu i ślinotok, a ruchy wykonywane w tym okresie były nadal gwałtowne. Po 2 godzinach nadal występował ślinotok, a króliki utrzymywały postawę leżącą z ciałem maksymalnie wyciągniętym i uniesioną głową, próbowały wydostać się z komory lub zagrzebać się w podłożu. W tym okresie zwierzęta wykazywały objawy spowolnienia ruchowego. Po 2,5 godz. nadal leżały z ciałem maksymalnie wyciągniętym, z uniesioną głową i rozstawionymi uszami. Nasilała się tendencja zagrzebania w podłożu bez zmiany ułożenia ciała. Zwierzęta były bardzo niespokojne i gwałtownie reagowały na bodźce zewnętrzne.

Przez cały okres przebywania w komorze obserwowano wzrost częstości oddechów z około 30/min do 350—400/min i więcej. Oddechy w końcowej fazie doświadczenia były bardzo płytkie.

Po zakończeniu przegrzewania zwierzęta leżały spokojnie, z maksymalnie wyciągniętym ciałem, prawie nie zmieniając pozycji. Obserwowano jednakże gwałtowne reakcje na bodźce np. słuchowe. W momencie zbliżenia się eksperymentatora, zwierzęta usiłowały wydostać się z otwartej komory, wykonywały gwałtowne skoki, a nawet usiłowały gryźć.

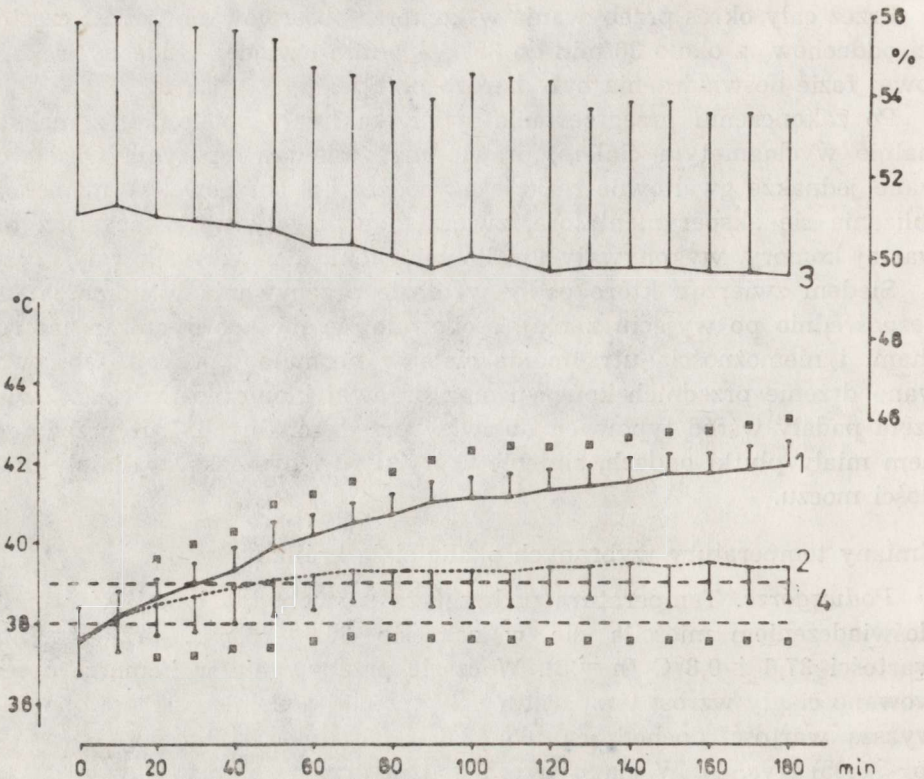
Siedem zwierząt, które padły w czasie przebywania w komorze lub bezpośrednio po wyjęciu z niej, cechowało się nieskoordynowanymi ruchami i niemożnością utrzymania ciała w normalnej pozycji. Obserwowano drżenie przednich kończyn oraz drgawki kloniczno-toniczne. Zwierzęta padały wśród typowych objawów przedagonalnych. Tuż przed zgonem miały płytki oddech, sinienie skóry uszu i pyszczka, wydalaly duże ilości moczu.

Zmiany temperatury wybranych okolic ciała królika

Podwzgórze. Temperatura podwzgórza u swobodnych królików przed doświadczeniem mieściła się w zakresie 36,6—38,5°C, przy średniej wartości $37,6 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ ($n = 6$). W czasie przebywania w komorze obserwowano ciągły wzrost temperatury. W trzeciej godzinie osiągała ona najwyższą wartość dochodzącą do 42,8°C, średnio $41,9 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ($n = 6$) ($p < 0,05$) (ryc. 1). W ciągu trzech godzin przebywania zwierząt w temperaturze otoczenia 38—39°C obserwowano wzrost temperatury podwzgórza od 3,3 do 5,7°C, przy średniej wartości $4,4 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ($n = 6$). W ciągu 4 godzin obserwacji po doświadczeniu temperatura podwzgórza nie ulegała normalizacji.

Kora mózgu. Temperatura kory mózgu u swobodnych królików przed umieszczeniem w komorze wahała się pomiędzy 36,1—38,9°C, przy średniej wartości $37,6 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ($n = 13$). Przez cały czas doświadczenia stwierdzano powolny, ale systematyczny wzrost temperatury, której najwyższa wartość w 3 godz. wynosiła 41,4°C, średnio $39,4 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ($n = 13$) ($p < 0,05$) (ryc. 1). W czasie doświadczenia wzrost temperatury kory mózgu wynosił od 0,7 do 2,8°C, średnio $1,8 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$ ($n = 13$). Po trzech godzinach od zakończenia doświadczenia temperatura kory mózgu w pojedynczych przypadkach osiągała wartości kontrolne.

Mięśnie karku. Temperatura mięśni karku przed umieszczeniem zwierząt w komorze wahała się od 35,8 do 39,7°C, średnio wynosiła $37,8 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ($n = 21$). W czasie doświadczenia stwierdzano systematyczny wzrost temperatury od 1,4 do 6,3°C, średnio o $3,1 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ($n = 21$). Najwyższa notowana temperatura wynosiła 44,2°C, przy czym zwierzęta z takim wzrostem temperatury mięśni karku padały w trakcie doświadczenia lub bezpośrednio po nim. U zwierząt, które przeżyły, najwyższa



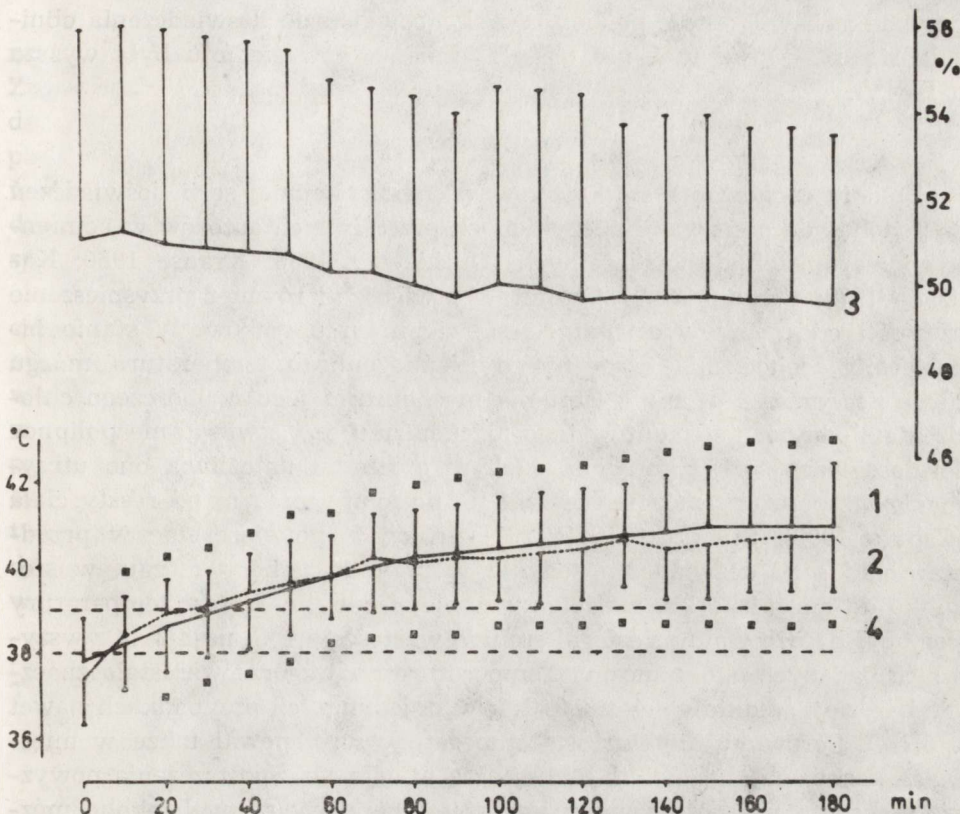
Ryc. 1. Przebieg zmian średnich wartości temperatury podwzgórza (1) ($n=6$) i kory mózgu (2) ($n=13$) u królików oraz wilgotności względnej powietrza (3) ($n=23$) podczas 3-godzinnej ekspozycji zwierząt w komorze termicznej o temperaturze powietrza $38-39^{\circ}\text{C}$ (4); n = liczba doświadczeń; czarnymi kwadracikami oznaczono prawdopodobieństwo $p < 0,05$

Fig. 1. Changes of mean temperature in hypothalamus (1) ($n=6$) and cerebral cortex (2) ($n=13$) of the rabbits and of relative air humidity (3) ($n=23$) during a 3-hour exposure of the animals in a thermic chamber to $38-39^{\circ}\text{C}$ (4); n = number of experiments; black squares — probability $p < 0,05$

temperatura wynosiła $42,5^{\circ}\text{C}$, średnio $40,9 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ ($n = 21$) ($p < 0,05$) (ryc. 2). W ciągu czterech godzin po doświadczeniu nie obserwowano powrotu temperatury do normy.

Małżowina uszna. Temperatura małżowiny usznej przed doświadczeniem wahała się od $35,0$ do $38,6^{\circ}\text{C}$, przy średniej wartości $37,4 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$ ($n = 23$). W trakcie doświadczenia temperatura wzrastała od $1,5$ do $7,4^{\circ}\text{C}$, przy średniej wartości $3,3 \pm 1,7^{\circ}\text{C}$ ($n=23$). Najwyższa notowana temperatura po doświadczeniu wynosiła $42,4^{\circ}\text{C}$, średnio $40,7 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ ($n=23$) ($p < 0,05$) (ryc. 2). W jednym przypadku, w którym zwierzę padło, temperatura małżowiny usznej wynosiła $43,4^{\circ}\text{C}$, a temperatura mięśni karku przewyższała 43°C . Temperatura małżowiny usznej osiągała wartości kontrolne po upływie 10–50 min od zakończenia doświadczenia.

Odbyt. Temperatura odbytu przed doświadczeniem wahała się od $37,5$ do $39,5^{\circ}\text{C}$, średnio $38,8 \pm 0,6^{\circ}\text{C}$ ($n = 26$). W trakcie doświadczenia obser-



Ryc. 2. Przebieg zmian średnich wartości temperatury mięśni karku (1) ($n=21$) i małżowin usznych (2) ($n=23$) u królików oraz wilgotności względnej powietrza (3) ($n=23$) podczas 3-godzinnej ekspozycji zwierząt w komorze termicznej o temperaturze powietrza $38-39^{\circ}\text{C}$ (4); n = liczba doświadczeń; czarnymi kwadracikami oznaczono prawdopodobieństwo $p < 0,05$

Fig. 2. Changes of mean temperature in neck muscles (1) ($n = 21$) and ear auricles (2) ($n=23$) of the rabbits and of relative air humidity (3) ($n=23$) during 3-hour exposure of the animals in a thermic chamber to $38-39^{\circ}\text{C}$ (4); n = number of experiments; black squares — probability $p < 0,05$

wowano wzrost temperatury od $1,4$ do $5,4^{\circ}\text{C}$, średnio $3,1 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ($n = 26$). Najwyższa temperatura odbytu po doświadczeniu wynosiła $42,7^{\circ}\text{C}$, średnio $41,9 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$ ($n = 26$) ($p < 0,001$). W ciągu trzech godzin po doświadczeniu obserwowano powrót temperatury do normy. Jednakże zwierzęta, u których temperatura po doświadczeniu przekraczała 43°C padały w krótkim czasie po jego zakończeniu.

Wilgotność względna powietrza

Zmiany wilgotności względnej powietrza w komorze termicznej przy temperaturze powietrza $38-39^{\circ}\text{C}$ przedstawiono na rycinach 1 i 2. W 11

przypadkach wilgotność powietrza w końcowej fazie doświadczenia obniżała się o 2—12⁰/₀, w 5 nie ulegała zmianie, a w siedmiu była wyższa o 1—4⁰/₀.

OMÓWIENIE

Zmiany zachowania się królików w przedstawionej serii doświadczeń są podobne do obserwacji poczynionych przez innych autorów w odmiennych warunkach doświadczalnych (Dutkiewicz 1956; Krause 1960; Kądziała 1979; Caputa 1980). Autorzy ci stwierdzali również przyspieszenie częstości oddechów w ostrym stresie cieplnym u ssaków. W stanie hipertermii pochodzenia egzogenego i endogenego temperatura mózgu ulega podwyższeniu, mimo istnienia mechanizmu jego wybiórczego chłodzenia. Jednym z elementów tego mechanizmu jest stwierdzane polipnoe termoregulacyjne. W gorącym, suchym otoczeniu umożliwia ono utrzymanie temperatury mózgu zwierząt na poziomie niższym od reszty ciała (Caputa 1980). Stwierdzenie to znalazło swoje potwierdzenie w przedstawionej serii doświadczeń jedynie w przypadku kory mózgu, w stosunku do mięśni karku, małżowiny usznej i odbytu. Wzrost temperatury kory był bardzo wolny i osiągał średnią wartość 39,4°C, najniższą z wszystkich badanych okolic mózgu. Temperatura podwzgórza wzrastała znacznie bardziej, średnio o $4,4 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$, a w pojedynczych przypadkach nawet o 5,7°C. Porównywalny wzrost temperatury występował także w mięśniach karku, na małżowinie usznej oraz w odbycie. Spostrzeżenia powyższe wskazują na zróżnicowany wzrost temperatury różnych okolic mózgowia w warunkach przegrzania. Szczególnie istotny wydaje się fakt znacząco niższej temperatury kory mózgu, przy temperaturze podwzgórza zbliżonej do występującej w innych okolicach ciała. Sugeruje to z jednej strony istnienie odrębnego mechanizmu „zabezpieczającego termicznie” korę mózgu, a z drugiej zapewniającego podwzgórzowi osiągnięcie wartości temperatur zgodnych z występującymi w organizmie. To ostatnie wydaje się szczególnie ważne z punktu widzenia termoregulacyjnych funkcji badanej okolicy podwzgórza.

Jest wysoce prawdopodobne, że wymiana cieplna między krwią czaszkowych rozlewisk żylnych, łączących się z siecią naczyniową nosa, odgrywającą istotną rolę w chłodzeniu krwi, a odległymi okolicami mózgu zachodzi za pośrednictwem płynu mózgowo-rdzeniowego. Można przypuszczać, że przewodnictwo cieplne płynu jest wyższe niż dużych objętościowo struktur tkankowych mózgu. Podstawowe znaczenie dla odprowadzania ciepła z mózgowia tą drogą ma zapewne konwekcja termiczna cieczy. O roli płynu mózgowo-rdzeniowego w chłodzeniu mózgu może świadczyć fakt, że jego temperatura w komorze bocznej jest niższa od temperatury centralnych struktur mózgowych (Caputa 1980). Wyjaśniałoby to znaczną różnicę temperatur pomiędzy podwzgórzem a korą mózgu.

W badaniach własnych nie stwierdzono stabilizacji temperatury mózgu na poziomie 40,4—40,5°C opisanej przez Kądziałę (1979) i Caputę (1980). Zapewne należy to wiązać z faktem, że króliki nie były przygotowywane do przebywania w podwyższonej temperaturze otoczenia, jak w przypadku badań tych autorów. Należy przy tym zaznaczyć, że w przedstawionym materiale pewne cechy stabilizacji temperatury odnotowano jedynie w przypadku kory mózgu, jednakże na niższym poziomie niż opisują to zarówno Kądziała (1979), jak i Caputa (1980).

W skrajnych przypadkach, kiedy temperatura wnętrza ciała przekraczała 43°C, zwierzęta padały. Wydaje się bardzo mało prawdopodobne, aby śmierć następowała w wyniku istotnych zmian w narządach wewnętrznych. Potwierdzeniem tego są spostrzeżenia Stroma i wsp. (1979), w których wykazano, że miejscowe ogrzanie narządów wewnętrznych prowadzi do ich uszkodzenia dopiero przy temperaturze zbliżonej do 45°C. W oparciu o własne spostrzeżenia kliniczne i pomiary temperatury w wybranych miejscach ciała wydaje się, że do śmierci zwierząt dochodziło z przyczyn mózgowych, po przekroczeniu temperatury 42,5°C w podwzgórze.

TEMPERATURE CHANGES IN THE BRAIN AND IN SOME BODY REGIONS AND BEHAVIORAL CHANGES IN A RABBIT EXPOSED TO ELEVATED TEMPERATURE

Summary

The experiments were performed on 30 Albino rabbits. The animals were kept in a thermic chamber at 38—39°C with relative humidity of 60—45% for 3 h. A statistically significant increase of temperature was measured in hypothalamus, cerebral cortex, neck muscles, ear auricle and rectum. Elevation of the temperature above 42.5°C in hypothalamus and above 43°C in the body was observed to lead to death with accompanying cerebral symptoms. The increase of temperature in the cortex differed from that in hypothalamus where it was close to that in other parts of the body.

ИЗМЕНЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ МОЗГА И ВЫБРАННЫХ ОБЛАСТЕЙ ТЕЛА КРОЛИКА И ЕГО ПОВЕДЕНИЯ В ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЕ ОКРУЖЕНИЯ

Резюме

Эксперимент был проведен на 30 кроликах-альбиносах. Животных помещали в термическую камеру с температурой воздуха 38—39°C и относительной влажностью 60—45% на 3 часа. Наблюдался характерный рост температуры гипоталамуса, коры мозга, мышц шеи, ушной раковины и ануса. Было установлено, что превышение температуры 42,5°C в гипоталамусе и 43°C внутри тела ведет к гибели животных при мозговых симптомах. Был обнаружен дифференцированный прирост температуры коры мозга по сравнению с гипоталамусом, в котором температура была сходна с температурой в других областях тела.

PIŚMIENICTWO

1. Caputa M.: Mechanizm zabezpieczający wybiórczo komfort termiczny mózgu u średnich i dużych ssaków. Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, Toruń 1980.
2. Dutkiewicz J. S., Giec L., Krause M., Strzoda L.: Dalsze zmiany zachodzące w ustroju człowieka przebywającego w spoczynku w suchym gorącu. *Acta Physiol. Pol.*, 1956, 7, 159—168.
3. Gwóźdź B., Dyduch A., Grzybek H., Panz B.: Structural changes in brain mitochondria of mice subjected to hyperthermia. *Exp. Path. Bd.*, 1978, 15, 124—126.
4. Heikkilä J. J., Brown J. R.: Hyperthermia and disaggregation of brain polyosomes induced by bacterial pyrogen. *Life Sci.*, 1979, 25, 347—352.
5. Hensel H., Brück K., Raths P.: Homeothermic organisms. W: *Temperature and life*. Red. H. Precht, J. Christophersen, H. Hensel, W. Larcher. Springer-Verlag, Berlin, New York 1973, 505—761.
6. Kądział W.: Rozkład temperatury wewnątrz i na powierzchni ciała jako wskaźnik dynamiki procesów termoregulacyjnych. Rozprawa habilitacyjna. Uniwersytet im. Mikołaja Kopernika, Toruń 1979.
7. Krause M.: O wpływie wysokiej temperatury na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) w świetle badań doświadczalnych. *Med. Pracy*, 1960, 11, 341—351.
8. Miętkiewski E.: Kurs wykładów fizjologii człowieka. PZWL, Warszawa 1969, 424—432.
9. Schmidt-Nielsen K.: *Fizjologia zwierząt*. PWN, Warszawa 1964, 64—80.
10. Strom F. K., Harrison W. H., Elliot R. S., Morton D. L.: Normal tissue and solid tumor effects of hyperthermia in animal models and clinical trials. *Cancer Res.*, 1979, 39, 2245—2251.

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

ANNA ZARĘBA-KOWALSKA, BARBARA GAJKOWSKA

EFFECT OF HYPERTHERMIC SHOCK ON THE ULTRASTRUCTURE OF CULTURED PITUICYTES

Department of Neuropathology and Laboratory of Electron Microscopy, Medical
Research Centre, Polish Academy of Sciences

It is known that even minor temperature changes influence cell metabolism. At temperatures above 40°C mammalian cells are unable to divide, their growth is arrested and protein synthesis is inhibited (McCormick, Penman 1969; Warocquier, Scherrer 1969). The studies performed on several types of mammalian cells cultured *in vitro* subjected to hyperthermic stress have revealed striking morphological and biochemical changes in both DNA- and RNA-containing structures of nucleus and nucleolus (Simard, Bernhard 1967; Amalric et al. 1969; Simard et al. 1969; Heine et al. 1971; Cervera 1978; Cervera, Montero 1980). The increase in the environmental temperature from 37° to 41° up to 45°C partially or completely blocks the ribosomal RNA synthesis and inhibits transfer of ribosomal RNA (rRNA) to the cytoplasm as well found in ascites tumor cells of the hepatoma of Zajdela (Amalric et al. 1969). At the same time ribosomal precursor granules disappear, probably by reconversion into fibrils, and the intranucleolar chromatin is greatly diminished. The authors also reported that the effects caused by elevated temperatures are reversible and after return to normal temperature recovery of the cells is complete (Amalric et al. 1969; Heine et al. 1971).

So far, cells of neuroectodermal origin have not been examined for the morphological effects of supranormal temperatures. We have chosen hypophyseal neural lobe cultures from newborn rats as an experimental model already used in our laboratory. The aim of this study was to follow at the ultrastructural level the time course of events after hyperthermic shock with respect to activity of nucleus and other cellular organelles in neurohypophyseal glial cells (pituicytes).

MATERIAL AND METHODS

Sixty newborn, Wistar rats of both sexes were decapitated, the cranial cavity opened and the brain removed. The neural lobes were separated from the pars distalis and pars intermedia 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% saline extract of 9-day-old chicken embryo. It was supplemented with glucose (600 mg/100 ml) and penicillin (100 units/ml). The pH of the medium ranged from 7.0 to 7.3. The cultures were monitored in the living state by light microscopy. Selected 14-day-old cultures were then placed in an incubator previously warmed to the required temperature, which ranged from 41°C to 42°C, and subjected to thermic shock for three hours. After hyperthermia, the cultures were either fixed immediately for electron microscopy (0 group) or transferred to a new maintenance medium and allowed to grow at 37°C for 3 h (I group) and for 24 h (II group) so that their ability to recover from the effect of heat shock could be studied. Next, they were fixed for electron microscopy. Control experiments were simultaneously carried out in which cells were cultured normally (at 37°C).

For electron microscopy the tissue cultures were briefly rinsed in Locke's solution at room temperature, fixed in 1.5% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer (pH 7.2, for 30 min at 4°C), 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. After dehydration in ethanols 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.

Histochemical procedure

In all groups of tissue cultures the activity of the following enzymes in pituicytes was determined: glucose-6-phosphate dehydrogenase — G-6-PDH (according to Hess et al. 1958), succinate dehydrogenase — SDH (Novikoff 1963), and lactate dehydrogenase — LDH (Hess et al. 1958). Histochemical demonstration of the enzymes was carried out on living, unfixed cultures, which were subsequently examined with a light microscope.

RESULTS

Electron microscopic study

Controls. The morphological picture of neurohypophyseal glial cells has been previously described (Gajkowska, Zaręba-Kowalska 1982; Zaręba-Kowalska et al. 1983). Fourteen day cultured pituicytes were ir-

regular in shape and extended numerous finger-like and villiform processes into the extracellular space. The cell membranes were in close apposition due to well-developed junctional complexes. Complex junctions, i.e., tight junctions combined with small gap junctions as well as intermediate junctions and spot desmosomes were recognized as interpituitary contacts (Fig. 1). Pituicytes had large, oval nuclei with marginal

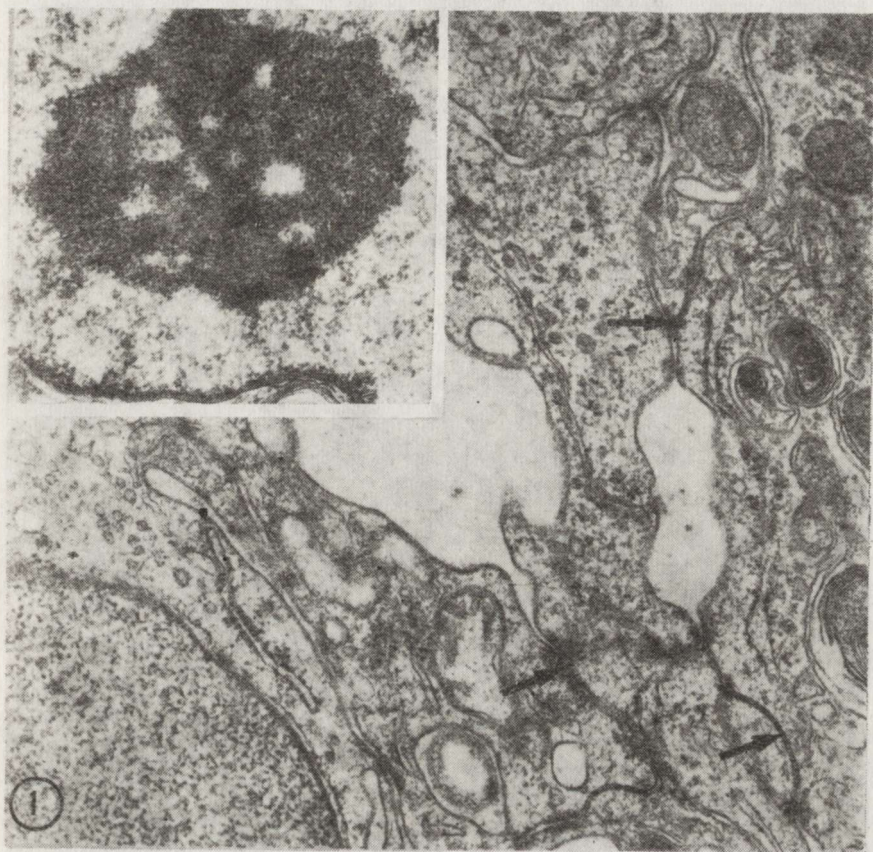


Fig. 1. Control group. Note numerous junctional complexes interposed between pituicytes (arrows). $\times 13\,350$. Insert — normal nucleolus. $\times 17\,800$

Ryc. 1. Grupa kontrolna. Widoczne złącza między pituicytami (strzałki). Pow. $13\,350 \times$. Insert — jąderko o prawidłowej budowie ultrastrukturalnej. Pow. $17\,800 \times$

heterochromatin. Major part of chromatin was distributed evenly throughout the nucleus while its certain amounts were condensed and aggregated beneath nuclear membrane and throughout the nucleolus. The nucleoli were not prominent structures and consisted of the fibrillar and granular elements of the nucleolonema which formed an irregular network. In the meshes of the nucleolonema clumps of intranucleolar chromatin and fibrillar centres were seldom found. The fibrillar centres

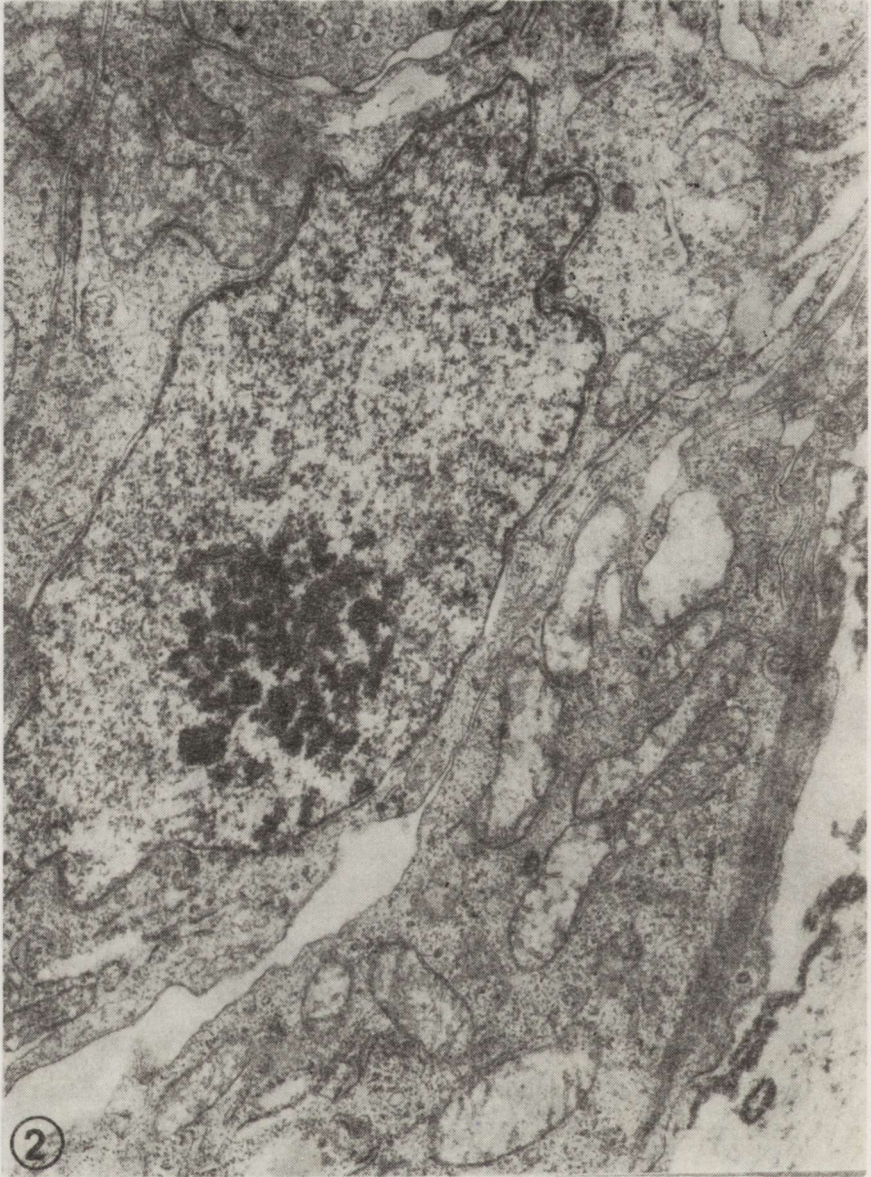


Fig. 2. Group 0 after thermic shock. Nucleus showing folded nuclear envelope and chromatin-poor nucleoplasm with light places and local concentrations of chromatin granules. Nucleolus consists of aggregated fibrillar material. $\times 10\ 875$
Ryc. 2. Grupa 0 po szoku termicznym. Widoczne jądro z pofałdowaną otoczką i nukleoplazmą ubogą w chromatynę, z przejaśnieniami i miejscowymi skupieniami ziarnistości chromatynowych. Jąderko zbudowane ze zbitego materiału włóknistego. Pow. $10\ 875 \times$



Fig. 3. Group 0 after thermic shock. The pituicyte exhibits "degranulated" nucleolus consisting of aggregated fibrillar material. Note enlarged intercellular spaces and absence of junctional complexes between pituicytes. $\times 13\ 050$

Ryc. 3. Grupa 0 po szoku termicznym. Pituicyt ze zmienionym jąderkiem, wykazującym zanik części ziarnistej, zbudowanym ze zbitego materiału włóknienkowego. Widoczne powiększone przestrzenie międzykomórkowe oraz brak złącz między pituicytami. Pow. 13 050 \times



Fig. 4. Group I after thermic shock. Enlarged RER cisternae (arrows) are filled with electron-dense substance, one of them shows connection between nuclear envelope. In nucleus light places and local concentrations of chromatin granules are visible. $\times 13\ 050$

Ryc. 4. Grupa I po szoku termicznym. Poszerzone cysterny siateczki ziarnistej (strzałki) wypełnione substancją elektronowo-gęstą, jedna z cystern kontaktuje się z otoczką jądrową. W jądrze widoczne miejscowe przejaśnienia i skupienia ziarnistości chromatynowych. Pow. $13\ 050 \times$

were composed of loose fibrillar substance (Fig. 1 — insert). Interchromatin granules were rarely observed. Perichromatin granules were irregularly distributed in aggregations of chromatin beneath nuclear membrane and in the nucleoplasm. The cytoplasm was abundant and contained prominent Golgi complexes and well developed granular and smooth endoplasmic reticulum. A moderate number of mitochondria as well as numerous ribosomes and polysomes were present. The lysosomes and lipid droplets were few.

Cultures which have been maintained for three hours at elevated temperature ($41\text{--}42^{\circ}\text{C}$) revealed changes in nuclei and characteristic lesions of nucleoli. The cells examined immediately after incubation at higher temperature disclosed nuclei irregular in shape with folded nuclear envelope (Fig. 2). Most of the nucleolar bodies revealed striking changes (Figs 2, 3, 4, 5). They showed a loss of the major part of its granular component although some granules were still observed. The nucleolus consisted exclusively of condensed particles and closely packed fibrils. Aggregates of tight fibrillar material were present in the meshes of the nucleolonema and at the nucleolar periphery. The disorganization of the nucleolar structure was accompanied by ultrastructural changes

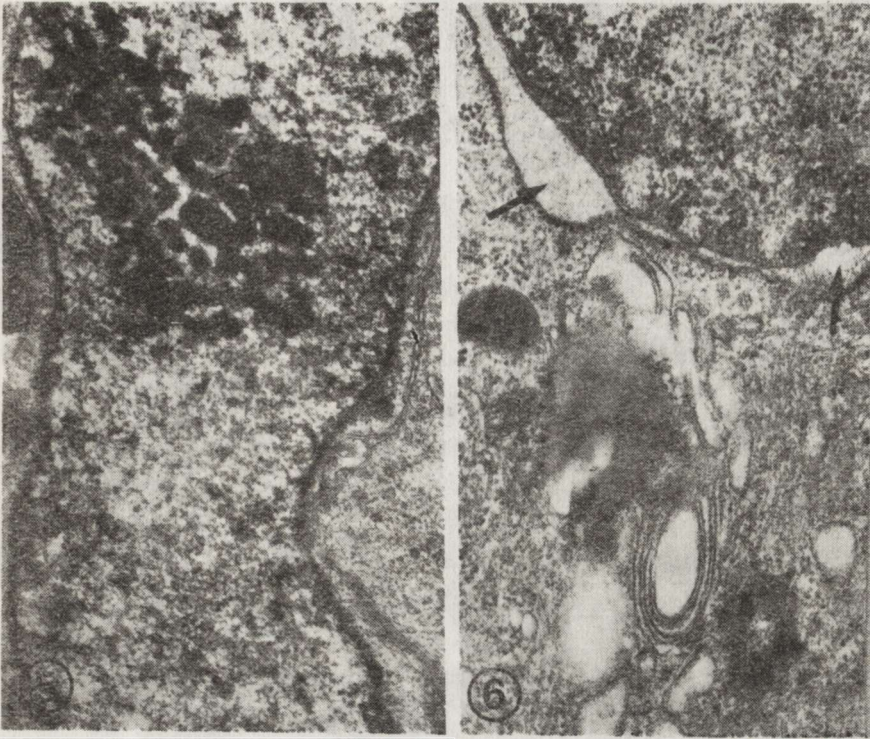


Fig. 5. Group I after thermic shock. Fragment of pituicyte. Note degranulation of the nucleolus. In nucleus light places and local concentrations of chromatin granules are observed. $\times 10\ 875$

Ryc. 5. Grupa I po szoku termicznym. Fragment pituicyta. Widoczna degranulacja jąderka. W jądrze widoczne miejscowe przejaśnienia i skupienia ziarnistości chromatynowych. Pow. $10\ 875 \times$

Fig. 6. Group I after thermic shock. Fragment of pituicyte. Dilatations of space between external and internal membranes of nuclear envelope are visible (arrows). $\times 32\ 700$

Ryc. 6. Grupa I po szoku termicznym. Fragment pituicyta. Widoczne poszerzenia przestrzeni pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną błoną otoczki jądrowej (strzałki). Pow. $32\ 700 \times$

of the nucleoplasm, which appeared electron-transparent and poor in granular ribonucleoprotein components (Figs 2, 3, 4). The cytoplasmic structures were perfectly preserved. The only changes observed were dilatations of granular endoplasmic reticulum and moderate swelling of some mitochondria (Fig. 2). In the majority of cells the mitochondria were normal (Fig. 3). The RER channels were filled with an amorphous substance of moderate electron-density and showed distinct connections both with the nuclear envelope as well as with the plasmalemma (Fig. 4). In some cells the nuclear envelope exhibited large dilatations of space between external and internal membranes (Fig. 6). The cultures subjected to elevated temperature showed a loss of tissue integrity. The junctional complexes between the cells were rarely found in comparison with con-

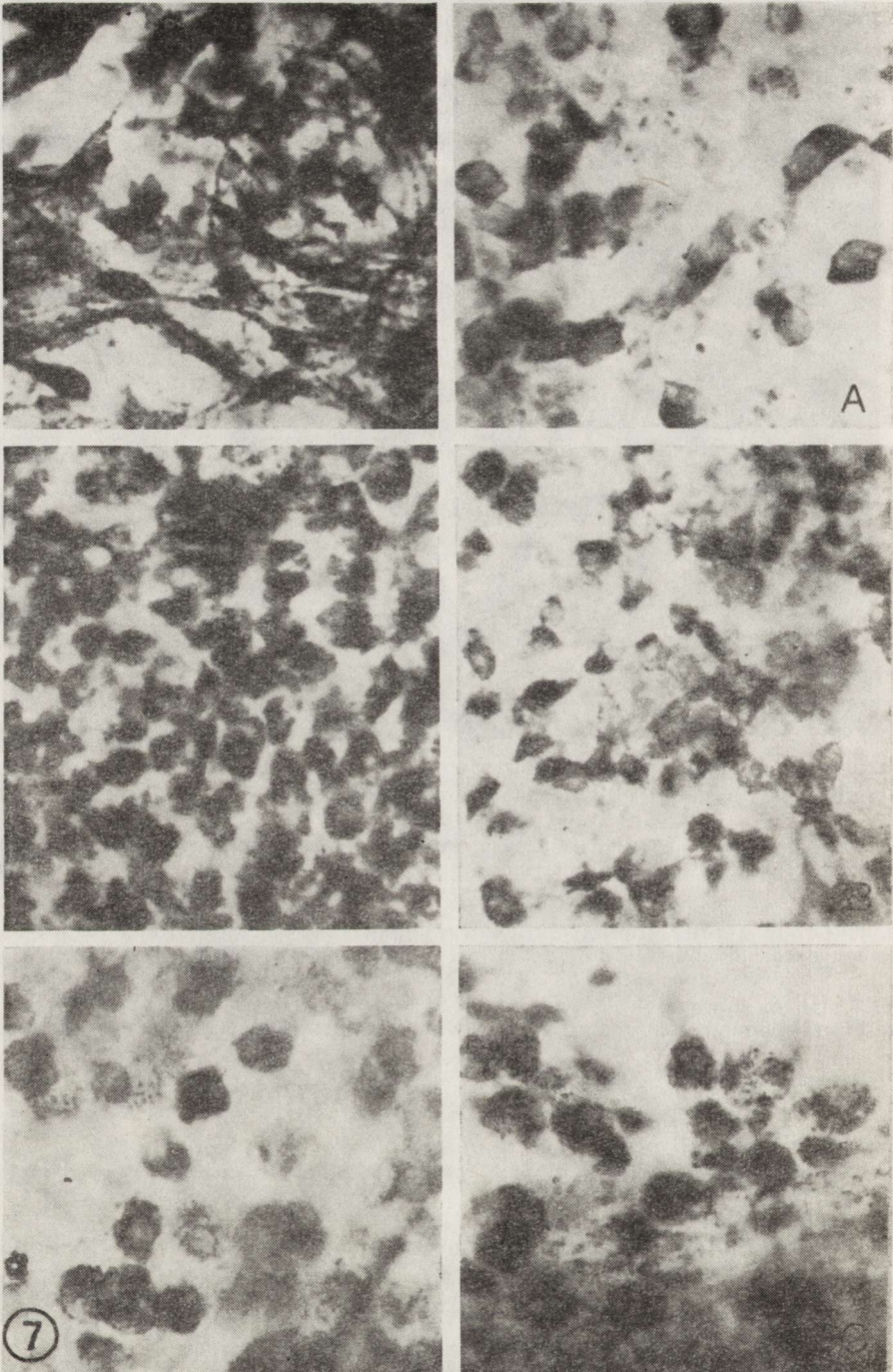


Fig. 7. Histochemical demonstration of activity of dehydrogenases: A) G-6-PDH, B) SDH, C) LDH. On the left site control cells, on the right site cells after thermic shock (Group 0). $\times 400$

Ryc. 7. Obraz histochemiczny aktywności dehydrogenaz: A) G-6-P, B) SDH, C) LDH. Po lewej stronie komórki kontrolne, po prawej komórki po szoku termicznym (grupa 0). Pow. $400 \times$

control cells. Larger intercellular spaces probably resulting from separation of junctional complexes were observed (Figs 3, 4).

The changes persisted over 3 hours lasting reincubation (I group) at 37°C. All the above described nuclear and nucleolar abnormalities were entirely reversible within 24 hours if the cells were reincubated at 37°C even after a long exposure to thermic shock (group II). The nucleus had a normal shape and the nucleoplasm was not distinguishable from that of control cells. The cytoplasm was unchanged. Only lysosomes appeared to be more numerous than in control cells.

Histochemical changes

Histochemical demonstration of the activity of G-6-P, SDH and LDH dehydrogenases revealed changes in the intensity of histochemical reaction in "0" and I groups in comparison to control and II groups. G-6-PDH and SDH activity as compared with that in control cells decreased immediately after thermic shock and persistently decreased for three hours, while LDH activity increased (Fig. 7). In the II group, i.e., 24 hours after thermic shock, the histochemical picture of all dehydrogenases studied did not change essentially and was very similar to that observed in control cells. The return of the activity of all enzymes studied to control values was noted.

DISCUSSION

After hyperthermic shock of cultured hypophyseal neural lobe, ultrastructural changes in pituicyte nuclei and nucleoli were apparent. A major part of the granular form of the nucleolar ribonucleoproteins disappeared. This was associated with retraction of intranucleolar chromatin. Only closely packed fibrillar ribonucleoproteins were well preserved. Heated pituicytes showed the ability to recover from nucleolar lesions within 24 hours of return to normal temperature. Reversible changes in pituicytes were associated with the reappearance of a considerable amount of nucleolar chromatin and granular ribonucleoproteins. There were no significant changes in the cytoplasm of pituicytes after hyperthermia. Our observations showed, however, that neural lobe tissue lost its integrity when cultured at 41–42°C. The action of supranormal temperature resulted in separation of junctional complexes in heated cells.

Our studies confirm previous observations which revealed that the nucleolus is the site of a thermosensitive cellular function. It was shown that exposure of mammalian cells cultivated *in vitro* to hyperthermia evokes nuclear and nucleolar changes both morphological and metabolic (Simard, Bernhard 1967; Amalric et al. 1969; Simard et al. 1969; Heine et al. 1971; Cervera 1978; Cervera, Montero 1980). The characteristic lesion of the nucleolus evoked by supranormal temperature was pre-

viously described and called "nucleolar degranulation" (Simard, Bernhard 1967). It is known that the major function of the nucleolus is the synthesis of RNA. Ribosomal RNA is formed as 45 S pre-ribosomal RNA which is metabolized to functional 28 S and 18 S rRNA through a sequence of discrete stages involving 41 S, 36 S and 32 S pre-rRNA (Scherrer et al. 1963). Heine et al. (1971) revealed that morphological changes in the nuclei and nucleoli of HeLa-S₃ cells subjected to supranormal temperatures (41°C to 45°C) were associated with the inhibition of nucleolar RNA synthesis and cleavage of 45 S ribosomal precursor RNA as well as the inhibition of the transfer of ribosomal RNA to the cytoplasm. The disappearance of the granular form of ribonucleoproteins after hyperthermic shock was observed by several authors. Simard et al. (1969) suggested that granular ribonucleoproteins are very thermosensitive and are a transitory configurational form of ribonucleoproteins which may be associated with the transport of RNA from the nucleolus to the cytoplasm. The fibrillar ribonucleoproteins were considered to be a more stable form in which the nucleolar RNA could be "pooled". Ultrastructural and high resolution autoradiographic studies (Cervera 1978) carried out on HEp-2 cells revealed, furthermore, that at 42°C the rate of amino acid incorporation and the synthesis and maturation of rRNA decreased. These changes were reversible when cells were returned to 37°C. The recovery of synthesis and processing of pre-rRNA occurred later than that of protein synthesis. Thus the inhibition of protein synthesis by thermic shock resulted in the reduction of nucleolar transcription and pre-rRNA maturation.

Histochemical demonstration revealed changes in the enzyme activity of glucose-6-phosphate, succinate and lactate dehydrogenases in pituicytes subjected to supranormal temperature as compared with the activity of these enzymes in control cells. They are a morphological reflection of metabolic disturbances in heated cells. A common feature of histochemical disorders in the pituicytes was their reversibility within 24 hours of return to normal temperature. The observed decrease of G-6-P dehydrogenase activity may be considered to indicate an inhibition of the pentose pathway of glucose metabolism, hence also a slow-down of the metabolic processes in pituicytes in response to hyperthermia. The decrease of SDH activity may be evidence of inhibition of oxygen metabolism in heated cells. This was associated with an increase in LDH activity which indicates enhanced glycolytic activity in pituicytes subjected to prolonged hyperthermia.

In conclusion, the main result of this work was that hyperthermic shock evoked morphological changes of degranulation type in the nucleoli. These changes indicated disturbances in nucleolar metabolism. On the other hand, in cytoplasmic structures there were no distinct changes, apart from minor swelling of mitochondria in some cells investigated. The nuclear and nucleolar changes observed were entirely reversible.

WPLYW SZOKU HIPERTERMICZNEGO
NA ULTRASTRUKTURĘ HODOWANYCH PITUICYTÓW

Streszczenie

Badano ultrastrukturę pituicytów poddanych działaniu 3 godzinnej hipertermii (41–42°C) *in vitro*.

Największe nieprawidłowości zaobserwowano w budowie ultrastrukturalnej jąderka; struktury cytoplazmatyczne pozostawały bez zmian. Szok hipertermiczny prowadził do uszkodzenia jąderka powodując jego degranulację. Zmiany te obserwowano bezpośrednio i po 3 godz. po doświadczeniu. Natomiast obserwacje prowadzone po upływie 24 godz. od zakończenia doświadczenia nie wykazywały nieprawidłowości w budowie ultrastrukturalnej pituicytów. Obserwowane zmiany miały zatem charakter odwracalny. Badania histoenzymatyczne wykazały spadek aktywności niektórych enzymów (G-6-P dehydrogenazy, SDH) w badanych pituicytach podczas hipertermii, co wskazuje na obniżenie metabolizmu komórkowego pozostającego w związku ze zmienioną funkcją jądra komórkowego.

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИЧЕСКОГО ШОКА НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ
КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ПИТУИЦИТОВ

Резюме

Была исследована ультраструктура питуицитов, подвергнутых действию 3 часовой гипотермии (41–42°C) *in vitro*.

Наибольшие нарушения наблюдались в ультраструктурном строении ядрышка; цитоплазматические структуры оставались без изменений. Гипертермический шок приводил к повреждению ядрышка, вызывая его дегрануляцию. Эти изменения наблюдались непосредственно после эксперимента и через три часа после окончания эксперимента. Наблюдения проведенные через 24 часа после окончания эксперимента не показали нарушений в ультраструктурном строении питуицитов. Следовательно, наблюдаемые изменения имели обратимый характер. Гистоэнзиматические исследования выявили падение активности некоторых энзимов (G-6-P дегидрогеназа, SDH) в исследуемых питуицитах во время гипотермии, что указывает на измененную функцию клеточного ядра.

REFERENCES

1. Amalric F., Simard R., Zalta J. P.: Effet de la température supra-optimale sur les ribonucléoprotéins et le RNA nucléolaire. II. Etude biochimique. *Exp. Cell Res.*, 1969, 55, 370–377.
2. Cervera J.: Effects of thermic shock on HEP-2 cells. An ultrastructural and high-resolution autoradiographic study. *J. Ultrastruct. Res.*, 1978, 63, 51–63.
3. Cervera J., Montero M. R.: Effects of thermic shock on HEP-2 cells. III. Accumulation of perichromatin granules. *J. Ultrastruct. Res.*, 1980, 71, 1–13.
4. Gajkowska B., Zaręba-Kowalska A.: The junctions between rat pituicytes maturing *in vitro*. *Neuroendocrinol. Lett.*, 1982, 4, 335–342.
5. Heine U., Sverak L., Kondratick J., Bonar R. A.: The behavior of HeLa-S₃ cells under the influence of supranormal temperatures. *J. Ultrastruct. Res.*, 1971, 34, 375–396.
6. Hess R., Scarpelli D., Pearse A.: The cytochemical localization of oxidative enzymes. II. Piridine nucleotide linked dehydrogenase. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1958, 4, 753–760.

7. McCormick W., Penman S.: Regulation of protein synthesis in HeLa cells: Translation at elevated temperatures. *J. Mol. Biol.*, 1969, 39, 315—333.
8. Novikoff A. B.: Electron transport enzymes, biochemical and tetrazolium studies. Proc. I Intern. Congress Histochem. Cytochem. Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris 1963, 465—841.
9. Scherrer K., Latham H., Darnell J. E.: Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to ribosomal RNA in HeLa cells. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.*, 1963, 49, 240—251.
10. Simard R., Bernhard W.: A heat sensitive cellular function located in the nucleolus. *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 61—67.
11. Simard R., Amalric F., Zalta J. P.: Effet de la température supra-optimale sur les ribonucléoprotéines et la RNA nucléolaire. I. Etude ultrastructurale. *Exp. Cell Res.*, 1969, 55, 359—369.
12. Warocquier R., Scherrer K.: RNA metabolism in mammalian cells at elevated temperature. *Europ. J. Biochem.*, 1969, 10, 362—370.
13. 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: Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences, 3, Dworkowa Str., 00-784 Warszawa

Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Teresa Piórek: Neuropathological picture of intensive linguo-facial dyskinesia	387
Lesław J. Maziarz, Józef Szczech: Morphological and histoenzymatic changes in the brain of young and adult rats after CCUN (Lomustine) administration	399
Antoni Godlewski, Józef Szczech: Histoenzymatic changes of brain white matter of young rats from mothers treated by vincristine during the second part of gestation	415
Ryszard Pluta: Temperature changes in the brain and in some body regions and behavioral changes in a rabbit exposed to elevated temperature	435
Anna Zareba-Kowalska, Barbara Gajkowska: Effect of hyperthermic shock on the ultrastructure of cultured pituicytes	445

СОДЕРЖАНИЕ

Мирослав Я. Моссаковский: Мирослав Б. Козик	297
Ирена Хаусманова-Петрусевич, Анна М. Каминьска: Диагностическая ценность количественной электромиографии и мышечной биопсии при миопатических болезнях. Описание 464 случаев	307
Халина Эвинраудер, Анна Заремба-Ковальска: Иммунофлюоресцентна демонстрация кислого глиозного фибриллярного белка (GFAP) в нервной доли гипофиза in vitro	335
Мирослав Я. Моссаковский, Барбара Гайковска: Влияние индометацина на ультраструктурную картину ранних ишемических повреждений мозга монгольского хомяка (<i>Meriones unguiculatus</i>)	347
Барбара Гайковска, Мирослав Я. Моссаковский, Анна Заремба-Ковальска: Влияние индометацина на ультраструктуру ядрышка. Краткое сообщение	367
Ришард Плюта, Ян Альбрехт: Печеночная энцефалопатия у крыс вызванная введением тиоацетамида. Клинические наблюдения	379
Эльжбета Киды, Кристина Ренкавек, Тереса Пиурек: Нейропатологическая картина усиленной языко-лицевой дискинезии	387
Леслав Я. Мазяж, Юзеф Щех: Морфологические и гистоэнзиматические изменения в мозге молодых и зрелых крыс после введения CCNU (Lomustine)	399
Антони Годлевски, Юзеф Щех: Гистоэнзиматические изменения белого вещества молодых крыс происходящие под влиянием винкристина подаваемого во второй половине внутриутробной жизни	415
Ришард Плюта: Изменения температуры мозга и выбранных областей тела кролика и его поведения в повышенной температуре окружения	435
Анна Заремба-Ковальска, Барбара Гайковска: Влияние гипертермического шока на ультраструктуру культивируемых питуцитов	445

SPIS TREŚCI

Mirosław J. Mossakowski: Mirosław Bernard Kozik 1928—1983	297
Irena Hausmanowa-Petrusewicz, Anna M. Kamińska: Wartość diagnostyczna ilościowej elektromiografii i biopsji mięśniowej w chorobach miopatycznych. Opis 464 przypadków	307
Halina Weinrauder, Anna Zaręba-Kowalska: Immunofluorescencyjna lokalizacja białka włókien glejowych (GFAP) w płacie nerwowym przysadki <i>in vitro</i>	335
Mirosław J. Mossakowski, Barbara Gajkowska: Wpływ indometacyny na obraz ultrastrukturalny wczesnych niedokrwiennych uszkodzeń mózgu u chomika mongolskiego (<i>Meriones unguiculatus</i>)	347
Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski, Anna Zaręba-Kowalska: Wpływ indometacyny na ultrastrukturę jąderka. Doniesienie wstępne	367
Ryszard Pluta, Jan Albrecht: Encefalopatia wątrobowa u szczurów wywołana podawaniem tioacetamidu. Obserwacje kliniczne	379
Elżbieta Kida, Krystyna Renkawek, Teresa Piórek: Obraz neuropatologiczny nasiloniej dyskinezy twarzowo-językowej	387
Lesław J. Maziarz, Józef Szczech: Zmiany morfologiczne i histoenzymatyczne w mózgu młodych i dojrzałych szczurów po podaniu CCNU (Lomustine)	399
Antoni Godlewski, Józef Szczech: Zmiany histoenzymatyczne istoty białej mózgu młodych szczurów zachodzące pod wpływem winkrystyny podawanej w drugiej połowie życia płodowego	415
Ryszard Pluta: Zmiany temperatury mózgu i wybranych okolic ciała królika oraz jego zachowania się w podwyższonej temperaturze otoczenia	435
Anna Zaręba-Kowalska, Barbara Gajkowska: Wpływ szoku hipertermicznego na ultrastrukturę hodowanych pituicytów	445

CONTENTS

Mirosław J. Mossakowski: Mirosław Bernard Kozik 1928—1983	297
Irena Hausmanowa-Petrusewicz, Anna M. Kamińska: Diagnostic yield of quantitative electromyography and muscle biopsy in myopathic diseases. Report of 464 cases	307
Halina Weinrauder, Anna Zaręba-Kowalska: Immunofluorescent demonstration of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hypophyseal neural lobe <i>in vitro</i>	335
Mirosław J. Mossakowski, Barbara Gajkowska: Influence of indomethacin on the ultrastructural pathology of the brain following temporary ischemia in mongolian gerbils (<i>Meriones unguiculatus</i>)	347
Barbara Gajkowska, Mirosław J. Mossakowski, Anna Zaręba-Kowalska: Action of indomethacin on nucleolar fine structure. Preliminary report	367
Ryszard Pluta, Jan Albrecht: Thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in the rat. Clinical observations	379